

Aus dem Fachbereich Biophysik
Theoretische Medizin und Biowissenschaften
der Medizinischen Fakultät
der Universität des Saarlandes

Altersbedingte Veränderungen bei
Kalziumsignalen und der zytotoxischen Funktion
muriner CD8⁺ T-Zellen

Age-dependent changes of
calcium signals and the cytotoxic function
of murine CD8⁺ T cells

Dissertation

Zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
der medizinischen Fakultät
der Universität des Saarlandes

2020

vorgelegt von

Adrian Angenendt

geb. am 03.07.1988 in Wesel

Homburg 2020

Tag der Promotion: 08.12.2020

Dekan: Prof. Dr. Michael D. Menger

Berichterstatter: Prof. Dr. Markus Hoth
Prof. Dr. Frank Lammert
PD Dr. Stephan Philipp

Inhaltsverzeichnis

1. Summary.....	1
2. Zusammenfassung.....	3
3. Einleitung	5
3.1. Kalzium	5
3.1.1. Speicher-gesteuerter Kalziumeinstrom.....	6
3.2. Das Immunsystem.....	9
3.2.1. CD8 ⁺ T-Zellen	10
3.2.2. Altersbedingte Veränderungen des Immunsystems	13
3.2.3. Zielsetzung.....	15
4. Material und Methoden.....	17
4.1. Material	17
4.1.1. Reagenzien	17
4.1.2. Kits.....	18
4.1.3. Antikörper.....	18
4.1.4. qRT-PCR-Primer.....	20
4.1.5. Lösungen	20
4.1.6. Geräte	24
4.1.7. Mäuse	25
4.1.8. Zelllinien.....	25
4.2. Methoden	27
4.2.1. Milzpräparation und Splenozytenisolation	27
4.2.2. CD8 ⁺ T-Zellisolation	27
4.2.3. Quantitative Echtzeitpolymerasekettenreaktion	28
4.2.4. Western Blot	30
4.2.5. Durchflusszytometrie.....	32
4.2.6. Ca ²⁺ -Imaging.....	34
4.2.7. Whole-Cell Patch-Clamp	36
4.2.8. Echtzeitzytotoxizitätsassay.....	37
5. Ergebnisse	40
5.1. Altersbedingte Unterschiede bei C57BL6/J-Mäusen.....	40
5.1.1. Phänotyp.....	41
5.1.2. Isolation CD8 ⁺ T-Zellen	42
5.1.3. CD8 ⁺ T-Zellsubpopulationen	43
5.2. Das Alter reduziert Ca ²⁺ -Signale muriner CD8 ⁺ T-Zellen	46
5.2.1. Reduzierte Ca ²⁺ -Signale in unstimulierten CD8 ⁺ T-Zellen alter Mäuse	46

5.2.2.	Reduzierte Ca^{2+} -Signale in stimulierten $CD8^+$ T-Zellen alter Mäuse	53
5.2.3.	Reduzierte Ca^{2+} -Signale in gesorteten $CD8^+$ zentralen und Effektor-Gedächtnis-T-Zellen	59
5.2.4.	Schnellerer Efflux von Ca^{2+} aus $CD8^+$ T-Zellen alter Mäuse	62
5.2.5.	Reduzierter I_{CRAC} in unstimulierten $CD8^+$ T-Zellen alter Mäuse	64
5.2.6.	Reduktion in Ca^{2+} -Signalen korreliert mit verminderten Expressionen einiger Bestandteile des STIM-Orai-vermittelten Ca^{2+} -Einstroms	65
5.3.	Einfluss des Alterns auf die Zytotoxizität muriner $CD8^+$ T-Zellen	68
5.3.1.	Schnellere Zytotoxizitätskinetik von $CD8^+$ T-Zellen aus alten Mäusen.....	69
5.3.2.	Altersbedingt gesteigerte Expression für die zytotoxische Funktion $CD8^+$ T-Zellen relevanter Proteine	74
5.3.3.	Schnellere Kinetik ist nicht exklusiv auf unterschiedliche Subtypenverteilung $CD8^+$ T-Zellen zurückzuführen	76
5.3.4.	Höheres Alter wirkt sich protektiv auf Concanamycin A-vermittelte Reduktion der Zytotoxizität muriner $CD8^+$ T-Zellen aus	79
5.3.5.	Stärkere Reduktion der Zytotoxizität von $CD8^+$ T-Zellen junger Mäuse durch Blockieren des Fas-Ligand/Fas-Rezeptor-Signalwegs.....	82
5.3.6.	Cyclosporin A-Behandlung vermindert die Zytotoxizität von $CD8^+$ T-Zellen alter aber nicht junger Mäuse	85
5.3.7.	Ca^{2+} -Abhängigkeit der Zytotoxizität muriner $CD8^+$ T-Zellen	87
6.	Diskussion.....	91
6.1.	Zunahme an Gedächtnis- auf Kosten naiver $CD8^+$ T-Zellen	92
6.2.	Altersbedingt reduzierte Ca^{2+} -Signale muriner $CD8^+$ T-Zellen	92
6.3.	Altersbedingte Steigerung der Zytotoxizitätskinetik $CD8^+$ T-Zellen	101
7.	Referenzen.....	111
	Abkürzungsverzeichnis.....	128
	Abbildungsverzeichnis.....	130
	Tabellenverzeichnis.....	132
	Publikationen.....	133
	Curriculum Vitae.....	134
	Danksagungen	138

1. Summary

The mean life expectancy in developed countries experienced a steady rise throughout the last decades. Age-related functional changes of components of the innate and the adaptive immune response represent a problem with increasing urgency in an aging society. The decrease in the efficiency of CD8⁺ T cells in the course of immunosenescence could be problematic, considering in the increase in incidences of cancer, resulting from degenerated cells. Furthermore, the protection against new pathogens, like the annually mutating influenza virus decreases. The increased mortality in the elderly population due to infections with the severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2), which led to a global pandemic in 2019/2020, is most probably also a result of the age-related impairment of CD8⁺ T cell functions.

Calcium (Ca²⁺), as an essential secondary messenger, is important for the functionality of T cells. Besides its involvement in the regulation of proliferation, differentiation and apoptosis, a rise of the intracellular Ca²⁺ concentration is necessary for lytic granule exocytosis as one of the main mechanisms of CD8⁺ T cell-mediated cytotoxicity. The influx of Ca²⁺ in CD8⁺ T cells is facilitated mainly by stromal interaction molecule-(STIM)-activated Orai-channels. STIMs are Ca²⁺ sensor proteins in the membrane of the endoplasmic reticulum (ER), which are activated by a reduction of the Ca²⁺ concentration in the ER. This leads to an oligomerization and an orientation in the direction of the plasma membrane. There, they activate and open Ca²⁺ release-activated Ca²⁺ (CRAC) channels, the Orai channels, which facilitate the Ca²⁺ release-activated Ca²⁺ current (I_{CRAC}).

In the first part of this work the effect of aging on the Ca²⁺ influx through STIM-activated Orai channels was investigated. For this purpose, the channels were analyzed by fura2-AM-based Ca²⁺ imaging and whole-cell patch clamp experiments. Furthermore, the expression levels of relevant proteins were quantified by quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCRs) and western blot. All experiments were carried out with non-stimulated and stimulated CD8⁺ T cells as well as sorted CD8⁺ T cell subtypes of adult and elderly mice.

The main function of CD8⁺ T cells is the killing of virus infected or malignant cells. The impact of aging on this function is discussed controversially and differs depending on the experimental design. Especially in terms of kinetic differences there is a lack of data. Therefore, in the second part of this work, a comparison of the efficiency of the cytotoxic function between CD8⁺ T cells of adult and elderly mice was carried out by a time-resolved killing assay. Furthermore, the impact of various external Ca²⁺ concentrations on this process was investigated and age-related changes in the expressions of relevant proteins were quantified by qRT-PCR and western blot.

An essential result of this work is, that reductions of the expression levels of STIMs and Orais, as well as an increased expression of plasma membrane Ca^{2+} ATPase 4 (PMCA4) in CD8^+ T cells of elderly mice provide an explanation for the age-related reduction of Ca^{2+} signals presented in this doctoral study. Furthermore, the time-resolved killing assays showed an increased killing kinetic for CD8^+ T cells of elderly mice, which is most likely based on increased expressions of fas ligand, perforin and granzymes. The killing assays with various external Ca^{2+} concentrations showed, that an increase or a decrease in the abundance of Ca^{2+} in the extracellular fluid affects the cytotoxicity of CD8^+ T cells of elderly mice less than the cytotoxicity of CD8^+ T cells of adult mice. Additionally, for the first time, the minimal external Ca^{2+} concentration for an efficient cytotoxicity of murine CD8^+ T cells was determined at approximately 74 μM . The characteristic age-related changes in the CD8^+ T cell subtype distribution are most likely no additional cause for the Ca^{2+} signal reductions or the increased killing kinetic.

This study offers an explanation for age-related reductions of Ca^{2+} signals in murine CD8^+ T cells. Furthermore, it demonstrates an increased kinetic of the cytotoxic function of CD8^+ T cells of elderly mice and provides a likely source of this effect. Based on this work other parameters of the Ca^{2+} homeostasis and the cytotoxic function of murine CD8^+ T cells can be investigated for age-related differences and their causes. Moreover, one could aim for a transfer of the gained knowledge from murine to human CD8^+ T cells.

2. Zusammenfassung

Die mittlere Lebenserwartung ist in entwickelten Ländern in den letzten Jahrzehnten stetig angestiegen. Altersbedingte Veränderungen der Funktionalität von Komponenten der angeborenen und der adaptiven Immunantwort stellen in einer älter werdenden Gesellschaft ein zunehmendes Problem dar. Die im Zuge dieser Immunoseneszenz reduzierte Effizienz von $CD8^+$ T-Zellen könnte problematisch im Zusammenhang mit der Zunahme an Krebsinzidenzen durch entartete Zellen sein. Darüber hinaus nimmt die Wirkung gegenüber neuen Keimen, wie beispielsweise dem jährlich mutierenden Influenzavirus, ab. Auch bei der gesteigerten Mortalität der älteren Bevölkerung durch das schwere akute Atemwegssyndrom Coronavirus 2 (engl. ‚severe acute respiratory syndrome coronavirus 2‘, SARS-CoV-2), welches 2019/2020 eine weltweite Pandemie ausgelöst hat, werden unter anderem altersbedingte Beeinträchtigungen der $CD8^+$ T-Zellfunktionalität als Ursache diskutiert.

Kalzium (Ca^{2+}) ist als essenzieller sekundärer Botenstoff wichtig für die Funktionalität von T-Zellen. Neben Proliferation, Differenzierung und Apoptose wird durch Ca^{2+} auch die Sekretion lytischer Granula, ein Hauptmechanismus der Zytotoxizität von $CD8^+$ T-Zellen, gesteuert. Der Einstrom von Ca^{2+} über die Plasmamembran erfolgt in $CD8^+$ T-Zellen hauptsächlich durch Stromal Interaction Molecule-(STIM)-aktivierte Orai-Kanäle. STIMs sind Ca^{2+} -Sensorproteine in der Membran des endoplasmatischen Retikulums (ER), die durch eine Reduktion der Ca^{2+} -Konzentration ($[Ca^{2+}]$) im ER aktiviert werden, woraufhin sie oligomerisieren und sich Richtung Plasmamembran orientieren. Dort aktivieren und öffnen sie Orai-Kanäle, die als Ca^{2+} -freisetzung-aktivierte Ca^{2+} -Kanäle (engl. ‚ Ca^{2+} -release activated Ca^{2+} -channel‘, CRAC-Kanal) fungieren. Durch die geöffneten Orai-Kanäle erfolgt der Ca^{2+} -freisetzung-aktivierte Ca^{2+} -Strom (I_{CRAC}).

In der vorliegenden Arbeit wurde als Erstes der Effekt des Alterns auf den Ca^{2+} -Einstrom durch STIM-aktivierte Orai-Kanäle untersucht. Dazu wurden die Kanäle mittels Fura2-AM-basierten Ca^{2+} -Imaging- und Whole-Cell Patch-Clamp-Experimenten analysiert. Die Expressionslevels der relevanten Proteine wurden mit quantitativer Real-Time Polymerase-Kettenreaktion (qRT-PCRs) und Western Blot bestimmt. Alle Experimente wurden mit unstimulierten und stimulierten $CD8^+$ T-Zellen sowie gesorteten $CD8^+$ T-Zellsubtypen junger und alter Mäuse durchgeführt.

Die Hauptfunktion $CD8^+$ T-Zellen ist die Abtötung virusinfizierter oder entarteter körpereigener Zellen. Der Einfluss des Alterns auf diese Funktion wird kontrovers diskutiert und ist je nach Versuchsaufbau verschieden. Gerade in Hinsicht auf kinetische Unterschiede mangelt es an Daten. Daher wurde im zweiten Teil der Arbeit die Effizienz der Zytotoxizität zwischen $CD8^+$ T-Zellen junger und alter Mäuse mittels eines kinetischen Echtzeitzytotoxizitätsassays verglichen. Weiterhin wurde der Einfluss verschiedener externer

$[Ca^{2+}]$ ($[Ca^{2+}]_{ext}$) auf diesen Prozess untersucht und altersbedingte Veränderungen relevanter Proteine mittels qRT-PCRs und Western Blots quantifiziert.

Ein wesentliches Ergebnis der Arbeit ist, dass Reduktionen der Expressionslevels der STIMs und Orais sowie Steigerungen der Plasmamembran Ca^{2+} ATPase-(PMCA)-4-Expression bei $CD8^+$ T-Zellen alter Mäuse die in dieser Arbeit aufgezeigten altersbedingten Ca^{2+} -Signalreduktionen erklären können. Weiterhin konnte in Zytotoxizitätsassays eine altersbedingte Steigerung der Zytotoxizitätskinetik festgestellt werden, die aller Wahrscheinlichkeit nach auf Expressionssteigerungen von Fas-Ligand, Perforin und Granzymen zurückzuführen ist. Aus den Zytotoxizitätsassays mit verschiedenen $[Ca^{2+}]_{ext}$ geht hervor, dass eine gesteigerte oder verminderte Abundanz von Ca^{2+} in der extrazellulären Flüssigkeit die Zytotoxizität der $CD8^+$ T-Zellen alter Mäuse weniger beeinträchtigt als die der $CD8^+$ T-Zellen der jungen Mäuse. Ergänzend wurde erstmals die mindestnötige $[Ca^{2+}]_{ext}$ für eine effiziente zytotoxische Funktion muriner $CD8^+$ T-Zellen bestimmt, die bei etwa 74 μM liegt. Höchstwahrscheinlich ist der in der Arbeit beschriebene altersbedingte Unterschied in der Subtypenverteilung der $CD8^+$ T-Zellen weder als weitere Ursache für die Reduktionen der Ca^{2+} -Signale noch die gesteigerten Kinetik der zytotoxischen Funktion anzusehen.

Diese Arbeit liefert eine potenzielle Erklärung für altersbedingt auftretende Ca^{2+} -Signalreduktionen in murinen $CD8^+$ T-Zellen. Weiterhin konnte aufgezeigt werden, dass murine $CD8^+$ T-Zellen im Alter über eine gesteigerte Zytotoxizitätskinetik verfügen und eine wahrscheinliche Ursache dieses Effekts aufgedeckt werden. Aufbauend auf diese Arbeit lassen sich weitere Parameter der Ca^{2+} -Homöostase und der zytotoxischen Funktion muriner $CD8^+$ T-Zellen auf altersbedingte Unterschiede und deren Hintergründe untersuchen oder eine Übertragung der gewonnenen Erkenntnisse auf humane $CD8^+$ T-Zellen anstreben.

3. Einleitung

3.1. Kalzium

Kalzium (Ca^{2+}) hat im Periodensystem der Elemente die Ordnungszahl 20, zählt zu den Erdalkalimetallen und macht in etwa 3,39 % der prozentualen Masse der Erdkruste aus (Binder, 1999). Im menschlichen Körper macht es bei einem durchschnittlichen Erwachsenen ungefähr 1 kg des Körpergewichts aus, wovon 99 % in Knochen und Zähnen befindlich sind. Das restliche Prozent des quantitativ am stärksten im Körper vertretenen Mineralstoffs findet sich in der Extrazellulärflüssigkeit und dem Zyto- und Karyoplasma (Brandes, Lang, & Schmidt, 2019). Zwischen Extra- und Intrazellulärraum sowie den verschiedenen Zellkompartimenten liegen hierbei große Unterschiede in den jeweiligen Ca^{2+} -Konzentrationen ($[\text{Ca}^{2+}]$) vor (Gomperts, Kramer, & Tatham, 2015). In T-Zellen beträgt die intrazelluläre $[\text{Ca}^{2+}]$ ($[\text{Ca}^{2+}]_{\text{int}}$) einer Zelle im Ruhezustand beispielsweise lediglich 50 - 100 nM, wohingegen in der Extrazellulärflüssigkeit eine $[\text{Ca}^{2+}]$ ($[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ext}}$) von 1 - 2 mM vorliegt (Abbildung 1). Die $[\text{Ca}^{2+}]$ des endoplasmatischen Retikulums ($[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ER}}$) liegt mit 0,3 - 1 mM dazwischen (Abbildung 1). In Mitochondrien kann die $[\text{Ca}^{2+}]$ ($[\text{Ca}^{2+}]_{\text{mito}}$) stark variieren und liegt zwischen 0,1 nM und 1 mM (Frisch, Angenendt, Hoth, Prates Roma, & Lis, 2019; Trebak & Kinet, 2019).

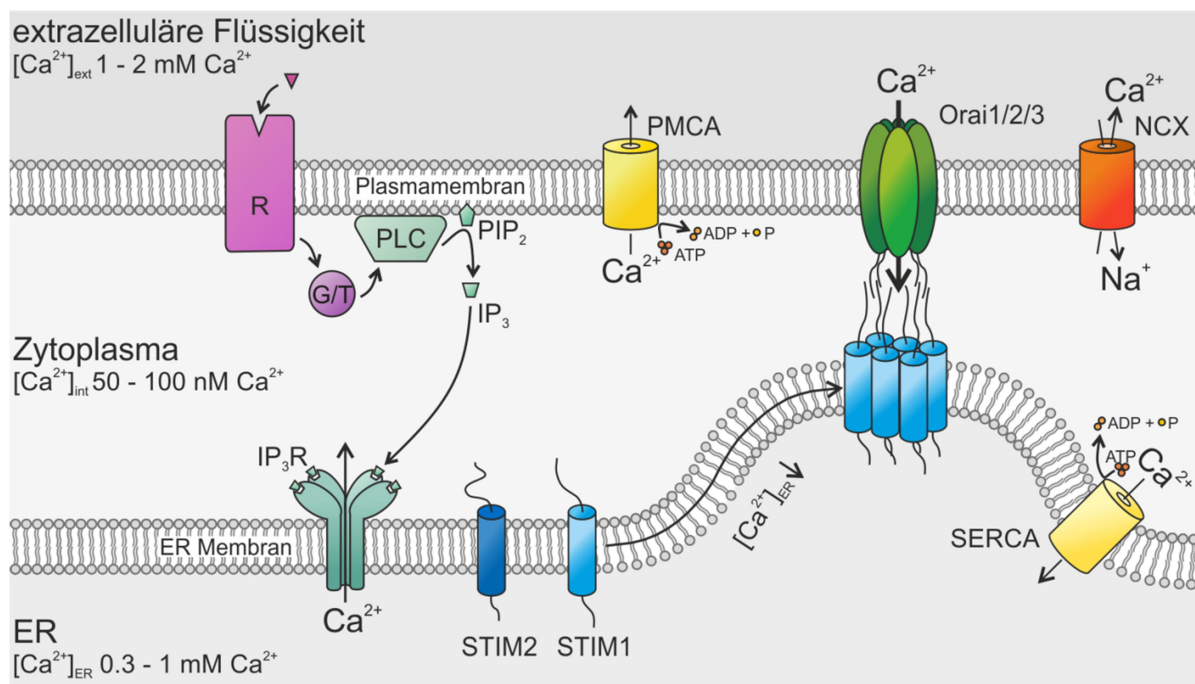


Abbildung 1: Speichergesteuerter Kalziumeinstrom (SOCE) durch Stromal Interaction Molecule-(STIM)-aktivierte Orai-Kanäle. Nach der Aktivierung G-Protein- oder Tyrosinkinase-gekoppelter (G/T) Rezeptoren (R), hydrolysiert die Phospholipase C (PLC) Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP₂) zu Inositoltrisphosphat (IP₃). Letzteres bindet an und öffnet seinen Rezeptor, einen Kalziumkanal in der Membran des endoplasmatischen Retikulums (ER). Durch die Differenz zwischen der Kalziumkonzentration des Zytoplasmas ($[\text{Ca}^{2+}]_{\text{int}}$) und der des ER ($[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ER}}$) wird die Ca^{2+} -Depletion der ER-Speicher initiiert. Diese Verminderung der $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ER}}$ aktiviert luminale Ca^{2+} -Sensorproteine, die STIMs, welche daraufhin oligomerisieren und sich zur Plasmamembran ausrichten. Dort binden sie an und öffnen dadurch Orai-Kanäle, wodurch ein Ca^{2+} -Einstrom über die Plasmamembran erfolgt. Plasmamembran Ca^{2+} -ATPasen (PMCA), $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher (NCX) und sarko-/endoplasmatisches Retikulum Ca^{2+} -ATPasen (SERCA) entfernen Ca^{2+} anschließend teils energieabhängig durch die Hydrolyse von Adenosintri-phosphat (ATP) wieder aus dem Zytosol. Modifiziert aus (Frisch et al., 2019).

Hierbei ist der von Plasmamembran Ca^{2+} -ATPasen (PMCA), $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauschern (NCX), sarco-/endoplasmatisches Retikulum Ca^{2+} -ATPasen (SERCA), und mitochondrialen Porinen und Ca^{2+} -Uniportern aufrecht erhaltene Konzentrationsunterschied zwischen Intra- und Extrazellularraum entscheidend für die Reizweiterleitung des Nervensystems, wie auch zelluläre Funktionen nicht-erregbarer Zellen, wie den Zellen des Immunsystems (Clapham, 2007; Gomperts et al., 2015). Der Unterschied in den $[\text{Ca}^{2+}]$ zwischen Intra- und Extrazellularraum verursacht eine nach innen gerichtete Triebkraft für Ca^{2+} -Ionen über die Plasmamembran. Da Ionen auf beiden Seiten der semipermeablen Zellmembran einen Konzentrationsausgleich anstreben, ergibt sich für Ca^{2+} durch den Unterschied zwischen der, mit 1 - 2 mM über 10.000-fach höheren, $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ext}}$ und der $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{int}}$ mit 50 - 100 nM ein nach innen gerichteter chemischer Gradient. Da sich im Zytoplasma im Vergleich zur extrazellulären Flüssigkeit mehr negativ geladene Ionen befinden entsteht zudem ein elektrischer Gradient der den Einstrom positiver Ionen in das Zellinnere begünstigt (Brandes et al., 2019). Zusammen bilden die beiden Gradienten den elektrochemischen Gradienten für Ca^{2+} , der eine zentrale Grundlage für die Funktion von Ca^{2+} als sekundärem Botenstoff darstellt (Clapham, 2007). Als solcher aktiviert Ca^{2+} im Zytosol unter anderem Enzyme, Ionenkanäle und Transkriptionsfaktoren (TF) direkt oder indirekt (Berridge, Lipp, & Bootman, 2000; Clapham, 2007). Ca^{2+} -Signale sind bei einer Vielzahl von Zelltypen von fundamentaler Bedeutung bei der Regulation wichtiger physiologischer Prozesse. Hierzu zählen beispielsweise die Zellproliferation, die Motilität von Zellen, die Aktivierung und Expression bestimmter Gene, die Sekretion von Vesikeln über die Plasmamembran oder der programmierte Zelltod (Berridge, Bootman, & Lipp, 1998; Berridge et al., 2000; Feske, Wulff, & Skolnik, 2015).

3.1.1. Speicher-gesteuerter Kalziumeinstrom

Bei nicht-erregbaren Zellen, wie unter anderem T-Zellen, stellt der speichergesteuerte Ca^{2+} -Einstrom (engl. ‚store-operated Ca^{2+} entry‘, SOCE) den Haupteintrittsweg von Ca^{2+} in die Zelle dar (Feske et al., 2015; Trebak & Kinet, 2019). Der SOCE startet mit der Aktivierung bestimmter G-Protein- oder Tyrosinkinase-gekoppelter Oberflächenrezeptoren. Über verschiedene Signalwege führt dies zur Aktivierung der plasmamembrangekoppelten Phospholipase C (PLC) (Abbildung 1). Die PLC hydrolysiert Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP_2), ein nahezu exklusiv dem Zytosol zugewandtes Phospholipid, zu 1,2-Diacylglycerin (DAG) und Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP_3). Letzteres bindet daraufhin an seinen Rezeptor in der Membran des endoplasmatischen Retikulums (ER). Hierbei handelt es sich um einen Ca^{2+} -Kanal. Da die $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ER}}$ wie in Kapitel 3.1 beschrieben um vier bis fünf Zehnerpotenzen höher ist als im Zytosol, strömt Ca^{2+} aus dem ER ins Zytosol. Dies führt zu einem temporären Abfall der $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ER}}$, die von Ca^{2+} -Sensorproteinen, den Stromal Interaction Molecules (STIM) wahrgenommen wird. Diese Sensoreigenschaft der STIMs basiert auf ER-

luminalen EF-Handdomänen (Liou et al., 2005; Roos et al., 2005). Diese binden im Ruhezustand Ca^{2+} -Ionen, die ab einem bestimmten Schwellenwert, festgelegt in ihrer Dissoziationskonstante (K_d), von den EF-Händen dislozieren (Soboloff, Rothberg, Madesh, & Gill, 2012). Hierdurch wird eine Konformationsänderung der STIM-Proteine initiiert, die zu einer Clusterbildung und einer Ausrichtung zur Plasmamembran in sogenannte ER-Plasmamembran-Junctions führt (Carrasco & Meyer, 2011; Wu, Buchanan, Luik, & Lewis, 2006). Dort binden sie mit ihrer Ca^{2+} -aktivierenden Domäne (CAD) an plasmamembranständige Orai-Kanäle, wodurch diese geöffnet werden (Abbildung 1) (Park et al., 2009; Zhang et al., 2005). Orai-Kanäle sind einwärts rektifizierende Kanäle mit einer hohen Selektivität für Ca^{2+} -Ionen (Lis et al., 2007). Der von durch die Orai-Kanäle einströmenden Ca^{2+} -Ionen vermittelte Strom korrelierend zum SOCE wird als Ca^{2+} -freisetzungaktivierter Ca^{2+} -Strom (engl. ‚ Ca^{2+} -release activated calcium current‘, I_{CRAC}) bezeichnet (Hoth & Penner, 1993). Die Funktionen der SOCE-Komponenten STIM (Liou et al., 2005; Roos et al., 2005) und Orai (Feske et al., 2006; Parekh & Putney, 2005; Vig et al., 2006) wurden erstmals 2005 bis 2006 beschrieben. Das Ca^{2+} -Signal wird durch eine negative Rückkopplungsschleife terminiert (Hoth & Penner, 1993). Diese lässt sich in eine schnellere und eine langsamere Ca^{2+} -abhängige Inaktivierung des Ca^{2+} -Signals unterteilen. Bei der schnelleren Inaktivierung interagiert das durch die geöffneten Orai-Kanäle einströmende Ca^{2+} mit Calmodulin, welches dadurch aktiviert wird und die STIM-Orai-Interaktion unterbindet (Mullins, Chan, Dolmetsch, & Lewis, 2009). Die langsamere Inaktivierung beruht unter anderem auf einem Auffüllen der ER- Ca^{2+} -Speicher durch die SERCA, wodurch die EF-Handdomänen der STIMs wieder Ca^{2+} binden und die STIMs zu ihrer passiven Konformation zurückkehren (Zweifach & Lewis, 1995).

3.1.1.1. STIMs

Es sind zwei Isoformen der ER-membranständigen STIMs, STIM1 und STIM2, bekannt, die zu etwa 61 % genetisch und auf Proteinebene zu 47 % identisch sind (Williams et al., 2001). Beide sind aufgrund ihrer luminalen EF-Handdomänen in der Lage eine Konzentrationsabnahme von Ca^{2+} im ER wahrzunehmen (Liou et al., 2005; Roos et al., 2005). Hierbei unterscheiden sie sich allerdings in ihrer Sensitivität. Die K_d für Ca^{2+} von STIM1 ist mit $\sim 200 \mu\text{M}$ halb so hoch wie die von STIM2 mit $\sim 400 \mu\text{M}$. Daraus folgt, dass ein geringeres Absinken der $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ER}}$ ausreicht, um STIM2 zu aktivieren, wohingegen für die Aktivierung von STIM1 ein etwas stärkeres Absinken benötigt wird (Soboloff et al., 2012; Thiel, Lis, & Penner, 2013). Zum Teil ist STIM2 aufgrund der höheren Ca^{2+} -Sensitivität sogar bereits in ruhenden Zellen aktiv (Brandman, Liou, Park, & Meyer, 2007). Weiterhin unterscheiden sich die STIM-Isoformen in der Kinetik und Größe des über die Aktivierung von Orai-Kanälen vermittelten I_{CRAC} (Wang et al., 2014). STIM1 ist im Vergleich zu STIM2 nach einer Entleerung der ER- Ca^{2+} -Speicher reaktionsschneller und verursacht größere

Orai-vermittelte Ca^{2+} -Ströme, wohingegen die durch STIM2 erfolgende Aktivierung der Orais zu nachhaltigeren Ca^{2+} -Strömen führt (Y. Zhou et al., 2009). Für beide STIM-Isoformen sind alternative Spleißvarianten bekannt, die sich funktionell von ihrer kanonischen Variante unterscheiden. Eine längere Spleißvariante von STIM1, STIM1L, ist beispielsweise bereits ohne vorherige ER- Ca^{2+} -Speicherentleerung aktiv und befähigt dadurch Muskelzellen zu einer schnelleren SOCE-Generierung als konventionelles STIM1 (Darbellay, Arnaudeau, Bader, König, & Bernheim, 2011). Eine alternative Spleißvariante von STIM2, STIM2.1, verfügt im Gegensatz zur konventionellen Variante, STIM2.2, über eine hemmende Wirkung auf den SOCE (Miederer et al., 2015; Rana et al., 2015). In Mäusen finden sich sowohl beide regulären STIM-Isoformen, wobei die Aminosäuresequenzen von humanem und murinem STIM1 zu 96 % und die von humanem und murinem STIM2 zu 86 % identisch sind (Williams et al., 2001), als auch die aufgeführten alternativen Spleißvarianten.

3.1.1.2. Orais

Es sind drei Isoformen der plasmamembranständigen Orai-Proteine, Orai1, Orai2 und Orai3, bekannt. Sie stellen die monomeren Kanaluntereinheiten der hexameren, homo- oder heteromer zusammengesetzten Orai- respektive CRAC-Kanäle dar (Prakriya et al., 2006; Prakriya & Lewis, 2015; Vig et al., 2006). Alle Isoformen können einwärts gleichgerichtete Kanäle mit einer hohen Selektivität für Ca^{2+} ausbilden, die durch ER- Ca^{2+} -Speicherentleerungen aktiviert und Ca^{2+} -abhängig inaktiviert werden (Frisch et al., 2019; Lis et al., 2007). Orai1 stellt die meiststudierte und damit die am besten charakterisierte der drei Isoformen dar (Prakriya & Lewis, 2015). Eine Ursache dafür ist, dass aus Orai1-Untereinheiten zusammengesetzte CRAC-Kanäle nach Aktivierung durch STIM1 die größte Leitfähigkeit für Ca^{2+} entfalten (Lis et al., 2007). Orai2-Kanäle weisen im Vergleich die schnellste Aktivierung auf (Lis et al., 2007). In heterolog aus Orai1 und Orai2 zusammengesetzten CRAC-Kanälen soll Orai2 einen reduzierenden Effekt auf den SOCE in T-Zellen aufweisen, der zur Feinabstimmung von Ca^{2+} -Signalen beitragen soll (Vaeth, Yang, et al., 2017). Die geringste Leitfähigkeit für Ca^{2+} und die langsamste Aktivierung der drei Isoformen weist Orai3 auf (Lis et al., 2007). Ein weiteres Alleinstellungsmerkmal dieser Isoform ist seine Resistenz gegenüber reaktiven Sauerstoffspezies wie H_2O_2 (Bogeski et al., 2010). Sowohl die Funktion von Orai1 als auch die von Orai2 wird durch ROS aufgrund eines redoxsensitiven Cysteins an Position 195 der Aminosäuresequenz inhibiert, anstelle dessen bei Orai3 ein Glycin aufzufinden ist (Bogeski et al., 2010; Frisch et al., 2019). Hierdurch können über Orai3 wahrscheinlich auch in Geweben mit hoher ROS-Abundanz, wie der Tumormikroumgebung Ca^{2+} -Signale gewährleistet werden (Frisch et al., 2019).

3.1.1.3. Ca^{2+} Pumpen

Der Adenosintriphosphat-(ATP)-abhängige Transport von Ca^{2+} entgegen seines elektrochemischen Gradienten durch PMCAs stellt einen zentralen Austrittsweg von Ca^{2+} aus einer Vielzahl eukaryotischer Zellen dar (Bruce, 2018). Dieser, die basale $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{int}}$ niedrig haltende, Transport ist wichtig für die Funktion von Ca^{2+} als sekundärem Botenstoff (Clapham, 2007). Es existieren vier PMCA-Isoformen und mehr als 20 mögliche alternative Spleißvarianten (Strehler & Zacharias, 2001). Die Isoformen PMCA2 und PMCA3 finden sich vorwiegend in exzitatorischen Zellen, wohingegen PMCA1 und PMCA4 ubiquitär exprimiert werden (Strehler & Zacharias, 2001). In T-Zellen werden sie beispielsweise benötigt, um Ca^{2+} -Signale transient zu halten, damit Zellen nicht durch Ca^{2+} -vermittelte Zytotoxizität Schaden nehmen (Bruce, 2018). Weiterhin bestimmt die Aktivität der PMCAs maßgeblich die Form von Ca^{2+} -Signalen mit (Bautista, Hoth, & Lewis, 2002).

Die SERCA transportiert Ca^{2+} ATP-abhängig entgegen seines elektrochemischen Gradienten aus dem Zytosol ins ER (Cahalan, 2009). Hierdurch wird ein für den SOCE wichtiger Ca^{2+} -Konzentrationsunterschied zwischen Zytosol und ER gewährleistet. In der ruhenden Zelle ist die $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ER}}$ hoch genug, um Ca^{2+} in den EF-Handdomänen der STIMs gebunden zu halten (Cahalan, 2009). Das Ausströmen von Ca^{2+} aus dem ER, beispielsweise nach der Aktivierung ER-ständiger Ca^{2+} -Kanäle, wie den IP_3 -Rezeptoren, veranlasst einen Verlust der Bindung von Ca^{2+} -Ionen an besagte EF-Handdomänen und eine Initiierung des SOCE (Putney & Tomita, 2012). Daher wird für die Untersuchung des SOCE *in vitro* häufig ein irreversibler Inhibitor der SERCA, Thapsigargin (TG) verwendet (Angenendt et al., 2020). Durch das TG-vermittelte Ausbleiben des energieabhängigen Transports von Ca^{2+} ins ER durch die SERCA kommt es zu einer passiven Depletion von Ca^{2+} aus dem ER über sogenannte Ca^{2+} -Leckkanäle, wie Sec61, wodurch die STIMs aktiviert werden und der SOCE initiiert wird (Lang et al., 2011).

3.2. Das Immunsystem

Das Immunsystem des Menschen stellt die körpereigene Abwehr gegen Krankheitserreger körperfremder, wie Bakterien, Viren oder Parasiten, sowie körpereigener Natur, wie entarteter Zellen, aus denen eine Krebserkrankung hervorgehen kann, dar. Zusammengesetzt wird das Immunsystem aus unterschiedlichen Organen und Zelltypen, die jeweils einen spezifischen Aspekt dieser Abwehr von Pathogenen abdecken. Hierbei unterteilt man das Immunsystem in angeborene und adaptive Bestandteile (Murphy & Weaver, 2018).

Die angeborene Immunität ist zeitgeschichtlich konservierter und schon bei einfachen Organismen nachweisbar. Zusammengesetzt wird sie aus physiologischen Barrieren, wie Epithelien, zellvermittelten Abwehrprozessen, wie der Phagozytose durch Makrophagen oder

dendritische Zellen (engl. ‚dendritic cells‘, DC) und humoralen Faktoren, wie dem Komplementsystem. Das angeborene Immunsystem ist vergleichsweise unspezifisch, da die Erkennung von Pathogenen über in der Erbinformation festgelegte Rezeptoren, die Pattern-Recognition-Rezeptoren, erfolgt. Diese erkennen ein breites Spektrum allgemeiner Bestandteile von Bakterien, Viren und Pilzen (Murphy & Weaver, 2018).

Das adaptive Immunsystem zeichnet sich hingegen durch seine Spezifität aus und ist auch in der Lage auf, dem Organismus unbekannt, neue Erreger zu reagieren. Hierfür entscheidend sind die spezifischen T-Zellrezeptoren (TZR), B-Zellrezeptoren (BZR) respektive Antikörper als sezernierte Form des BZR. Sie bestehen jeweils aus leichten und schweren Ketten, die aus variablen (V) und konstanten (engl. ‚constant‘, C) Regionen zusammengesetzt werden. Die leichten Ketten bestimmen das spezifische Epitop zur Erkennung von Pathogenen, wohingegen die schweren Ketten bei BZR und Antikörpern die jeweilige Immunglobulinklasse bestimmen und bei TZR die Verankerung in der Plasmamembran gewährleisten. Die V-Regionen setzen sich aus einem V-Segment und einem J-Segment (engl. ‚joining‘), das die V- mit der C-Region kombiniert, zusammen. Die schwere Kette besitzt in ihrer V-Region zusätzlich zum V- und C- noch ein diversifizierendes Segment (D-Segment). Für jedes dieser Segmente existieren mehrere Kopien funktionsfähiger Gene, aus denen die variable Region variierend rekombiniert wird. Hierbei sorgt die junktionale Diversifizierung über das Einfügen oder Entfernen von Nukleotiden an Segmentverbindungsstellen für zusätzliche Variabilität (Murphy & Weaver, 2018). So sorgen VDJ-Rekombination und junktionale Diversifizierung für ein theoretisches Repertoire von ungefähr 10^{15} unterschiedlichen TZR- respektive BZR- und Antikörperkombinationen, um auch dem Körper unbekannt Pathogene erkennen zu können (Lythe, Callard, Hoare, & Molina-París, 2016; Nikolich-Zugich, Slifka, & Messaoudi, 2004).

3.2.1. CD8⁺ T-Zellen

Der Name von T-Zellen ist auf ihre Generierung im Thymus zurückzuführen. Grob unterteilt werden die T-Zellen in CD4⁺, informell auch T-Helferzellen genannt, CD8⁺, allgemein häufig als T-Killerzellen oder zytotoxische T-Zellen bezeichnet, und regulatorische T-Zellen. Die informelle Bezeichnung CD8⁺ T-Zellen geht auf deren Funktion im Körper zurück, die in der Abwehr virusinfizierter oder entarteter Zellen durch Zytolyse besteht (Murphy & Weaver, 2018).

Im Anschluss an die in Kapitel 3.2 beschriebene Generierung des TZR durchlaufen T-Zellen drei Selektionsschritte. Im ersten Schritt, der TZR β -Selektion, wird im Thymus überprüft, ob der TZR auf der T-Zelle präsentiert wird und sich die α - und die β -Kette des TZR korrekt zusammenlagern, sodass eine Signalweiterleitung gewährleistet wird. Der nächste Selektionsschritt ist die positive Selektion, bei der kontrolliert wird, ob der TZR von CD4⁺ T-

Zellen an Haupthistokompatibilitätskomplex-(engl. „major histocompatibility complex, MHC)-Klasse-2- respektive der von CD8⁺ T-Zellen an MHC-Klasse-1-Komplexe binden kann. In T-Zellen ohne funktionellen TZR wird der programmierte Zelltod, die Apoptose, initiiert. Abschließend erfolgt die negative Selektion bei der diejenigen T-Zellen verworfen werden, die mit ihrem TZR körpereigene Proteine erkennen, also autoimmun reagieren würden. Den aus dieser Selektion im Thymus hervorgehenden T-Zellsubtyp bezeichnet man bis zum Erkennen seines spezifischen Antigens als naiv (T_N) (Murphy & Weaver, 2018).

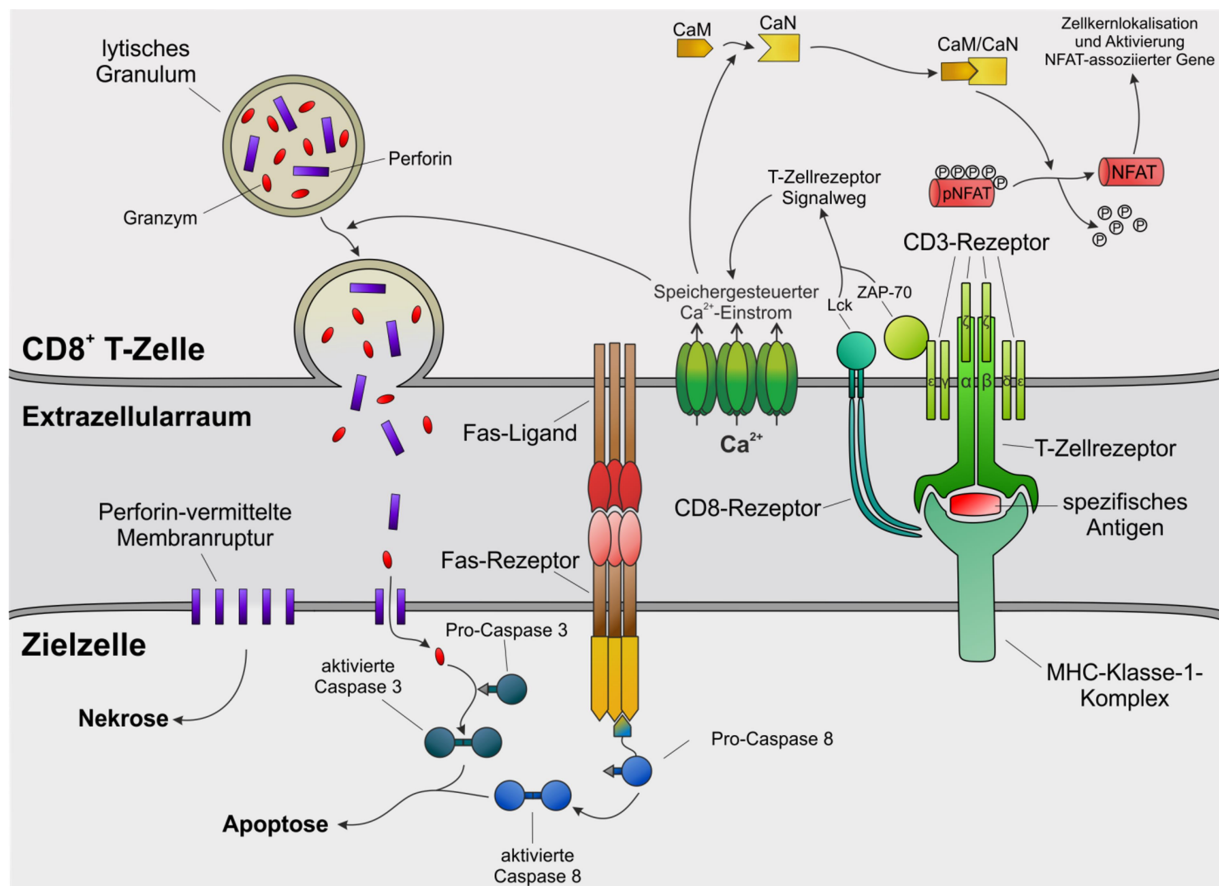


Abbildung 2: Immunologische Synapse zwischen CD8⁺ T-Zelle und Zielzelle. Erkennt eine CD8⁺ T-Zelle über ihren T-Zellrezeptor (TZR) ihr von der Zielzelle im MHC-Klasse-1-Komplex präsentiertes, spezifisches Antigen, wird eine immunologische Synapse zwischen beiden Zellen gebildet. Anschließend an die Antigenbindung wird über den CD3-Rezeptor ZAP-70 und über den CD8-Rezeptor Lck aktiviert. Diese beiden Proteine aktivieren den TZR-Signalweg, wodurch ein speichergesteuerter Ca²⁺-Einstrom in die T-Zelle ausgelöst wird. Durch das einströmende Ca²⁺ wird Calmodulin (CaM) aktiviert und bindet an Calcineurin (CaN). Das CaM/CaN-Holoenzym dephosphoryliert den Transkriptionsfaktor NFAT (engl. „nuclear factor of activated T cells“), wodurch NFAT in den Zellkern transloziert und die Expression assoziierter Gene, wie *IL-2* veranlasst. Weiterhin wird Ca²⁺ für die Exozytose lytischer Granula, einen zentralen Zytotoxizitätsmechanismus benötigt. Hierbei wird in den lytischen Granula enthaltenes Perforin und Granzym in den synaptischen Spalt sezerniert. Das Perforin kann zum einen Poren in der Zielzelloberfläche bilden, durch die Granzyme in die Zielzelle eintreten und über die Umwandlung von Pro-Caspase 3 zu aktivierter Caspase 3 Apoptose initiieren können. Zum anderen kann eine vermehrte Einlagerung von Perforin die Zielzelloberfläche rupturieren und zur Nekrose der Zielzelle führen. Einen weiteren Zytotoxizitätsmechanismus stellt die Fas-Ligand-vermittelte Aktivierung des Fas-Rezeptors auf der Zielzelloberfläche dar. Hierdurch wird über die Umwandlung von Pro-Caspase 8 zu aktivierter Caspase 8 ebenfalls die Apoptose der Zielzelle eingeleitet.

Erkennt eine CD8⁺ T-Zelle ihr von einer infizierten oder entarteten Zelle in MHC-Klasse-1-Komplexen präsentiertes spezifisches Antigen erfolgt die Aktivierung der TZR-Signalkaskade und die Ausbildung einer immunologischen Synapse (IS) zwischen Effektor- und Zielzelle

(Abbildung 2). Der TZR-Signalweg beginnt mit der Antigenbindung, durch die eine Konformationsänderung des TZR/CD3-Komplex verursacht wird. Die Signalweiterleitung erfolgt an den δ -, γ -, ϵ - und ζ -Ketten des CD3-Rezeptors, welche mit Immunrezeptor Tyrosin-basierten Aktivierungsmotiven (ITAM) ausgestattet sind. Diese ITAMs werden von der T-zellspezifischen Tyrosinkinase Lck (engl. ‚lymphocyte kinase‘), welche vom ebenfalls mit MHC-Klasse-1-Komplexen interagierenden CD8-Rezeptor rekrutiert und aktiviert wird, phosphoryliert. Die phosphorylierten ITAMs der CD3-Ketten dienen als Andockstelle für die ζ -kettenassoziierte Proteinkinase 70 (ZAP-70). Aktiviertes ZAP-70 phosphoryliert das Plasmamembranprotein ‚linker of activated T cells‘ (LAT), welches das TZR-Signal über Src-Homologie-2-Domänen an verschiedene Adapterproteine weitergibt. Hierzu zählt auch die Phospholipase C- γ 1 (PLC- γ 1), welche nach Aktivierung durch LAT membranständiges PIP₂ in IP₃ und DAG spaltet. Ersteres führt, wie in Kapitel 3.1.1. beschrieben, zur Initiation des SOCE. Letzteres trägt über eine Aktivierung der Proteinkinase C unter anderem zu einer Aktivierung des für die Funktionalität von Immunzellen wichtigen TF NF κ B (engl. ‚nuclear factor ‚kappa-light-chain-enhancer‘ of activated B cells) oder der zentralen Signalwege über mitogenaktivierte Proteinkinasen (MAPK) bei (Murphy & Weaver, 2018).

Der TZR-aktivierungsvermittelte Anstieg der $[Ca^{2+}]_{int}$ über STIM-aktivierte Orai-Kanäle ist für eine Vielzahl an Prozessen in T-Zellen unabdingbar (Trebak & Kinet, 2019). Die Bedeutung des Ca^{2+} -Einstroms durch Orai-Kanäle für die korrekte Funktionalität von T-Lymphozyten wird beispielsweise durch Patienten verdeutlicht, die aufgrund einer missense-Mutation im Gen für Orai1 an einem schweren, kombinierten Immundefekt leiden, der auf einer beeinträchtigten T-Zellaktivierung beruht (Feske et al., 2006; Feske, Picard, & Fischer, 2010; Feske, Prakriya, Rao, & Lewis, 2005). Ca^{2+} bindet im Zytosol von T-Zellen an Calmodulin und initiiert dadurch dessen Bindung an und die vollständige Aktivierung der durch den Ca^{2+} -Einstrom bereits teilaktivierten Phosphatase Calcineurin (Oh-Hora & Rao, 2008). Das so aktivierte Calcineurin dephosphoryliert unter anderem den TF NFAT (engl. ‚nuclear factor of activated t cells‘). Dadurch wird dessen Zellkernlokalisationssequenz freigelegt und die Expression NFAT-assoziiierter Gene, wie das für Interleukin-2 (IL-2) oder das für den, an der zytotoxischen Funktion von CD8⁺ T-Zellen beteiligten, Fas-Liganden (FasL), gewährleistet (Abbildung 2) (Jayanthi et al., 2005; Latinis, Norian, Eliason, & Koretzky, 1997; Oh-Hora, 2009). In murinen CD4⁺ T-Zellen wurde festgestellt, dass ein spezifischer STIM1-Knockout zu einer starken Reduktion des SOCE führt, wodurch eine verminderte NFAT-Translokation und dadurch eine reduzierte IL-2-Produktion verursacht wird (Oh-Hora et al., 2008). Der spezifische Knockout von STIM2 in murinen CD4⁺ T-Zellen führte dahingegen zu keiner Reduktion der Höhe des SOCE, aber zu einer Beeinträchtigung der Signalerhaltung, wodurch die IL-2-Produktion ebenfalls inhibiert wurde (Oh-Hora et al., 2008).

Neben der Regulation der Genexpression über TFs ist Ca^{2+} auch an der Steuerung von Effektorfunktionen von CD8^+ T-Zellen, wie der Exozytose lytischer Granula beteiligt (Abbildung 2) (Lyubchenko, Wurth, & Zweifach, 2001). Die Lyse von Zielzellen über die in diesen Granula enthaltenen Effektorproteine, Perforin und Granzym, ist einer der beiden Hauptzytotoxizitätsmechanismen von CD8^+ T-Zellen (Chávez-Galán, Arenas-Del Angel, Zenteno, Chávez, & Lascurain, 2009). Hierbei lagert sich Perforin im synaptischen Spalt in die Plasmamembran der Zielzelle ein und bildet Poren, durch die die Granzyme ins Zytosol der Zielzelle gelangen können. Dort verursachen sie über die Umwandlung von Pro-Caspase 3 zu Caspase 3 die Initiation der Apoptose (Abbildung 2) (Chávez-Galán et al., 2009). Weiterhin kann Perforin über eine gesteigerte Einlagerung in die Plasmamembran eine Membranruptur verursachen und dadurch eine Nekrose der Zielzelle bewirken (Abbildung 2) (Backes et al., 2018). Neben der Exozytose lytischer Granula können CD8^+ T-Zellen die Apoptose entarteter oder infizierter Zellen rezeptorvermittelt initiieren. Hierbei stellt die Interaktion des FasL der CD8^+ T-Zellen mit dem in der Plasmamembran der Zielzelle befindlichen Fas-Rezeptor (FasR) den bedeutendsten Zytotoxizitätsmechanismus dar. Der FasL-FasR-Signalweg führt über die Umwandlung von Pro-Caspase 8 zu aktivierter Caspase 8 ebenfalls zur Initiation der Apoptose (Abbildung 2) (Chávez-Galán et al., 2009).

Zudem erfolgt, nachdem der TZR von antigenunerfahrenen CD8^+ T_N aktiviert worden ist eine Differenzierung in verschiedene Effektor- und Gedächtnissubtypen. Diese Subtypen unterscheiden sich in ihren Genexpressionsmustern, Proliferationsraten, der Gewebeverteilung sowie der Effizienz ihrer Effektorfunktion (Geginat, Lanzavecchia, & Sallusto, 2003; Monteiro, Evaristo, Legrand, Nicoletti, & Rocha, 2007; Willinger, Freeman, Hasegawa, McMichael, & Callan, 2005). Hierbei findet man CD8^+ T-Effektorzellen (T_E) und T-Effektor-Gedächtniszellen (engl. ‚effector memory T cells‘, T_{EM}) eher in der Peripherie, wohingegen CD8^+ T_N und zentrale Gedächtnis-T-Zellen (engl. ‚central memory T cells‘, T_{CM}) eher in lymphatischen Geweben verweilen (Mahnke, Brodie, Sallusto, Roederer, & Lugli, 2013). T_N sind nicht in der Lage, Zielzellen effizient abzutöten. Erst ausdifferenzierte CD8^+ Effektor- und in geringerem Maße auch Gedächtnis-T-Zellen verfügen über das nötige molekulare Repertoire (Mahnke et al., 2013; Monteiro et al., 2007).

3.2.2. Altersbedingte Veränderungen des Immunsystems

Als Altern wird im Kontext des menschlichen Organismus der fortschreitende Prozess verstanden, welcher durch Abnahme zellulärer Funktionen über Organversagen zum Tod des Individuums führt (Rose, 1991). Auch die Funktionalität des Immunsystems nimmt mit voranschreitendem Alter ab (Hodes, 1997; Weiskopf, Weinberger, & Grubeck-Loebenstein, 2009). Sowohl Komponenten des angeborenen als auch des adaptiven Immunsystems sind von dieser Immunoseneszenz betroffen (Hodes, 1997; Weiskopf et al., 2009). Charakteristische Alterserscheinungen des angeborenen Immunsystems sind beispielsweise

Defekte in der Phagozytose apoptotischer Zellen oder pathogener Mikroorganismen durch Makrophagen, in der Antigenpräsentation und Aktivierung von T-Zellen durch antigenpräsentierende Zellen (engl. ‚antigen presenting cell‘, APC) oder in der Hyperoxidproduktion neutrophiler Granulozyten (Solana, Pawelec, & Tarazona, 2006; Weiskopf et al., 2009). Die bedeutendste Immunoseneszenzerscheinung des adaptiven Immunsystems stellt die Involution des Thymus dar. Hierbei bildet sich das Gewebe des, für die Produktion neuer T-Zellen verantwortlichen Organs ab dem ersten Lebensjahr fortwährend zurück, wodurch die Produktion von T_N zunehmend reduziert wird (Palmer, 2013). Schon vor der Reifung im Thymus kommt es bereits zu einem altersbedingten Rückgang hämatopoetischer Stammzellen (engl. ‚hematopoietic stem cell‘, HSC), der Vorläuferzellen aller Blutzellen und damit auch von T-Lymphozyten (Brunnahan et al., 2010). Dieser wird zudem verstärkt durch eine Verschiebung der HSCs von lymphoiden zu myeloiden Progenitorzellen im Alter (Rossi et al., 2005). Hierdurch wird die Verteilung der $CD8^+$ T-Zellsubtypen zu weniger T_N und mehr Gedächtnis-T-Zellen zusätzlich begünstigt. Die Veränderung der Subtypenverteilung von $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellen von weniger T_N zu mehr Gedächtnis-T-Zellsubtypen stellt ein zentrales Motiv der Immunoseneszenz dar (Grossmann, Maggio-Price, Jinneman, & Rabinovitch, 1991; Pinchuk & Filipov, 2008; Quinn et al., 2018). Neben weiteren extrinsischen Faktoren, wie der erwähnten beeinträchtigten Aktivierung durch APCs, der chronischen Stimulation von $CD8^+$ T-Zellen durch persistierende Viren, wie dem Cytomegalie- oder dem Epstein-Barr-Virus, oder einem dauerhaften inflammatorischen Milieu weisen T-Zellen auch intrinsische altersbedingte Defekte auf (Nikolich-Žugich, 2014; Nikolich-Žugich, Li, Uhrlaub, Renkema, & Smithey, 2012). Hierzu zählen unter anderem Ca^{2+} -Signalreduktionen (Grossmann et al., 1991), verminderte Proliferationsraten (Jiang, Gross, Elbaum, & Murasko, 2007), die durch die Expansion in der Peripherie verursachte Verkürzung der Telomere, die eine weitere Replikation unterbindet (Antonio Moro-Garcia, Alonso-Arias, & Lopez-Larrea, 2012), oder die reduzierte Expression von IL-2 (Beattie, Devine, Grynoch, Toth, & Bleackley, 1990). Vor dem Hintergrund einer steigenden Lebenserwartung in der Bevölkerung ist diese altersbedingte Abschwächung von Immunfunktionen denkbar problematisch. Die durch die Immunoseneszenz bedingten Beeinträchtigungen von $CD8^+$ T-Zellen überschneiden sich beispielsweise mit einer Zunahme an durch entartete Zellen ausgelösten Krebserkrankungen mit voranschreitendem Alter (Fulop et al., 2013; Quinn et al., 2018; White et al., 2014). Auch bei viralen Infekten sind $CD8^+$ T-Zellen älterer Individuen nicht mehr im Stande, wirkungsvoll auf neue Keime, wie das jährlich mutierende Influenzavirus oder das 2019 erstmals aufgetretene SARS-CoV-2 zu reagieren, was zu einer altersbedingt gesteigerten Mortalität führt (Leng & Goldstein, 2010; Nikolich-Zugich et al., 2020; To et al., 2020).

3.2.3. Zielsetzung

CD8⁺ T-Zellen schützen den Körper über Zytotoxizitätsmechanismen spezifisch vor viralen Infekten und Krebserkrankungen (Murphy & Weaver, 2018). Da Ca²⁺-Signale unter anderem für die Proliferation, Apoptose, Genexpression, Motilität und Sekretion lytischer Granula benötigt werden, ist eine fein abgestimmte Regulierung der Ca²⁺-Homöostase für die Funktion von CD8⁺ T-Zellen unerlässlich (Feske, Skolnik, & Prakriya, 2012; Trebak & Kinet, 2019). Im Alter ist bei CD8⁺ T-Zellen sowohl die Generierung von Ca²⁺-Signalen (Grossmann et al., 1991) als auch die Funktionalität abgeschwächt (Brien, Uhrlaub, Hirsch, Wiley, & Nikolich-Žugich, 2009). Da der Nachweis der altersbedingt verminderten Ca²⁺-Signale allerdings vor der Entdeckung der Funktion der Schlüsselproteine für den Haupteintrittsweg von Ca²⁺ in diesen Zelltyp erfolgte, wurde ein Zusammenhang zwischen den Ca²⁺-Signalreduktionen, dem STIM- und Orai-vermittelten Ca²⁺-Einstrom und möglichen Veränderungen in der Expression dieser Proteine bislang nicht untersucht. Ob die Zytotoxizität von CD8⁺ T-Zellen per se im Alter nachlässt oder diese Beobachtung extrinsischen Faktoren, wie beispielsweise der verminderten Aktivierung durch professionelle APCs, zugrunde liegt, ist bislang ebenfalls noch nicht ausreichend ergründet und wird in der Literatur kontrovers diskutiert.

Das erste Ziel dieser Arbeit ist die Untersuchung des Zusammenhangs zwischen altersbedingten Ca²⁺-Signalreduktionen und potenziellen Veränderungen im Haupteintrittsweg von Ca²⁺ in CD8⁺ T-Zellen anhand eines Mausmodells. Hierfür muss zunächst die Isolation und Stimulation von CD8⁺ T-Zellen aus der murinen Milz in der Arbeitsgruppe etabliert werden. Anschließend werden die Ca²⁺-Signale unstimulierter und stimulierter CD8⁺ T-Zellen junger und alter Mäuse mittels geeigneten Ca²⁺-Imagingprotokollen vermessen. Mittels quantitativer Echtzeitpolymerasekettenreaktion (engl. ‚quantitative real-time polymerase chainreaction‘, qRT-PCR) und Western Blot werden die Expressionen der Schlüsselproteine des Ca²⁺-Einstroms in CD8⁺ T-Zellen, STIM und Orai, quantifiziert. Auch der, in CD8⁺ T-Zellen hauptsächlich über PMCA-s stattfindende, Ca²⁺-Ausstrom soll analysiert und altersbedingte Veränderungen der PMCA-Expression mittels qRT-PCR bestimmt werden.

Das zweite Ziel der Arbeit ist die Ergründung der Frage, ob CD8⁺ T-Zellen im Alter per se in ihrer Hauptfunktion, der Lyse von Zielzellen, gestört sind. Hierfür wird ein, in der Arbeitsgruppe für humane CD8⁺ T-Zellen etablierter, *in vitro* Echtzeitzytotoxizitätsassay für die Untersuchung muriner CD8⁺ T-Zellen abgeändert. Weiterhin werden für die Zielzelllyse relevante Proteine für stimulierte CD8⁺ T-Zellen aus jungen und alten Mäusen quantifiziert. Abschließend wird der Einfluss variierender [Ca²⁺]_{ext} auf die Effizienz der CD8⁺ T-zellvermittelten Zytotoxizität und altersbedingte Differenzen untersucht.

Für beide Ziele wird anhand gesorteter CD8⁺ T-Zellsubtypen überprüft, ob die altersbedingten Unterschiede bei Ca²⁺-Signalen oder der Zytotoxizität anteilig auf die charakteristischen Veränderungen der CD8⁺ T-Zellsubtypenverteilung im Alter zurückzuführen sind. Hierfür muss die durchflusszytometrische Untersuchung und das Sortieren von CD8⁺ T-Zellsubtypen etabliert werden.

4. Material und Methoden

4.1. Material

4.1.1. Reagenzien

Reagenz	Hersteller	Bestellnummer
2-Propanol	Sigma	I9516
AIM V™ Medium	Gibco™	12055083
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Sigma	A3678
β-Mercaptoethanol (β-ME)	Acros Organics	125472500
Bromphenolblau	Eurobio	018069
Bovines Serumalbumin (BSA)	Sigma	A9418
Proteinstandard BSA	Sigma-Aldrich	P0914
Calcein-AM	Invitrogen™	C3100MP
Clarity™ Western Elektrochemilumineszenz	Bio-Rad	1705060
cOmplete™ ULTRA Tabletten	Roche	05892791001
Concanamycin A (CMA)	Santa Cruz Biotechnology	SC-202111A
Cyclosporin A (CsA)	Tocris Bioscience™	13428493
Diethyldicarbonat (DEPC)	Thermo Scientific™	AM9916
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma	D4540
Dithiothreitol (DTT)	Roche	11583786001
Desoxynukleosidtriphosphate (dNTP)	Sigma-Aldrich	DNTP10-1KT
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Sigma-Aldrich	E9884
Ethanol	Zentrales Chemikalienlager	702543
Fetal Calf Serum (FCS)	Gibco™	10270106
Fura 2-AM	Invitrogen™	F1221
Glycin	Sigma	G7126
Glykogen	Invitrogen	10757844
Geneticin (G418)	MilliporeSigma	345810-M
humanes Interleukin-2 (hIL-2)	Gibco™	PHC0023
Hydroxyethylpiperazinylethansulfonsäure (HEPES)	Sigma	H-7523
KHCO ₃	Sigma-Aldrich	237205
Methanol	Zentrales Chemikalienlager	701227
NaCl	EMD Millipore	S9888-M
Natriumazid (NaN ₃)	Sigma-Aldrich	S8032
NaOH	J.T. Baker	0168
Natriumdodecylsulfat (SDS)	VWR Chemicals	444464T
NH ₄ Cl	Sigma	A9434
Nonidet P40 Substitute	Sigma	74385
Oligodesoxythymidin (Oligo-dT)	Sigma-Aldrich	O4387-.1ML
Phosphate-buffered saline (PBS)	Gibco™	14190-094

Penicillin-Streptomycin (Pen/Strep)	Sigma	P4333
Poly-L-Ornithin	Cell Systems	5172-5MG
RPML-1640 Medium	Fisher Scientific	21879-034
SuperScript™ II Reverse Transkriptase	Invitrogen™	18064-071
SYBR Green	Quantitect	204145
N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Sigma	T9281
Rotiphorese® Gel 40	Roth	A515.1
Sucofin® Magermilchpulver	TSI GmbH & Co	keine
Thapsigargin (TG)	Invitrogen™	T7458
Tris	Roche	10812846001
Triton X-100	Eurobio	018774
Tris-Base	Sigma	T1503
Tris-HCl	Sigma-Aldrich	T5941-1KG
TRIzol™	Invitrogen™	15596018
Tween® 20	Sigma-Aldrich	P1379

Tabelle 1: Liste der verwendeten Reagenzien

4.1.2. Kits

Kit	Hersteller	Bestellnummer
Dynabeads™ Untouched™ Mouse CD8 Cells	Fisher Scientific	11417D
Dynabeads™ Mouse T-Activator CD3/CD28	Fisher Scientific	11456D
Pierce BCA Protein Assay	Fisher Scientific	23225

Tabelle 2: Liste der verwendeten Kits

4.1.3. Antikörper

4.1.3.1. FACS

Antigen	Fluorophor	Hersteller	Bestellnummer	Volumen in 100 µl
CD3ε	PerCP	Biolegend	100326	2,5 µl
CD4	Pacific Blue	Biolegend	100531	1 µl
CD8	FITC	Biolegend	100706	2 µl
CD44	PE	Biolegend	103024	3 µl
CD62L	APC	Biolegend	104412	2,5 µl

Tabelle 3: Liste der fluorophorgekoppelten FACS-Antikörper

4.1.3.2. Primärantikörper für Western Blot

Antigen	Klonalität	Herkunft	Hersteller	Bestellnummer	Verdünnung
Orai1	polyklonal	Rabbit	Proteintech	13130-1-AP	1:500
STIM1	polyklonal	Rabbit	Proteintech	11565-1-AP	1:1000
STIM2	polyklonal	Rabbit	Proteintech	21192-1-AP	1:750
FasL	polyklonal	Rabbit	Invitrogen™	PA5-16746	1:100
Perforin	polyklonal	Rabbit	Invitrogen™	PA5-17431	1:1000
Granzym B	polyklonal	Rabbit	Cell Signaling	#4275S	1:2000
GAPDH	monoklonal	Rabbit	Cell Signaling	#2118S	1:2000

Tabelle 4: Liste der in Western Blots verwendeten Primärantikörper

4.1.3.3. Sekundärantikörper für Western Blot

Reaktivität	Konjugation	Herkunft	Hersteller	Bestellnummer	Verdünnung
Rabbit	HRP	Donkey	Amersham	9784574	1:25000

Tabelle 5: In Western Blots verwendeter Sekundärantikörper

4.1.3.4. Echtzeitzytotoxizitätsassays

Antigen	Hersteller	Bestellnummer	Volumen in 50 µl
CD3ε	Biologend	100331	0,5 µl
CD178 (FasL)	Biologend	106608	2,5 µl

Tabelle 6: Liste der in Echtzeitzytotoxizitätsassays verwendeten Antikörper

4.1.4. qRT-PCR-Primer

Sämtliche qRT-PCR-Primer wurden von QIAGEN N.V. erworben.

Gen	Produkt	Bestellnummer
Orai1	Mm_Orai1_1_SG	QT00285775
Orai2	Mm_Orai2_1_SG	QT00304738
Orai3	Mm_Orai3_1_SG	QT00255598
STIM1	Mm_Stim1_1_SG	QT00105119
STIM2	Mm_Stim2_1_SG	QT00289009
PMCA1	Mm_Atp2b1_1_SG	QT01072106
PMCA4	Mm_Atp2b4_2_SG	QT01076271
FasL	Mm_Tnfsf6_1_SG	QT00104125
Perforin	Mm_Prfl1_1_SG	QT00282002
Granzym A	Mm_Gzma_1_SG	QT00100667
Granzym B	Mm_Gzmb_1_SG	QT00114590
HPRT1	Mm_Hprt_1_SG	QT00166768
TBP	Mm_Tbp_1_SG	QT00198443

Tabelle 7: Liste der verwendeten QIAGEN qRT-PCR-Primer

4.1.5. Lösungen

4.1.5.1. Ringerlösungen

	0 mM Ca ²⁺	0,5 mM Ca ²⁺	2 mM Ca ²⁺
CaCl ₂ (mM)	0	0,5	2
MgCl ₂ (mM)	2	2	2
NaCl (mM)	145	145	145
KCl (mM)	4	4	4
HEPES (mM)	10	10	10
Glucose (mM)	10	10	10
EGTA (mM)	1	0	0
Osmolarität (mosm)	~310	~310	~310
pH	7,4	7,4	7,4

Tabelle 8: Liste der fürs Ca²⁺-Imaging verwendeten Ringerlösungen

4.1.5.2. Lösungen für Patch-Clamp

Pipettenintern	Extrazellulär
0 mM CaCl ₂	10 mM CaCl ₂
3 mM MgCl ₂	2 mM MgCl ₂
120 mM Cs-Glutamat	120 mM NaCl
10 mM HEPES	2,8 mM KCl
10 mM Cs-BAPTA	10 mM CsCl
0,02 mM IP ₃	10 mM HEPES
	10 mM Glucose
Osmolarität: 298 mosm	Osmolarität: 305 mosm
pH 7,2	pH 7,2

Tabelle 9: Liste der fürs Whole-Cell-Patch-Clamp verwendeten internen und externen Lösungen

4.1.5.3. Western Blot

10-faches TBS

500 mM Tris-Base

1,5 M NaCl

pH 7,5

1-faches TBST

0,1 % Tween® 20

1-faches TBS

RIPA-Lysepuffer

10 mM Tris

1 % Triton X-100

0,5 % Nonidet P40 Substitute

150 mM NaCl

PBS

pH 7,4

Sammelgel 4 %

0,5 ml 40 % Acrylamid
3,21 ml H₂O
1,25 ml 4-facher Sammelgelpuffer
37,5 µl 10 % APS
7,5 µl TEMED

4-facher Sammelgelpuffer

0,5 M Tris-HCl
0,4 % SDS
destilliertes H₂O
pH 6,8

Trenngel 7 %

1,75 ml 40 % Acrylamid
5,66 ml H₂O
2,5 ml 4-facher Trenngelpuffer
75 µl 10 % APS
15 µl TEMED

4-facher Trenngelpuffer

0,5 M Tris-Base
0,4 % SDS
destilliertes H₂O
pH 8,8

10-facher SDS-Elektrophoresepuffer

250 mM Tris-Base
1,92 M Glycin
1 % SDS
pH 8,3

Blottingpuffer

20 % Methanol
1 % SDS

Blockingpuffer

2,25 g Magermilchpulver

50 ml 1-faches TBST

5-facher Laemmli-puffer

2,5 % SDS

125 mM Tris

0,01 % Bromphenolblau

60 % Glycerin

6,3 % β -Mercaptoethanol

destilliertes H₂O

Primärantikörperlösung

Antikörper aus Tabelle 4 in angegebener Verdünnung

1 % BSA

0,02 % NaN₃

Sekundärantikörperlösung

Antikörper aus Tabelle 5 in angegebener Verdünnung

5 % Magermilch in TBST

4.1.5.4. Weitere

Isolationspuffer

PBS

0.5 % BSA

2 mM EDTA

Erythrozytenlyselösung

155 mM NH₄Cl

9,99 mM KHCO₃

130 μ M EDTA

pH 7,3

FACS-Puffer

PBS

0.5 % BSA

4.1.6. Geräte

Gerät	Bezeichnung	Hersteller
Biophotometer	BioPhotometer® D30	Eppendorf
Ca ²⁺ -Imaging-Setup	Observer.A1 Mikroskop	Zeiss
	Fura2 HC Filtersatz	Semrock
	SPOT Pursuit CCD-Kamera	SPOT
	VisiChrome Polychromator	Visitron
Cycler für qRT-PCR	Mastercycler Personal	Eppendorf
	Real Time System CFX96/	Biorad
	Thermal Cycler C1000	
Durchflusszytometer	FACSVerse™	BD
	FACSAriaIII™	BD
Heizblock	Thriller	PeQlab
Magnetständer	DynaMag™ -15	Invitrogen™
	DynaMag™ -50	Invitrogen™
Patch-Clamp-Setup	Observer.A1 Mikroskop	Zeiss
	DCM130E Kamera	ScopePhoto
	MP-285 Micromanipulator	Sutter Instrument
	P-1000 Micropipette Puller	Sutter Instrument
Plattenlesegeräte	Tecan Genios Pro	Tecan
	M200	Tecan
Schüttel-/Drehgeräte	Teleshake 4	Variomag
	Thermomixer Univortemp	Universal Labortechnik
	Duomax 1030	Heidolph
	HulaMixer	Life Technologies
	REAX 2	Heidolph
Ultraschallgerät	Model 120 Sonic Dismembrator	Fisherbrand™
Vortexer	Vortex Genie 2	Scientific Industries
	MS 3 basic	IKA
Western Blot	Kammer	Amersham
	ChemiDoc™ XRS + System	Bio Rad
Zellzählgerät	Z2	Beckman Coulter
Zentrifugen	Zentrifuge 5418	Eppendorf
	Mikro 220R	Hettich
	Zentrifuge 5810R	Eppendorf

Tabelle 10: Liste verwendeter Geräte

4.1.7. Mäuse

Als Mauslinie werden C57BL6/J verwendet. Hierbei handelt es sich um den wahrscheinlich meistgenutzten Inzuchtmausstamm in der Grundlagenforschung. C57BL-Mäuse sind auf die Kreuzung einer weiblichen 57 mit einer männlichen 52 Maus aus Abbie Lathrops Mausbestand durch C. C. Little im Jahr 1921 zurückzuführen (Song & Hwang, 2017). Aus diesen C57BL-Mäusen wurden durch weitere Inzuchtzüchtung bis 1937 die C57BL/6, der Unterstamm 6 der C57BL-Maus, generiert. 1948 wurden diese C57BL/6 an die Jackson Laboratories zur Haltung übergeben (Song & Hwang, 2017). Das endständige „J“ der C57BL6/J steht entsprechend für die Jackson Laboratories. Diese Mauslinie wird häufig für immunologische und onkologische Fragestellungen verwendet (Johnson, 2012). Weitere Vorteile dieser Linie sind, dass viele transgene Mauslinien auf dem Hintergrund der Wildtyp C57BL6/J beruhen und das Genom des Wildtyps komplett sequenziert wurde (Waterston et al., 2002).

Für dieses Projekt wurden C57BL6/J-Mäuse in zwei Altersgruppen verwendet, um altersbedingte Unterschiede bei CD8⁺ T-Lymphozyten untersuchen zu können. Die Gruppe junger erwachsener Mäuse wurde in einem Alter von 12 bis 24 Wochen verwendet, die der älteren von 78 bis 102 Wochen. Die Mäuse wurden artgerecht nach §1 der Tierschutzversuchstierverordnung im Tierstall des Centers for Integrative Physiology and Molecular Medicine der Universität des Saarlandes gehalten. Es erfolgte eine Tötung mittels zervikaler Dislokation zum Zweck der Organentnahme in Übereinstimmung mit dem deutschen Tierschutzgesetz nach § 4.

4.1.8. Zelllinien

4.1.8.1. P815

Die murine Mastrozytomzelllinie P815 stammt aus einer männlichen DBA/2-Maus, die zuvor mit Methylcholanthren behandelt wurde, um einen Mastrozytomtumor zu induzieren. Die Verwendung von P815-Zellen als experimentelles Tumormodell ist gut etabliert (Gajewski, Markiewicz, & Uyttenhove, 2001). In dieser Arbeit dienen P815-Zellen als Zielzellen für Echtzeitzytotoxizitätsassays. Bis zu ihrer Verwendung werden sie in RPMI-1640 Medium mit 10 % FCS und 1 % Pen/Strep bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert.

4.1.8.2. EL-4

Die murine Lymphomzelllinie EL-4 stammt aus einer 7,12-Dimethylbenzoanthracen behandelten C57BL6-Maus und wird häufig für Apoptosestudien verwendet (Jessel, Haertel, Socaciu, Tykhonova, & Diehl, 2002; Saleh et al., 2003). Auch in dieser Arbeit werden EL-4-Zellen als Zielzellen für Echtzeitzytotoxizitätsassays genutzt. Bis zu ihrer Verwendung

werden sie in RPMI-1640 Medium mit 10 % FCS und 1 % Pen/Strep bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert.

4.1.8.3. E.G7

E.G7-Zellen sind von EL-4-Zellen abgeleitet. Der Hauptunterschied zwischen beiden Zelllinien liegt in der stabilen Transfektion des Plasmids pAc-neo-OVA, auf dem das Gen für Hühnereiweiß, Ovalbumin sowie eine Neomycinresistenzkassette gespeichert sind, in E.G7-Zellen (Moore, Carbone, & Bevan, 1988). Üblicherweise wird die E.G7-Zelllinie benutzt, um Effekte einer spezifischen TZR-Aktivierung bei transgenen Ovalbumin-TZR-1-Mäusen (OT-1-Mäuse) zu untersuchen. Dieser Mausstamm verfügt über CD8⁺ T-Zellen mit einem TZR, der eine bestimmte Peptidsequenz des Ovalbumins spezifisch binden kann, die von E.G7 aufgrund ihrer Transfektion in MHC-Klasse-1-Komplexen präsentiert wird (Hogquist et al., 1994; Kelly et al., 1993). Wie alle anderen aufgeführten Zelllinien wurden E.G7-Zellen allerdings unspezifisch mit einem anti-CD3-Antikörper für die Zytolyse durch CD8⁺ T-Zellen markiert und in Echtzeitzytotoxizitätsassays verwendet. Die E.G7-Zellen wurden vom Institut de Recherche et d'Innovation Biomédicale der Université de Rouen Normandie zur Verfügung gestellt. Bis zu ihrer Verwendung werden sie in RPMI-1640 Medium mit 10 % FCS und 1 % Pen/Strep bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert. Weiterhin wird dem Medium, um die stabile Transfektion aufrechtzuerhalten, als Selektionsdruck 0,4 mg/ml G418 hinzugefügt.

4.1.8.4. YAC-1

Die murine Lymphomzelllinie YAC-1 entstammt einer A/Sn-Maus, die mit dem Retrovirus Maus-Leukämie-Virus inokuliert wurde und wird allem voran als Zielzelllinie für natürliche Killerzellen (NK) verwendet (Cikes, Friberg, & Klein, 1973; Li, Wu, Wang, & Zhang, 2019). In dieser Arbeit werden YAC-1-Zellen allerdings als Zielzellen für Echtzeitzytotoxizitätsassays mit CD8⁺ T-Zellen genutzt. Bis zu ihrer Verwendung werden sie in RPMI-1640 Medium mit 10 % FCS und 1 % Pen/Strep bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert.

4.2. Methoden

4.2.1. Milzpräparation und Splenozytenisolation

Da die Milz als sekundäres lymphatisches Organ unter anderem für die Vermehrung von Leukozyten essentiell ist, bietet es sich für die Isolation von CD8⁺ T-Zellen an, hierfür eine Milzentnahme nach Tötung der Maus durchzuführen und die, auch Splenozyten genannten, Milzzellen zu gewinnen. Im Gegensatz zur Gewinnung mononukleärer Zellen aus dem peripheren Blut, wie sie vorwiegend für humane CD8⁺ T-Zellen betrieben wird, bietet die Milz der Maus eine höhere Anzahl an CD8⁺ T-Zellen, um ausreichend Zellen für Experimente erhalten zu können.

Nachdem die Mäuse mittels zervikaler Dislokation getötet worden sind, wird ihnen der Bauchraum eröffnet und die Milz entfernt. Um die bindegewebige Milzkapsel zu unterbrechen und das Lösen der Zellen aus der Milz besser gewährleisten zu können, wird die Milz mit einer Schere in kleine Stücke zerteilt. Diese werden in einen Zellenfilter (Corning®) mit einem Maschendurchmesser von 70 µm gegeben und mit dem Kolben einer 2 ml Injekt® Einmalspritze (B. Braun) zum Vereinzeln der Splenozyten durch die Maschen gerieben. Anschließend werden die Splenozyten in 50 ml 4 °C kaltem Isolationspuffer aufgenommen und bei 240 g und 4 °C für 8 min zentrifugiert. In einem nächsten Schritt wird das Zellpellet nach Verwerfen des Überstands für eine Minute in 2 ml Erythrozytenlyselösung resuspendiert und für eine weitere Minute inkubiert. Hierdurch werden die Erythrozyten über osmotische Hämolyse unterminiert. Um die Lymphozyten des Milzzellgemisches zu erhalten wird die Reaktion mit der Zugabe von 23 ml 4 °C kaltem Isolationspuffer gestoppt. Hiernach erfolgt ein weiterer Zentrifugationsschritt bei 240 g und 4 °C für 8 min. Nach Verwerfen des Überstandes werden 10×10^7 Splenozyten für die Isolation von CD8⁺ T-Zellen verwendet.

4.2.2. CD8⁺ T-Zellisolation

Die in dieser Arbeit verwendeten murinen CD8⁺ T-Zellen wurden mittels des Dynabeads™ Untouched™ Mouse CD8 Cells Kit (Invitrogen™) isoliert. Bei dieser Negativisolation werden IgG-(Immunglobulin G)-Antikörper aus der Ratte gegen alle Splenozyten, mit Ausnahme der CD8⁺ T-Zellen, verwendet. Der Antikörpermix enthält Antikörper gegen CD4⁺ T-Zellen, B-Zellen, NKs, Monozyten und Makrophagen, DCs, Erythrozyten und Granulozyten. Diese Antikörper werden von anti-Ratten-IgG-Antikörpern aus dem Schaf gebunden, die wiederum an magnetische Beads gekoppelt sind. Durch diese Bindung aller Splenozyten, mit Ausnahme der CD8⁺ T-Zellen, an magnetische Beads, lassen sich die CD8⁺ T-Zellen nach Positionieren des Zellgemisches in einen Magneten aus dem Überstand extrahieren. Im Gegensatz zur Positivisolation, bei der die CD8⁺ T-Zellen an Beads gebunden und so aus dem Zellgemisch entnommen werden, bietet die Negativisolation den Vorteil, dass die Zellen

von Interesse ungebunden bleiben, weswegen die Negativ- auch häufig als untouched (engl. ‚unberührt‘) Isolation bezeichnet wird.

Die 10×10^7 Splenozyten aus der Splenozytenisolation werden in 1 ml 4 °C kaltem Isolationspuffer resuspendiert. Nach Zugabe von 200 µl FCS und 200 µl des Antikörpermix werden die Splenozyten für 20 min bei 4 °C auf einem Rotator inkubiert. Im Anschluss wird das Zell-Antikörpergemisch mit 20 ml 4 °C kaltem Isolationspuffer verdünnt und für 8 min bei 240 g und 4 °C zentrifugiert. Während der Zentrifugation werden 2 ml der Isolationsbeads in einem 15 ml Falcon im DynaMag™-15 Magnet (Invitrogen™) mit 2 ml 4 °C kaltem Isolationspuffer gewaschen und nachfolgend in weiteren 2 ml 4 °C kaltem Isolationspuffer aufgenommen. Nach der Zentrifugation wird der Überstand verworfen und das Zellpellet in 8 ml Isolationspuffer resuspendiert und zu den gewaschenen Beads gegeben. Das Splenozyten-Bead-Gemisch wird dann für 15 min bei Raumtemperatur (RT) auf einem Rotator inkubiert und anschließend für 2 min in den oben genannten Magnetständer platziert. Der Überstand, mit den enthaltenen CD8⁺ Zellen, wird in ein neues 15 ml Falcon überführt. Um eine hohe Ausbeute zu gewährleisten, werden die Beads dreimal mit je 1 ml Isolationspuffer gewaschen. Damit möglichst alle Bead-gebundenen Zellen aus dem Überstand entfernt werden, wird das CD8⁺ T-Zellgemisch erneut für 2 min in den Magnetständer gestellt und der Überstand in ein neues Falcon überführt. Hiernach werden die Zellen mittels Z2-Zellzähler (Beckman Coulter) gezählt. Nach erneuter Zentrifugation für 8 min bei 240 g und RT wird der Überstand verworfen. Für stimulierte CD8⁺ T-Zellen wird das Pellet in AIM V + 10 % FCS + 100 U/ml humanes IL-2 + 50 µM β-ME aufgenommen. Für 1×10^6 Zellen werden hier als Stimulanz $0,8 \times 10^6$ Dynabeads™ Mouse T-Activator CD3/CD28 for T-Cell Expansion and Activation (Gibco™) hinzupipettiert. Diese anti-CD3-/anti-CD28-Antikörper-gekoppelten Stimulationsbeads aktivieren T-Zellen über Aktivierung des CD3/TZR-Komplex. Die Zellen werden anschließend in einer Konzentration von 1×10^6 Zellen/ml in eine 24-Wellplatte mit einem Volumen von 1 ml/Well ausgesät und für mindestens drei Tage im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂ stimuliert. Vor der Verwendung der Zellen in Experimenten werden die Stimulationsbeads mittels eines Magneten von den Zellen getrennt. Für unstimulierte CD8⁺ T-Zellen werden keine Stimulationsbeads hinzupipettiert und die Zellen, nachdem sie sich bei 37 °C und 5 % CO₂ in AIM V + 10 % FCS + 100 U/ml humanem IL-2 + 50 µM β-ME von dem Stress der Isolation erholen konnten, direkt verwendet.

4.2.3. Quantitative Echtzeitpolymerasekettenreaktion

Die quantitative Echtzeitpolymerasekettenreaktion (engl. ‚quantitative real-time polymerase chain reaction‘, qRT-PCR) wird zur Bestimmung der messenger RNA-(mRNA)-Levels der Orais und STIMs sowie von FasL, Perforin und den Granzymen A und B verwendet. Hierbei wird die mRNA durch eine reverse Transkriptase in komplementäre DNA (engl.

complementary DNA', cDNA) umgeschrieben. Die Quantifizierung der cDNA erfolgt über den DNA-interkalierenden Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green. Die proportional zur Menge des DNA-Produkts zunehmende Fluoreszenz wird nach jeder Elongationsphase gemessen. Die Quantifizierung des DNA-Produktes erfolgt dann in der exponentiellen Phase der qRT-PCR. Das Gerät errechnet den Cq-Wert (cycle threshold), der angibt, wann die Fluoreszenzintensität in der Probe über einen bestimmten Schwellenwert steigt. Die Cq-Werte der in Tabelle 7 aufgeführten Gene wurden auf die Referenzgene Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase 1 (HPRT1) und das TATA Box bindende Protein (TBP), normalisiert.

4.2.3.1. RNA-Isolation

Vor der RNA-Isolation werden mindestens 3×10^6 unstimulierte respektive $1,5 \times 10^6$ stimulierte CD8⁺ T-Zellen für 8 min bei 240 g und RT zentrifugiert. Anschließend wird der Überstand verworfen, das Zellpellet in 800 µl TRIzol™ resuspendiert und die Zellen bis zur weiteren Verwendung in einem Eppendorfgefäß bei -80 °C gelagert.

Nach dem Auftauen werden zu den in TRIzol™ gelösten CD8⁺ T-Zellen 200 µl Chloroform hinzupipettiert und für 15 min bei 4 °C und 12.000g zentrifugiert. Die in der wässrigen Phase des Überstandes befindliche RNA wird anschließend in ein frisches Gefäß überführt. Zur Steigerung des RNA-Ertrags werden 0,5 µg Glykogen zur Zellsuspension hinzugegeben. Durch die Zugabe von 1 ml 2-Propanol wird die RNA für 10 min präzipitiert und im Anschluss für 10 min bei 4 °C und 12.000g zentrifugiert. Die im Pellet befindliche RNA wird mit 1 ml 75 % Ethanol/25 % DEPC-behandeltem Wasser gewaschen. Um die gewaschene RNA von Ethanol zu befreien, wird der Überstand anschließend abgenommen und das RNA-Pellet getrocknet. Das Pellet wird dann in 10 µl Wasser aufgenommen. Die Effizienz der RNA-Isolation wird mittels einer 1:50 Verdünnung der RNA in Wasser mit einem BioPhotometer® D30 (Eppendorf) über die optische Dichte bestimmt.

4.2.3.2. Synthese komplementärer DNA

Die im Zuge der RNA-Isolation gewonnene mRNA wird zunächst mittels der reversen Transkriptase Superscript II in cDNA umgeschrieben. Hierbei wird zunächst 1 µg RNA mit 0,5 µg Oligo-dT und 1 µl dNTP (10 mM in DEPC-behandeltem Wasser) in DEPC-behandeltem Wasser für 5 min bei 65 °C inkubiert. Nach Zugabe von 4 µl 5-fachem Erststrangpuffer (Invitrogen™) und 2 µl 0,1 M DTT und 1 µl RNase-out (Invitrogen™) erfolgt ein weiterer Inkubationsschritt für 2 min bei 42 °C. Abschließend wird 1 µl Superscript II hinzugefügt und zunächst für 50 min bei 42 °C und danach für 15 min bei 70 °C inkubiert. Diese vier Zyklen erfolgen im Mastercycler Personal (Eppendorf).

Für die qPCR werden 12,5 µl des QuantiTec™ SYBR® Green PCR Kits (QIAGEN N.V.), jeweils 2,5 µl der in Tabelle 7 aufgeführten Primer (3 µM), 2,5 µl Wasser und 0,5 µl der entsprechenden cDNA aus der reversen Transkription zusammenpipettiert.

Das Amplifikationsprotokoll besteht aus folgenden Zyklen:

Temperatur	Zeit	Zyklen
95 °C	15 min	1
95 °C	30 s	44
53 °C	30 s	44
72 °C	30 s	44
95 °C	30 s	1
4 °C	bis zur Entnahme	1

Tabelle 11: cDNA-Amplifikationsprotokoll

Die qRT-PCRs erfolgen in einem Real Time System CFX96/Thermal Cycler C1000 (BioRad).

4.2.4. Western Blot

Um die Proteinmengen von Orai1, STIM1 und STIM2 sowie von FasL, Perforin und den Granzymen A und B zwischen CD8⁺ T-Zellen junger und alter Mäuse zu vergleichen wurden mindestens 10x10⁶ unstimulierte respektive 5x10⁶ stimulierte CD8⁺ T-Zellen beider Kohorten mit 1 ml PBS gewaschen und bis zur weiteren Verwendung als Zellpellet in einem Eppendorfgefäß bei -80 °C gelagert.

4.2.4.1. Herstellung von T-Zelllysaten

Zunächst wird das Zellpellet in 1 ml Radioimmunoprecipitationsassaypuffer (RIPA) und 1-fachem cOmplete™ Proteaseinhibitorcocktail gelöst. Um die Zellyse zu beschleunigen werden die gelösten Zellen gevortext. Die aufgeschlossenen Zellen werden anschließend für 20 min bei 15.000 g und 4 °C zentrifugiert. Die hiernach im Überstand befindlichen Proteine werden in ein neues Eppendorfgefäß überführt und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

4.2.4.2. Bicinchoninsäure-Proteinassay

Zur Konzentrationsbestimmung der gelösten Proteine wurde ein Bicinchoninsäure-(BCA)-Assay durchgeführt. Hierfür legt man zunächst in einer 96-Wellplatte 200 µl einer 1:50 Verdünnung von Lösung B in Lösung A des Pierce™ BCA Protein Assay Kits (Thermo Scientific™) vor. Anschließend werden die Proteinproben jeweils 1:100, 1:200 und 1:300 verdünnt und in Triplets mit jeweils 25 µl/Well zu den Lösungen des BCA-Kits hinzugegeben. Als Referenzwert wird eine BSA-Standardverdünnungsreihe auf dieselbe 96-Wellplatte aufgetragen. Hiernach kommt die 96-Wellplatte für 45 min bei 60 °C auf eine Rüttelplatte.

Nach dem Mischen und Inkubieren wird die 96-Wellplatte in ein Plattenlesegerät (Tecan M200) gegeben, in dem sie alle zehn Sekunden geschüttelt und die Emission nach Anregung mit Licht der Wellenlänge 460 nm gemessen wird. Die Konzentrationsbestimmung der Proteinproben erfolgt mit Hilfe der BSA-Standardkurve.

4.2.4.3. Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese

Die Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (engl. ‚sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE) wird für die elektrophoretische Auftrennung von Proteinen anhand ihrer Größe verwendet. Hierbei werden die Proteine der Proben hitzebedingt linearisiert und mittels des im Polyacrylamidgel enthaltenen Detergens SDS die Eigenladung der Proteine der Proben mit einer negativen überlagert. Die negativ geladenen Proteine laufen nach angelegter Spannung in Richtung des Pluspols durch die Gelmatrix. Hierbei bestimmt die Kettenlänge des denaturierten Proteins die Geschwindigkeit. Bei der in dieser Arbeit durchgeführten diskontinuierlichen SDS-Page durchlaufen die Proteine zunächst ein 4 % Acrylamidsammelgel, bevor sie in einem 7 % Acrylamidtrenngel aufgetrennt werden.

Für die SDS-PAGE werden jeweils 60 µg Protein mit 5-fachem Laemmli-Puffer versetzt und für 60 min bei 37 °C im Heizblock inkubiert und anschließend in die Taschen des Acrylamidsammelgels geladen. Als Marker für die Proteingröße wird der Precision Plus Dual Colour Standard (BioRad) benutzt. Die SDS-PAGE wird bis zum Erreichen des Trenngels bei 85 V und anschließend bei 140 V laufen gelassen. Als Laufpuffer wurde 1-faches SDS verwendet.

4.2.4.4. Blotting

Die durch die SDS-PAGE aufgetrennten Proteine werden im nächsten Schritt vom Polyacrylamidgel auf eine Polyvinylidenfluorid-(PVDF)-Membran übertragen. Um eine Übertragung der Proteine im wässrigen Blottingpuffer auf die hydrophobe PVDF-Membran zu gewährleisten wird sie zunächst für 1 min mit Methanol aktiviert. Danach wird die Western Blot-Kammer zusammengesetzt. Hierbei setzt sich die Reihenfolge von Minus- in Pluspolrichtung, um ein Übertreten der Proteine auf die Membran zu gewährleisten, aus einem blottingpuffergetränkten Whatmanpapier, dann dem Acrylamidgel, anschließend der PVDF-Membran und abschließend einem weiteren blottingpuffergetränkten Whatmanpapier zusammen. An die Kammer wird bei 4 °C für 90 min ein Strom von 250 mA angelegt. Die dadurch mit Proteinen beladene PVDF-Membran wird hiernach für 1 h bei RT in 5 % Blockingpuffer gegeben, um unspezifische Bindungen des Primärantikörpers zu verhindern. Die Inkubation mit dem jeweiligen primären Antikörper erfolgt bei 4 °C über Nacht auf einem Rotator. Am Folgetag wird die PVDF-Membran dreimal für jeweils 10 min mit 1-fachem TBST auf einer Wippe gewaschen. Die Inkubation mit einem Meerrettichperoxidase-(engl.

‚horseradish peroxidase‘, HRP)-gekoppelten, sekundären Antikörper wird in 1-fachem TBST für 1 h bei RT auf einer Wippe durchgeführt. Auch hiernach wird die Membran zweimal mit 1-fachem TBST und danach einmal mit 1-fachem TBS für jeweils 10 min gewaschen, um nicht gebundenen Antikörper zu entfernen. Die Detektion der Proteine von Interesse erfolgt über Chemilumineszenz. Dafür wird die PVDF-Membran in eine Lösung gegeben, die Luminol, ein Substrat der HRP enthält. Die HRP oxidiert dieses Luminol, wodurch es durch Chemilumineszenz Licht emittiert. Diese Emission an den antikörpergekoppelten Proteinbanden wird im ChemiDoc™ XRS + System (BioRad) mit dem Chemi Hi Sensitive-Programm detektiert.

Die Quantifizierung der Western Blots für Abbildung 21 erfolgte mittels der Analysesoftware ImageLab (BioRad) und der Statistiksoftware GraphPad Prism (GraphPad Software, Inc.).

4.2.5. Durchflusszytometrie

4.2.5.1. Durchflusszytometrische Analyse

Bei der durchflusszytometrischen Analyse einer Zellsuspension passieren Zellen einzeln in Flüssigkeitstropfen einen fokussierten Laserstrahl. Hierbei gibt das Durchflusszytometer respektive der fluoreszenzaktivierter Zellsortierer (engl. ‚fluorescence-activated cell sorter‘, FACS) Aufschluss über unterschiedliche Kriterien der Zelle. Das Vorwärtsstreulicht (engl. ‚forward scatter‘, FSC) untersucht die Beugung des Lichts im flachen Winkel und korreliert mit dem Zellvolumen. Das Seitwärtsstreulicht (engl. ‚side scatter‘, SSC) gibt die Brechung des Lichts im rechten Winkel an und veranschaulicht die Granularität der Zelle. Das SSC gibt somit Auskunft über die Größe und Struktur des Zellkerns sowie die Menge der Vesikel in einer Zelle. Neben dem Streulicht bietet das Durchflusszytometer die Möglichkeit das Signal fluorophorgekoppelter Antikörper darzustellen. Hierdurch lassen sich Zellen weiter anhand spezifischer Oberflächenantigene oder nach Permeabilisierung anhand spezifischer zytosolischer Proteine charakterisieren.

Im Zuge dieser Arbeit wurden CD8⁺ T-Zellen zu unterschiedlichen Zeitpunkten ihrer Stimulation durchflusszytometrisch durch extrazelluläre Antikörperfärbung auf Reinheit und Subtypenverteilung untersucht. Die verwendete Antikörperkonzentration wurde durch Titration bis zu einem möglichst klar abgrenzbaren positiven Signal ermittelt.

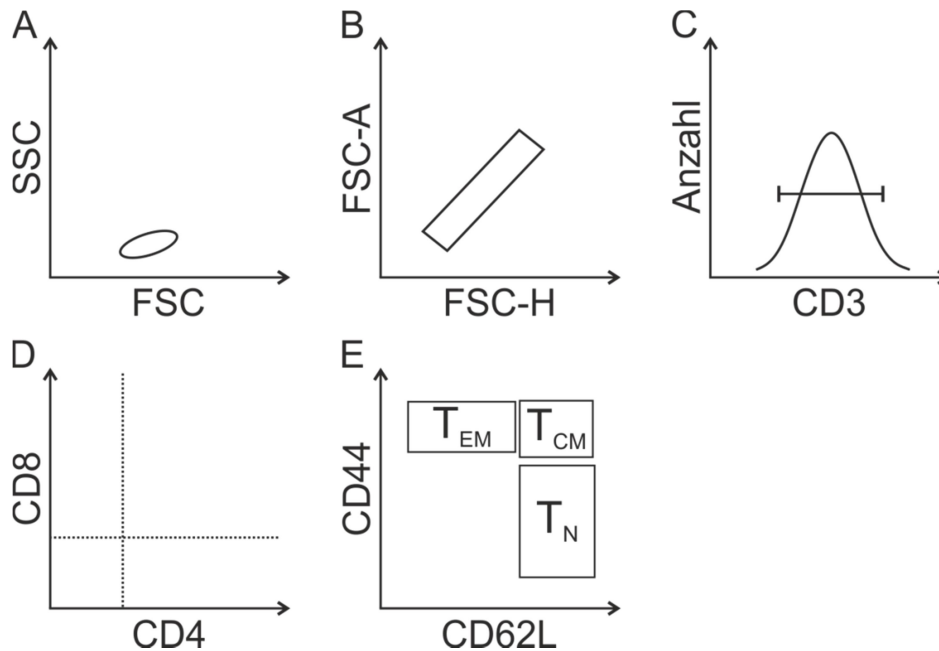


Abbildung 3: Gatingstrategie für die durchflusszytometrische Analyse. (A) Zunächst werden die CD8⁺ T-Zellen im Seitwärts- (engl. ‚sideward scatter‘, SSC) und Vorwärtsstreuung (engl. ‚forward scatter‘, FSC) anhand ihrer für Lymphozyten charakteristischen Größe und Granularität ausgewählt. (B) Hieran anschließend werden zwei unterschiedliche Parameter, die Fläche (engl. ‚area‘, FSC-A) und die Höhe (FSC-H) des FSC-Signals, verglichen, um aneinandergelagerte von einzelnen Zellen zu trennen, da bei ersteren Signale verdeckt werden können. (C) Hiernach werden die CD3⁺ T-Zellen von den CD3⁻ Zellen getrennt. (D) Die CD3⁺ T-Zellen werden anschließend in CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen aufgeteilt und (E) letztere anschließend anhand ihrer CD44- und ihrer CD62L-Expression in naive CD8⁺ T-Zellen (T_N) und CD8⁺ zentrale (T_{CM}) und Effektor-Gedächtnis-T-Zellen (T_{EM}) unterteilt.

1×10^6 CD8⁺ T-Zellen werden 4 min bei 400 g und RT mit 1 ml FACS-Puffer gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation wurde das Zellpellet in 100 μ l FACS-Puffer resuspendiert. Hiernach werden die flourochromgekoppelten Antikörper wie in Tabelle 3 angegeben hinzupipettiert und für 20 min bei RT und in Dunkelheit inkubiert. Anschließend werden die Zellen erneut mit 1 ml FACS-Puffer gewaschen und für 4 min bei 400 g und RT zentrifugiert. Das Zellpellet mit den gefärbten CD8⁺ T-Zellen wird in einem Endvolumen von 200 μ l FACS-Puffer aufgenommen und am gleichen Tag im Durchflusszytometer nach der Gatingstrategie nach dem Schema in Abbildung 3 vermessen. Das verwendete Durchflusszytometer ist ein FACSVerse™ (BD) mit einem violetten (405 nm), einem blauen (488 nm) und einem roten (640 nm) Laser. Die Analyse der generierten Daten erfolgte mittels der Software FlowJo v10 (FlowJo, LLC).

4.2.5.2. Durchflusszytometrisches Sortieren

Neben Durchflusszytometern für die Charakterisierung von Zellen anhand von zellinternen oder oberflächlichen Antigenen existieren Durchflusszytometer für das Sortieren von Zellen anhand ihres Expressionsprofils. Hierfür werden die Flüssigkeitstropfen, in denen sich im Normalfall jeweils eine Zelle befindet durch das Durchflusszytometer elektrisch geladen und je nach Antikörpermarkierung über einen Magneten in das zugehörige Zielgefäß geleitet. Hierfür werden mindestens 40×10^6 stimulierte CD8⁺ T-Zellen zunächst von den

magnetischen Stimulationsbeats separiert, anschließend mit FACS-Puffer gewaschen und in 1 ml FACS-Puffer aufgenommen. Um die T_{CM} und T_{EM} aus der Gesamtpopulation isolieren zu können wird das Zellgemisch mit 40 μ l PE-gekoppeltem anti-CD44-Antikörper und 30 μ l APC-gekoppeltem anti-CD62L-Antikörper für 20 min bei 4 °C auf einem Rotator gefärbt. Anschließend werden die Zellen erneut gewaschen, in 1-2 ml PBS + 20 % BSA aufgenommen und für die Sortierung durch ein FACSAriaIII™-Durchflusszytometer (BD) mit den in Abbildung 3A, B und E dargestellten Gates laufen gelassen. Die daraus hervorgehenden reinen $CD8^+ T_{CM}$ - und T_{EM} -Zellen werden in AIM V + 10 % FCS + 20 U/ml humanes IL-2 + 50 μ M β -ME in einer Dichte von 1×10^6 pro Well einer 24-Wellplatte ausgesät und im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO_2 bis zur weiteren Verwendung gelagert, um sich vom Zellstress des Isoliervorgangs zu erholen.

4.2.6. Ca^{2+} -Imaging

Die $[Ca^{2+}]_{int}$ der $CD8^+$ T-Zellen wurde in dieser Arbeit mittels des Ca^{2+} -bindenden Fluoreszenzfarbstoffes Fura2-Acetoxymethylester (Fura2-AM) bestimmt. Hierbei ermöglicht die unpolare Acetoxymethylestergruppe ein diffundieren des Farbstoffes über die Zellmembran. Innerhalb der Zelle wird die Acetoxymethylestergruppe durch endogene Esterasen vom Fura2 getrennt, wodurch es wegen seiner daraus resultierenden polaren Ladung nicht mehr über die Plasmamembran aus der Zelle austreten kann. Die Messung verläuft über die gestaffelte Anregung des Fura2 mit Licht der Wellenlängen 340 nm und 380 nm, wodurch jeweils eine Emission des Fluoreszenzfarbstoffes bei 510 nm induziert wird. Hierbei führt eine hohe $[Ca^{2+}]_{int}$ zu höherer Fluoreszenz nach Anregung mit 340 nm und niedrigerer mit 380 nm Wellenlänge, wohingegen eine niedrigere $[Ca^{2+}]_{int}$ bei einer Anregung mit 380 nm Wellenlänge für höhere Fluoreszenzsignale sorgt. Aus den Fluoreszenzen nach Anregung mit 340 nm (F_{340}) und 380 nm (F_{380}) Wellenlänge wird ein Quotient gebildet (Verhältnis(F_{340}/F_{380})), der proportional zur $[Ca^{2+}]_{int}$ ist. Durch diese ratiometrische Eigenschaft des Fura2 wird auch eine Beeinflussung der Messergebnisse durch unterschiedliche Zelldicken, zwischen Zellen variierenden Fura2-Ladungen oder durch Eigenschaften der Messapparatur mathematisch ausgeschlossen.

Für die Ca^{2+} -Imagingmessungen werden zunächst Objektträger für 30 min bei RT mit 0,1 mg/ml Poly-L-Ornithinlösung beschichtet, um ein besseres Anhaften der $CD8^+$ T-Zellen zu gewährleisten und deren Wegspülen durch die Applikation verschiedener Ringerlösungen zu verhindern. Etwa $0,25 \times 10^6$ $CD8^+$ T-Zellen werden währenddessen für 30 min bei RT in 1 ml AIM V Medium mit einer Konzentration von 1 μ M Fura-2 AM in einem Eppendorfgefäß auf einer Wippe beladen. Nach der Beladung werden die Zellen für 5 min bei 200 g und RT zentrifugiert, der Überstand verworfen, das Pellet in 15 μ l 0,5 mM respektive 2 mM Ca^{2+} -Ringerlösung resuspendiert und auf die Poly-L-Ornithin-beschichteten Objektträger

übertragen. Auf diesen Objektträgern werden die Zellen 15 min bei RT im Dunklen ruhen gelassen, um eine solide Bindung an das Poly-L-Ornithin zu gewährleisten. Anschließend werden die auf dem Objektträger angehafteten Zellen in eine Messkammer gelegt, die ein Überspülen der CD8⁺ T-Zellen mit unterschiedlichen Ringerlösungen ermöglicht.

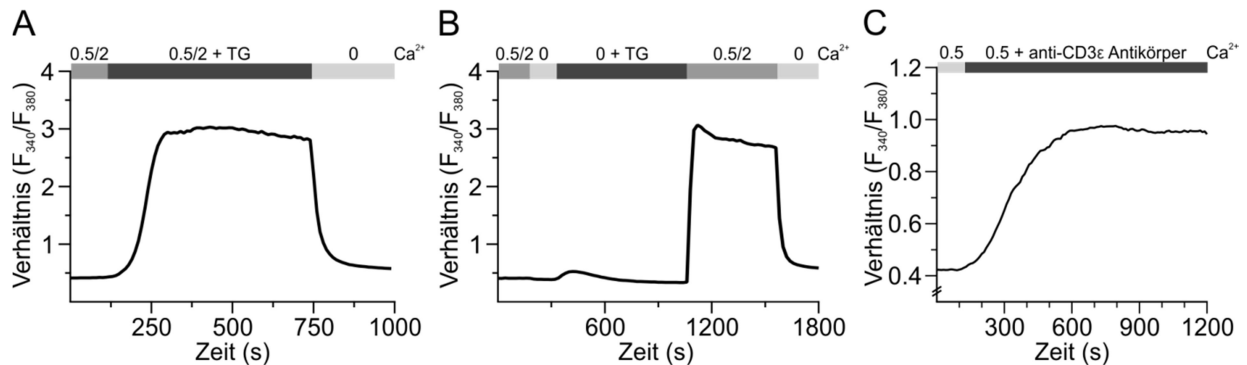


Abbildung 4: Schematische Darstellung der in dieser Arbeit verwendeten Ca²⁺-Imagingprotokolle. Die Abfolge der verschiedenen Ca²⁺-Ringerlösung ist jeweils oben im Bild angegeben. Bei den Ca²⁺-Konzentrationsangaben handelt es sich um 0,5 mM respektive 2 mM Ca²⁺. Thapsigargin (TG) wurde beim globalen Ca²⁺-Protokoll (A) in Anwesenheit und beim Re-Additionsprotokoll (B) in Abwesenheit von Ca²⁺ in einer Konzentration von 1 µM appliziert. Für die Ca²⁺-Signale nach T-Zellrezeptoraktivierung (C) wurde ein aktivierender anti-CD3ε-Antikörper in einer Konzentration von 2 µg/ml in 0,5 mM Ca²⁺-Ringerlösung appliziert. Der schematische Verlauf der Kurven entspricht der für alle Fura2-beladenen CD8⁺ T-Zellen gemittelten, durch die Spülprotokolle verursachten Änderung des Verhältnisses der Fluoreszenz durch Anregung mit Licht von 340 nm zur Fluoreszenz nach Anregung mit 380 nm Wellenlänge (Verhältnis(F₃₄₀/F₃₈₀)) pro Zeit (s). Einzelzellensignale würden in den in (A) und (B) dargestellten Protokollen vergleichbar aussehen, wohingegen man beim Protokoll in (C) für einzelne CD8⁺ T-Zellen eher einzelne oder mehrere Spikes erwarten würde.

Es wurden drei verschiedene Messprotokolle für die Untersuchung der Ca²⁺-Signalparameter verwendet (Abbildung 4). Beim globalen Ca²⁺-Protokoll (Abbildung 4A) wird 1 µM TG, ein irreversibler Inhibitor der SERCA, in Anwesenheit von [Ca²⁺]_{ext} appliziert. Da die CD8⁺ T-Zellen in diesem Protokoll nicht vor Terminierung des Ca²⁺-Signals in 0 mM Ca²⁺-Ringerlösung verweilen ist es physiologischer als das Re-Additionsprotokoll (Abbildung 4B) und ermöglicht eine unverfälschtere Analyse der Geschwindigkeit des Ca²⁺-Efflux aus den CD8⁺ T-Zellen. Dafür ermöglicht das Re-Additionsprotokoll aufgrund der Applikation von 1 µM TG in Abwesenheit von [Ca²⁺]_{ext} eine Entkoppelung der ER-Ca²⁺-Depletion vom SOCE. Beim TZR-Protokoll (Abbildung 4C) werden Ca²⁺-Signale über die Aktivierung des TZR durch 2 µg/ml eines aktivierenden anti-CD3ε-Antikörpers induziert. Im Gegensatz zu den TG-vermittelten Signalen entstehen hierbei diversere Signalverläufe. Meistens kommt es zu mehreren aufeinanderfolgenden schnellen An- und Abstiegen der [Ca²⁺]_{int}, die Spikes genannt werden. Aber auch vereinzelte Spikes, durchgängige Ca²⁺-Signale und Kombinationen aus Spikes und anhaltenden Signalen sind möglich.

Die Ca²⁺-Signale aller vermessenen CD8⁺ T-Zellen derselben Maus werden gemittelt und der Mittelwert der Mittelwerte und Standardfehler der Mittelwerte (engl. ‚standard error of the mean‘, SEM) für alle Mäuse der jeweiligen Altersgruppe gebildet. Neben der Veränderung des Ca²⁺-Signals als Verhältnis der bei 340 nm und 380 nm Wellenlänge angeregten Fluoreszenzen (Verhältnis (F₃₄₀/F₃₈₀)) pro Sekunde (Zeit (s)) wurden wichtige Parameter des

TG-induzierten Ca^{2+} -Signals dargestellt. Hierbei beschreibt der Influx Peak den höchsten Punkt der Ca^{2+} -Kurve nach Initiation des Signals. Als Plateau wird der stationäre Ca^{2+} -Signalbereich vor der finalen Applikation der 0 mM Ca^{2+} -Ringerlösung bezeichnet. Die Influxrate gibt den durch das einströmende Ca^{2+} verursachten Anstieg des Verhältnis (F_{340}/F_{380}) pro Zeit wieder. Durch integrieren des gesamten Ca^{2+} -Signals wurden die Flächen unter der Kurve (engl. ‚area under the curve‘, AUC) berechnet. Für die Berechnung der Geschwindigkeit des Ca^{2+} -Ausstroms wurde die Geschwindigkeitskonstante ($1/\tau$) gegen die Ca^{2+} -Signalhöhe vor Terminierung des Signals mit 0 mM Ca^{2+} -Ringerlösung dargestellt. Hierbei ist τ die benötigte Zeit, bis das Ca^{2+} -Signal zum Erliegen kommt. Die Staffelung nach Ca^{2+} -Signalhöhe erfolgte, da die Aktivität der, in CD8^+ T-Zellen hauptsächlich für den Ca^{2+} -Efflux verantwortliche, PMCA [Ca^{2+}]-abhängig ist.

Das Licht der Wellenlängen 340 nm und 380 nm wurde von einem VisiChrome High Speed Polychromator System (Visitron) erzeugt. Die Erfassung der emittierten Fluoreszenz erfolgte über ein mit einem Fura2-Filtersatz ausgestattetes Observer.A1-Mikroskop (Zeiss), an das eine SPOT Pursuit-Kamera (SPOT Imaging) mit ladungsgekoppeltem Bauteil (engl. ‚charge-coupled device‘, CCD) angeschlossen wird. Der CCD-Sensor ermöglicht die Digitalisierung des von der Kamera erfassten Lichtsignals.

4.2.7. Whole-Cell Patch-Clamp

Bei Patch-Clamp handelt es sich um eine elektrophysiologische Methode mit der kleinste Ionenströme im Bereich weniger Picoampere durch membranständige Ionenkanäle einzelner Zellen aufgelöst werden können. Bei dieser Methode befindet sich ein Silberdraht in einer mit physiologischer Lösung gefüllten Glaskapillare aus Borsilikat mit einer nur 1-2 μm ausmachenden Öffnung. Diese Öffnung wird unter optischer Kontrolle durch ein Mikroskop vorsichtig auf die Plasmamembran einer Zelle aufgelegt. Durch Anlegen eines dezenten Unterdrucks entsteht eine Gigaseal genannte Verbindung zwischen Pipette und Membran, die durch einen Widerstand zwischen Pipetteninnerem und externer Lösung von über 1 G Ω gekennzeichnet ist. Hierbei handelt es sich um eine Patch-Clamp-Konfiguration, die als cell-attached bezeichnet wird. Lässt man hierauf kontrollierte Unterdruckpulse am Ende der Pipette folgen, ohne den Gigaseal zu unterbrechen, wird die Plasmamembran eröffnet und ein Austausch zwischen pipetteninterner Lösung und Zytosol findet statt. Mittels einer in der externen Lösung befindlichen Referenzelektrode lassen sich so Ströme über die gesamte Zellmembran ableiten. Daher wird diese in dieser Arbeit verwendete Patch-Clamp-Konfiguration auch whole-cell-Konfiguration genannt. Als Verstärker dient ein Electronic Power Control-(EPC)-10 (HEKA), der über die Software Patchmaster (HEKA) gesteuert wird. Die unstimulierten CD8^+ T-Zellen werden für 5 min bei 200 g und RT zentrifugiert, in der externen Lösung aus Tabelle 9 resuspendiert und in eine Zellkulturschale (Corning™)

überführt. I_{CRAC} wird in den $CD8^+$ T-Zellen mittels aktiver Depletion der ER- Ca^{2+} -Speicher über das in der pipetteninternen Lösung befindliche IP_3 induziert. IP_3 öffnet ER-membranständige Ca^{2+} -Kanäle, die IP_3 -Rezeptoren, und verursacht dadurch ein Ausströmen von Ca^{2+} aus dem ER ins Zytosol. Das ebenfalls in der pipetteninternen Lösung befindliche BAPTA verhindert die Ca^{2+} -abhängige Inaktivierung des Ca^{2+} -Einstroms, weshalb langanhaltende Ca^{2+} -Ströme aufgezeichnet werden können. Zur optischen Kontrolle wurde ein mit einer DCM130E Kamera (ScopePhoto) ausgestattetes Observer.A1 Mikroskop (Zeiss) verwendet. Die Auswertung der mittels Patchmaster-Software aufgezeichneten Ströme erfolgte mit der Software Igor Pro 6.37.

4.2.8. Echtzeitzytotoxizitätsassay

Für die Analyse der zytotoxischen Funktion von $CD8^+$ T-Zellen wurde ein kinetischer Echtzeitzytotoxizitätsassay nach einem in der Arbeitsgruppe (AG) Hoth entwickelten Verfahren angewandt (Kummerow et al., 2014). Hierbei werden Zielzellen mit dem Fluoreszenzfarbstoff Calcein beladen und die durch $CD8^+$ T-Zellen vermittelte Zytolyse der Zielzellen in zehnminütigen Intervallen als Abnahme der Fluoreszenzintensität erfasst.

Zunächst werden die in Kapitel 4.1.8 aufgeführten Zielzellen in einem Eppendorfgeläß für 15 min im Dunkeln bei RT in AIM V + 10 mM HEPES (AIM V*) mit 500 nM Calcein-AM auf einer Wippe beladen. Anschließend werden die Zellen bei 200 g und RT für 5 min zentrifugiert, mit AIM V* gewaschen und in einer Dichte von $0,125 \times 10^6$ Zellen/ml in einem Volumen von 200 μ l in eine schwarze 96-Wellplatte mit transparentem, planarem Boden ausgesät. Damit sich die calceinbeladenen Zielzellen auf dem Boden absetzen können wird die 96-Wellplatte für mindestens 20 min ruhen gelassen. In der Zwischenzeit werden die unstimulierten oder stimulierten $CD8^+$ T-Zellen der jungen und alten Mäuse bei 200 g und RT für 5 min zentrifugiert, in AIM V* gewaschen und auf eine Konzentration von 10×10^6 Zellen/ml eingestellt. Zu den in AIM V* befindlichen $CD8^+$ T-Zellen wird 20 μ g/ml eines aktivierender anti-CD3 ϵ -Antikörper hinzugegeben. Dieser bindet mit seinem dafür spezifischen Epitop den CD3-Rezeptor des TZR/CD3-Komplexes und aktiviert dadurch den TZR-Signalweg in $CD8^+$ T-Zellen. Anschließend werden 50 μ l der Suspension aus aktivierten $CD8^+$ T-Zellen vorsichtig, ohne die abgesessenen Zielzellen aufzuwühlen, zu den Zielzellen hinzupipettiert. Der an die $CD8^+$ T-Zellen gebundene anti-CD3 ϵ -Antikörper wird daraufhin von auf den Zielzellen befindlichen F_c -Rezeptoren an seiner konstanten Domäne gebunden. Dadurch wird eine immunologische Synapse zwischen $CD8^+$ T-Zelle und Zielzelle ausgebildet und eine Zytolyse ermöglicht. Werden die Zielzellen von $CD8^+$ T-Zellen lysiert, verlieren sie die Calceinfärbung und es kommt zum Fluoreszenzverlust am Boden der 96-Wellplatte. Dieser durch die zytotoxische Funktion der $CD8^+$ T-Zellen vermittelte Verlust der Fluoreszenz wird mit einer Lebend- und einer Totkontrolle verglichen. Erstere besteht aus $2,5 \times 10^4$ Zielzellen in

250 µl AIM V*, letztere aus 2,5x10⁴ Zielzellen in 250 µl AIM V* + 20 µl 10 % Triton X-100 jeweils ohne CD8⁺ T-Zellen. Zur Hintergrundkorrektur wurden weiterhin Wells mit 250 µl AIM V* und 250 µl + 20 µl 10 % Triton X-100 jeweils ohne Zellen angelegt. Die Berechnung der jeweiligen Zytotoxizität zum Zeitpunkt t über die erwähnten Kontrollen setzt sich wie folgt zusammen:

$$\text{Zielzelllyse}(t) [\%] = \frac{F_{\text{exp}}(t) - (F_{\text{lebend}}(t) * I)}{I * (F_{\text{tot}}(t) - F_{\text{lebend}}(t))} * 100$$

Hierbei stellt F_{exp}(t) die Fluoreszenz der Zielzellen bei Anwesenheit von CD8⁺ T-Zellen zum Zeitpunkt t dar, F_{lebend}(t) die Fluoreszenz der Lebendkontrolle zum Zeitpunkt t, F_{tot}(t) die Fluoreszenz der Totkontrolle zum Zeitpunkt t und I den Index, welcher sich aus dem Quotienten F_{exp}/ F_{lebend} zum Zeitpunkt 0 zusammensetzt.

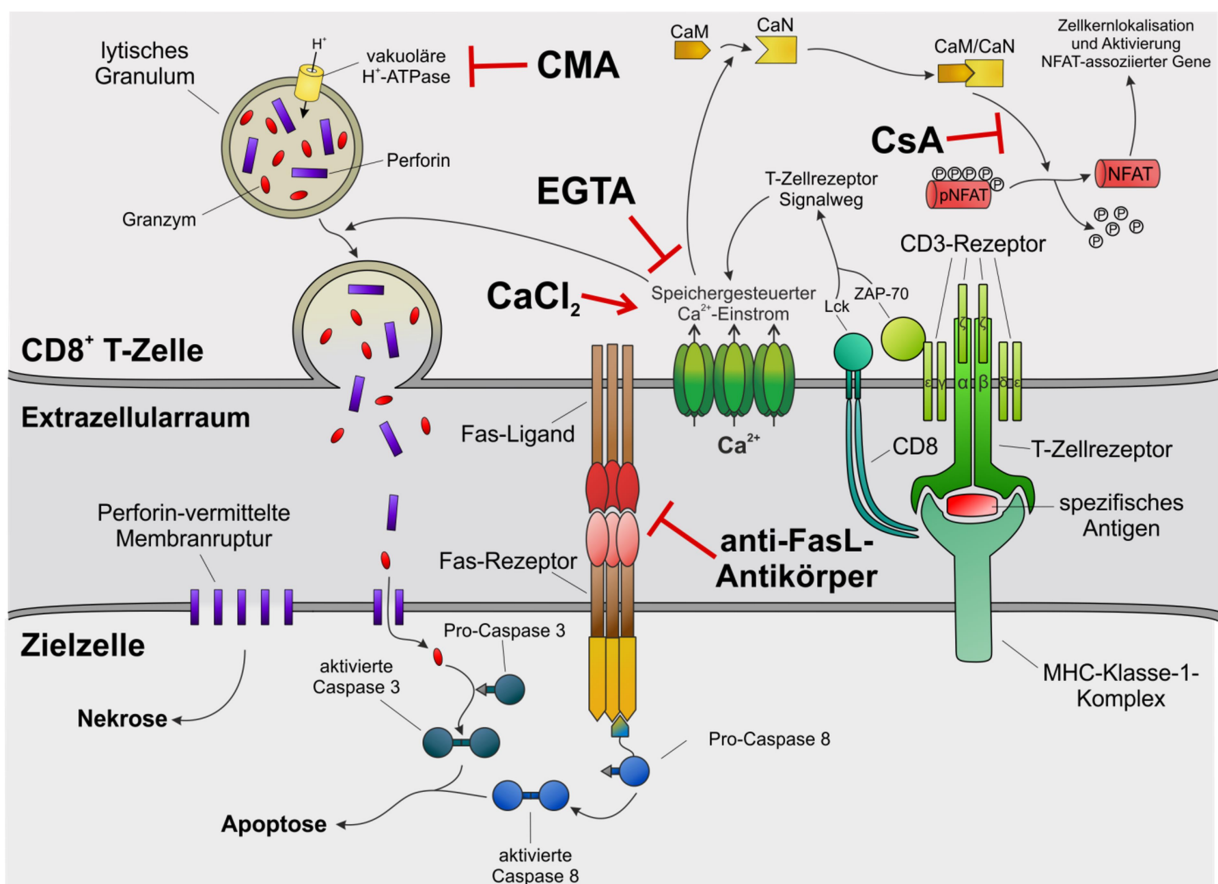


Abbildung 5: Schaubild der in Zytotoxizitätsassays untersuchten Beeinflussungen der Funktionalität CD8⁺ T-Zellen. Concanamycin A (CMA) hemmt den Zytotoxizitätsmechanismus über lytische Granula durch eine Inhibition der vakuolären H⁺ ATPasen. Die Funktion von Perforin und den Granzymen wird durch einen Anstieg des pH-Werts in lytischen Granula aufgehoben. Der hemmende anti-Fas-Ligand-(FasL)-Antikörper verhindert die Bindung an den Fas-Rezeptor und damit die entsprechende Apoptose auslösende Signalkaskade. Durch die Stimulation der CD8⁺ T-Zellen mit dem Calcineurininhibitor Cyclosporin A (CsA) wird die Expression wichtiger nuclear factor of activated t cells-(NFAT)-assoziierter Gene, wie *Interleukin-2* oder *FasL*, gehemmt. Die Zugabe des Ca²⁺-Chelators Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure (EGTA) zum Assaymedium hemmt den elektrochemischen Gradienten für Ca²⁺ und damit den speichergesteuerten Ca²⁺-Einstrom, wohingegen die Zugabe von CaCl₂ einen steigenden Effekt auf beide hat.

Für die Versuche mit Concanamycin A (CMA), einem vakuolären H⁺-ATPaseinhibitor, der in niedrigen Konzentrationen den Zytotoxizitätsmechanismus über lytische Granula hemmt,

werden die CD8⁺ T-Zellen zwei Stunden vor Assaybeginn mit 1 nm bis 100 nm CMA präinkubiert (Abbildung 5). Den Kontrollen wird das gleiche Volumen von DMSO, dem Lösemittel von CMA, hinzugefügt. Für die Versuche mit einem inhibierenden anti-FasL-Antikörper zur Hemmung des FasL-/FasR-Zytotoxizitätsmechanismus wird zu den CD8⁺ T-Zellen vor Assaybeginn 50 µg/ml des Antikörpers hinzugegeben (Abbildung 5). Den Kontrollen wurde, da der Antikörper in PBS gelöst ist, das gleiche Volumen an PBS hinzugefügt. Für die Versuche mit Cyclosporin A (CsA), einem Inhibitor von Calcineurin, der die Kerntranslokation des Transkriptionsfaktors NFAT hemmt, wird AIM V* mit 1 µM CsA versetzt (Abbildung 5). Wie auch den Kontrollen für die Versuche mit CMA wurde den Kontrollen das gleiche Volumen des Lösemittels DMSO hinzugefügt. Für die Untersuchung der Beeinflussung der Zytotoxizität durch verschiedene $[Ca^{2+}]_{ext}$ wird AIM V* mit CaCl₂ oder dem Ca²⁺-Chelator EGTA, in Anlehnung an eine Publikation der AG von Prof. Dr. Markus Hoth, versetzt (Abbildung 5) (X. Zhou et al., 2018).

Für die Erfassung der Fluoreszenz wird ein GeniosPro-Plattenlesegerät (Tecan) verwendet, welches mit einem Filtersatz ausgestattet ist, der für Experimente mit Calcein, welches bei 485 nm Wellenlänge angeregt wird und daraufhin Licht der Wellenlänge 535 nm emittiert, geeignet ist. Die Messungen erfolgen bei 37 °C.

5. Ergebnisse

5.1. Altersbedingte Unterschiede bei C57BL6/J-Mäusen

Für die Untersuchung der Veränderungen bei Ca^{2+} -Signalen und der Funktionalität von CD8^+ T-Zellen im Alter wurden Mäuse als Modellorganismus gewählt. Das zur Verfügung stehende Material an humanem Blut von Menschen höheren Alters ist limitiert und impliziert bestimmte Komplikationen. Zu diesen Komplikationen zählen Unterschiede in der Lebensweise, im allgemeinen Gesundheitszustand, in der spezifischen Krankenvorgeschichte des Spenders und natürlich der genetischen Variabilität zwischen den Probanden. Diese Faktoren können zu hohen Schwankungen in den Versuchsergebnissen führen und damit potenziell eventuelle Effekte maskieren. Für in einem spezifisch pathogenfreien (SPF) Tierstall gehaltene Inzuchtmäuse treffen diese Faktoren nicht zu. Als Mausstamm wurde mit C57BL6/J der gängigste Stamm von Labormäusen verwendet. Als Altersgruppen wurden 12 bis 24 (Abbildung 6A) und 78 bis 102 Wochen (Abbildung 6B) alte Mäuse verwendet. Da das Geschlecht auch einen Einfluss auf Immunantworten hat, wurde lediglich mit weiblichen Mäusen gearbeitet (Klein & Flanagan, 2016).

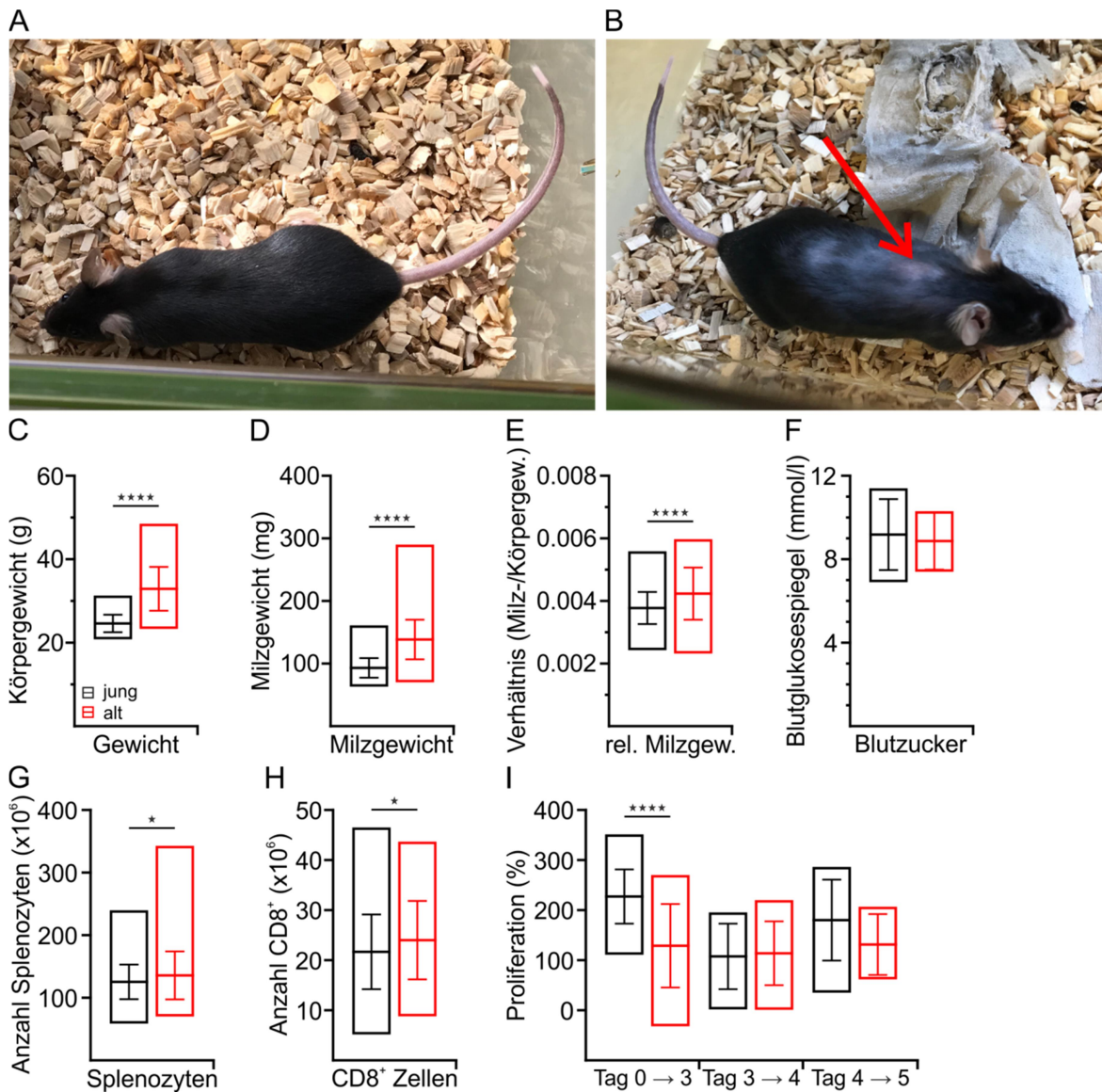


Abbildung 6: Altersbedingte Unterschiede zwischen jungen und alten weiblichen C57BL/6J Mäusen. Charakteristische phänotypische Unterschiede zwischen (A) 12 bis 24 Wochen und (B) 78 bis 102 Wochen alten C57BL/6J Mäusen. Im Zuge der Isolation $CD8^+$ T-Zellen wurden für junge Mäuse (schwarz) und alte Mäuse (rot) die Parameter (C) Körpergewicht, (D) Milzgewicht und (E) das Verhältnis aus den beiden ($n_{\text{jung}} = 113$; $n_{\text{alt}} = 85$), sowie (F) der Blutglukosespiegel ($n_{\text{jung}} = 7$; $n_{\text{alt}} = 5$) verglichen. Weiterhin wurden die Anzahlen an (G) aus der Milz gewonnenen Splenozyten ($n_{\text{jung}} = 113$; $n_{\text{alt}} = 87$) und (H) aus diesen isolierten $CD8^+$ T-Zellen ($n_{\text{jung}} = 101$; $n_{\text{alt}} = 84$) sowie (I) die Zellzahlveränderung verglichen ($n_{\text{jung}(\text{Tag 0 bis 3})} = 22$, $n_{\text{jung}(\text{Tag 3 bis 4})} = 17$, $n_{\text{jung}(\text{Tag 4 bis 5})} = 12$; $n_{\text{alt}(\text{Tag 0 bis 3})} = 18$, $n_{\text{alt}(\text{Tag 3 bis 4})} = 14$, $n_{\text{alt}(\text{Tag 4 bis 5})} = 9$). Die äußere Abgrenzung der schwebenden Balken zeigt die Probenverteilung von Minimum bis Maximum. Innerhalb der Balken ist das arithmetische Mittel \pm Standardabweichung dargestellt. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$.

5.1.1. Phänotyp

Wie in Abbildung 6A und Abbildung 6B zu erkennen ist, sind die optischen Unterschiede zwischen beiden Altersgruppen marginal. Das auffälligste Altersmerkmal weiblicher C57BL/6J-Mäuse sind gelegentlich im Fell alter Mäuse auftretende kahle Stellen (Abbildung 6B, roter Indikator). Weiterhin weisen die alten Mäuse (rote Balken) im Durchschnitt ein signifikant um 33,71 % ($p < 0,0001$) schwereres Körper- und ein signifikant um 48,68 % ($p < 0,0001$) schwereres Milzgewicht als die jungen Mäuse (schwarze Balken) auf (Abbildung 6C,

D). Das Verhältnis von Milz- zu Körpergewicht wurde als Gesundheitsindikator erfasst, da Krebserkrankungen oder chronische Entzündungsprozesse bei älteren Mäusen häufig zu einer Splenomegalie führen (Pettan-Brewer & Treuting, 2011). Mäuse, bei denen dieses Verhältnis über 0,006 lag wurden als nicht gesund definiert und daher aus der Kohorte ausgeschlossen. Im Durchschnitt liegt das Verhältnis von Milz- zu Körpergewicht bei den CD8⁺ T-Zellen der gesunden alten im Vergleich zu denen der gesunden jungen Mäuse signifikant um 12,15 % ($p < 0,0001$) gesteigert vor (Abbildung 6E). Als weiterer Gesundheitsindikator wurden die Blutglukosespiegel der Mäuse erfasst, da C57BL6/J-Mäuse genetisch prädisponiert sind, Typ-2-Diabetes mellitus zu entwickeln (Kaku, Fiedorek, Province, & Permutt, 1988; Surwit, Kuhn, Cochrane, McCubbin, & Feinglos, 1988). Die Ergebnisse der Blutglukosemessungen der von uns verwendeten Mäuse zeigen allerdings keine bedeutsamen Unterschiede zwischen den Glukosespiegeln alter und junger Mäuse (Abbildung 6F).

5.1.2. Isolation CD8⁺ T-Zellen

CD8⁺ T-Zellen kommen als Bestandteil der adaptiven Immunantwort der essentiellen Funktion nach, virusinfizierte und entartete körpereigene Zellen abzutöten, um virale oder Krebserkrankungen zu bekämpfen. Um diese bedeutende Lymphozytenart untersuchen zu können, wurden Zellen aus dem größten lymphatischen Organ des Körpers, der Milz, gewonnen. Aus diesem Splenozyten genannten Zellgemisch verschiedener Leukozyten wurde mittels auf antikörpergekoppelten, magnetischen Beads basierender Negativisolation CD8⁺ T-Zellen isoliert und in Kultur genommen. Aus der Quantifizierung der Anzahl an Splenozyten und CD8⁺ T-Zellen pro Maus ergibt sich korrelierend zum in Kapitel 5.1.1 beschriebenen höheren Milzgewicht in alten Mäusen eine signifikante altersbedingte Steigerung der Splenozytenanzahl um 8,37 % ($p = 0,0251$) (Abbildung 6G) und der Anzahl an CD8⁺ T-Zellen um 10,69 % ($p = 0,0254$) (Abbildung 6H).

Für die Untersuchung der Veränderungen bei Ca²⁺-Signalen und der Funktionalität von CD8⁺ T-Zellen im Alter wurden zwei unterschiedliche Varianten von CD8⁺ T-Zellen verwendet, zum einen unstimulierte, die ruhenden CD8⁺ T-Zellen im Körper entsprechen und zum anderen stimulierte CD8⁺ T-Zellen, die im Falle einer viralen oder Krebserkrankung aktivierten CD8⁺ T-Zellen entsprechen. Für die Stimulation wurden die isolierten CD8⁺ T-Zellen, wie in Kapitel 4.2.2 beschrieben, für mindestens drei Tage mit anti-CD3-/anti-CD28-antikörpergekoppelten Beads stimuliert, bevor sie in Versuchen verwendet wurden. Bei dieser Stimulation simuliert die Aktivierung des TZR-assoziierten CD3-Rezeptors und des co-stimulatorischen CD28-Oberflächenproteins die physiologische Aktivierung des TZR/CD3-Komplexes. Die Aktivierung des TZR-Signalwegs verursacht unter anderem eine klonale Expansion der T-Zellen. Da für die Stimulation von CD8⁺ T-Zellen alter Mäuse mit dem Mitogen Concanavalin A herausgefunden wurde, dass sie eine reduzierte, später einsetzende Proliferation

aufweisen, wurde die Zellzahlveränderung nach TZR-Aktivierung untersucht (Jiang et al., 2007). In Abbildung 6I ist zu erkennen, dass es zu einer deutlichen, altersbedingt signifikant um 30,09 % ($p < 0,0001$) geringeren Zunahme der Zellzahl vom Tag der Isolation bis Tag 3 kommt. Dieser Alterseffekt hebt sich allerdings von Tag 3 auf Tag 4 auf. Hier kommt es zu einer geringfügig um 2,99 % höheren Zellzahlzunahme für die CD8⁺ T-Zellen der alten Mäuse (Abbildung 6I). Von Tag 5 auf Tag 6 übersteigt die Zellzahlzunahme der CD8⁺ T-Zellen der jungen Mäuse die der alten erneut um 17,38 % (Abbildung 6I).

Im Durchschnitt liegen die Quantitäten von Splenozyten und CD8⁺ T-Zellen bei alten Mäusen somit höher. Dafür weisen CD8⁺ T-Zellen junger Mäuse zu Beginn der Stimulation eine deutlichere Zunahme der Zellzahl auf, die sich mit fortschreitender Stimulationsdauer allerdings an die der Zellen der alten Mäuse angleicht. Die oben genannten Ergebnisse aus der Mitogenstimulation lassen sich also auf die physiologischere TZR-Stimulation übertragen.

5.1.3. CD8⁺ T-Zellsubpopulationen

Ein Charakteristikum der Immunoseneszenz ist die Veränderung der Subtypenverteilung von CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen im Alter. Hierbei kommt es zu einer altersbedingten Abnahme der T_N und einer Anreicherung an T_{CM} und T_{EM} (Grossmann et al., 1991; Pinchuk & Filipov, 2008; Quinn et al., 2018). Um einen Eindruck davon zu gewinnen, ob diese Umverteilung der CD8⁺ T-Zellsubtypen auch zwischen den untersuchten jungen und alten C57BL6/J-Mäusen vorliegt wurden durchflusszytometrische Messungen zur Subtypenverteilung CD8⁺ T-Zellen durchgeführt.

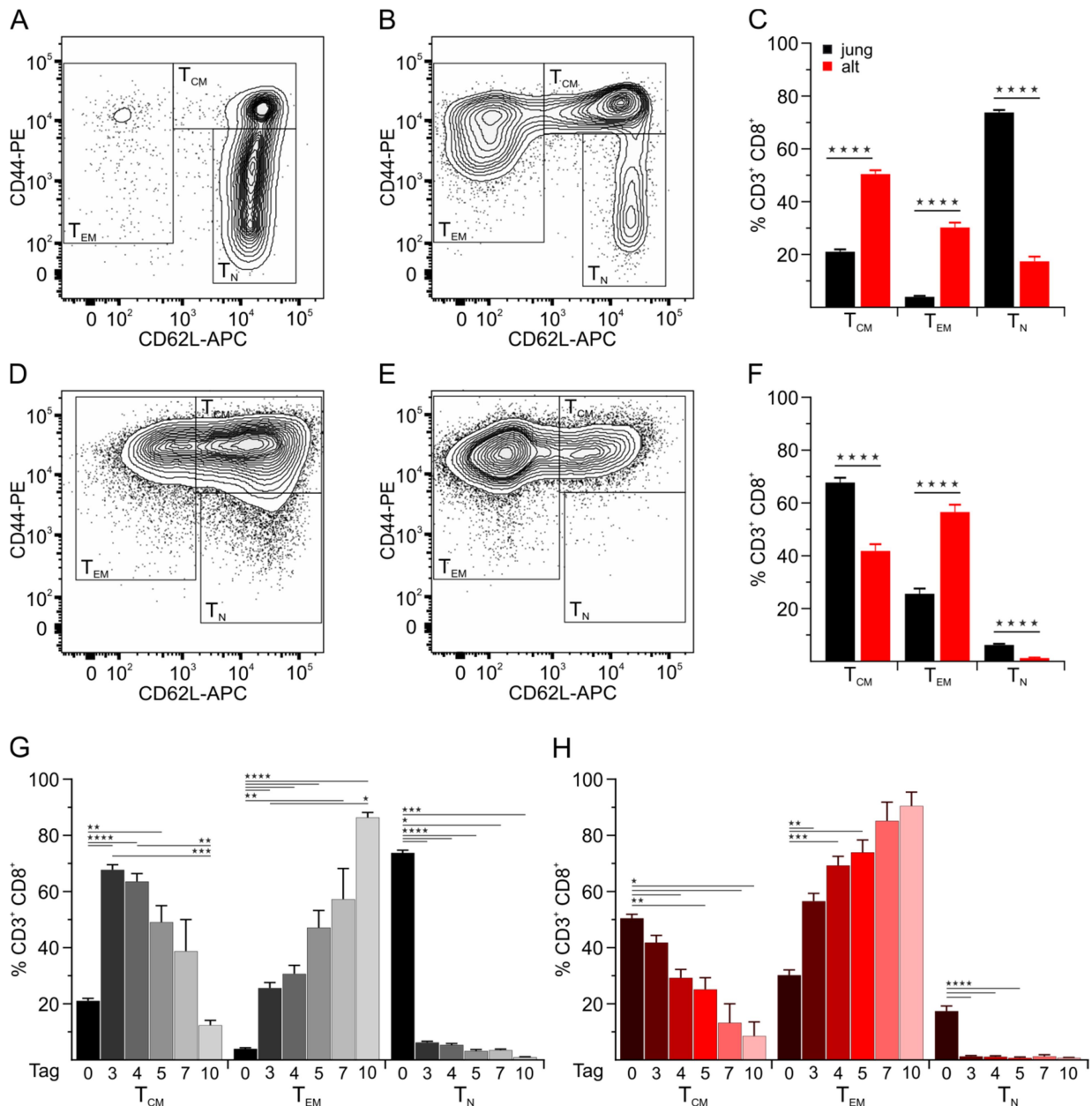


Abbildung 7: Die CD8⁺ T-Zellsubtypenverteilung verschiebt sich bei C57BL/6J Mäusen altersbedingt von mehr naiven (T_N) zu mehr zentralen (T_{CM}) und Effektor-Gedächtnis-T-Zellen (T_{EM}). Exemplarische Konturplots unstimulierter CD8⁺ T-Zellen (**A**) junger und (**B**) alter und drei Tage stimulierter CD8⁺ T-Zellen (**D**) junger und (**E**) alter Mäuse. (**C**) zeigt die prozentualen Anteile der einzelnen untersuchten Subtypen für die unstimulierten CD8⁺ T-Zellen junger (schwarze Balken, n = 55) und alter (rote Balken, n = 50) Mäuse. In (**F**) sind die prozentualen Anteile der Subtypen für drei Tage stimulierte CD8⁺ T-Zellen junger (schwarze Balken, n = 40) und alter (rote Balken, n = 32) Mäuse dargestellt. (**G**) zeigt die Veränderung der prozentualen Subtypenanteile mit voranschreitender Stimulationsdauer bis Tag 10 für die jungen und (**H**) für die alten Mäuse. Die Balkendiagramme zeigen das arithmetische Mittel + Standardfehler des arithmetischen Mittels. * p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001, **** p < 0,0001. Modifiziert aus (Angenendt et al., 2020).

Hierbei wurden die über fluoreszenzgekoppelte CD3⁺- und CD8⁺-Antikörper identifizierte CD8⁺ T-Zellen anhand ihrer Expression von CD62L und CD44 in die Subtypen T_N, T_{CM} und T_{EM} eingeteilt (Abbildung 7). Anhand der exemplarischen Konturplots in Abbildung 7A ist zu erkennen, dass die unstimulierten CD8⁺ T-Zellen der jungen Mäuse hauptsächlich aus CD62L^{high}CD44^{low/mid} T_N bestehen. Der Rest der CD8⁺ T-Zellpopulation besteht größtenteils aus CD62L^{high}CD44^{high} T_{CM} und nur wenigen CD62L^{low}CD44^{mid/high} T_{EM} (Abbildung 7A). Die

unstimulierten Zellen der alten Mäuse weisen im Gegensatz zu denen der jungen einen wesentlich schwächer ausgeprägten T_N -Anteil auf, dafür aber deutlich größere relative Anteile an T_{CM} und allem voran T_{EM} (Abbildung 7B). Die Ergebnisse der Quantifizierung der Subtypenanteile ergeben für die unstimulierten $CD8^+$ T-Zellen alter Mäuse (rote Balken) einen signifikant um 76,41 % ($p < 0,0001$) reduzierten Anteil an T_N im Vergleich zu denen junger Mäuse (schwarze Balken) (Abbildung 7C). Sowohl die Anteile der T_{CM} als auch die der T_{EM} sind für die unstimulierten Zellen altersbedingt signifikant um 139,65 % ($p < 0,0001$) und 658,15 % ($p < 0,0001$) erhöht (Abbildung 7C). Nach drei Tagen Stimulation kommt es bei beiden Altersgruppen zu einer stimulationsbedingten Reduktion des T_N -Anteils und einem Anstieg des T_{EM} -Anteils (Abbildung 7D, E). Der Anteil an T_{CM} nimmt für die $CD8^+$ T-Zellen der jungen Mäuse stimulationsbedingt zu (Abbildung 7D), wohingegen er für die der alten Mäuse abnimmt (Abbildung 7E). Die Quantifizierung der altersbedingten Differenz im T_{CM} -Anteil beläuft sich auf eine signifikant um 38,29 % ($p < 0,0001$) geringere relative Anzahl bei den $CD8^+$ T-Zellen der alten Mäuse (Abbildung 7F). Der Anteil an T_{EM} ist auch nach drei Tagen Stimulation für die $CD8^+$ T-Zellen der alten Mäuse signifikant höher, allerdings nur noch um 121,02 % ($p < 0,0001$) (Abbildung 7F). Der Anteil an T_N ist bei den Zellen der alten Mäuse wie vor der Stimulation immer noch signifikant um 79,12 % ($p < 0,0001$) reduziert (Abbildung 7F). Die Quantifizierung der stimulationsbedingten Veränderung innerhalb der Altersgruppen ergibt nach drei Tagen eine signifikante Reduktion des Anteils an T_N , die sich für die Zellen der jungen Mäuse auf 91,57 % ($p < 0,0001$) (Abbildung 7G) und für die der alten Mäuse auf 92,54 % ($p < 0,0001$) beläuft (Abbildung 7H). Im Gegensatz dazu steigt der prozentuale Anteil an T_{EM} bei den $CD8^+$ T-Zellen der jungen Mäuse signifikant um 542,00 % ($p < 0,0001$) (Abbildung 7G) und denen der alten Mäuse um 87,16 % ($p = 0,0042$) (Abbildung 7H). Durch die Stimulation steigt der T_{CM} -Anteil bei den Zellen der jungen Mäuse um 221,56 % ($p < 0,0001$) (Abbildung 7G) und zeigt eine nicht signifikante um 17,20 % sinkende Tendenz bei denen der alten Mäuse (Abbildung 7H). Hiernach sinkt bei beiden Altersgruppen bis zum zehnten Tag *in vitro* der Prozentsatz an T_{CM} bei zunehmendem T_{EM} -Anteil, sodass die $CD8^+$ T-Zellen der jungen Mäuse am letzten Tag der Versuchsreihe zu 86,38 % (Abbildung 7G) und die der alten Mäuse zu 90,43 % aus T_{EM} bestehen (Abbildung 7H).

Die durchflusszytometrische Analyse bestätigt somit für die verwendeten C57BL/6J-Mäuse einen altersbedingten Rückgang der T_N bei den frisch isolierten, unstimulierten $CD8^+$ T-Zellen bei gleichzeitiger Zunahme der T_{CM} - und T_{EM} -Populationen. Die Stimulation über anti-CD3-/anti-CD28-antikörpergekoppelte Beads verursacht bis zum dritten Tag bei den $CD8^+$ T-Zellen der jungen Mäuse zunächst eine Zunahme beider $CD8^+$ Gedächtniszellsubpopulationen. Ab dem vierten Stimulationstag gehen dann die Anteile an T_{CM} zurück, wohingegen die der T_{EM} zunehmen. Bei den Zellen der alten Mäuse findet letzteres schon ab dem dritten Tag der Stimulation statt.

5.2. Das Alter reduziert Ca^{2+} -Signale muriner CD8^+ T-Zellen

Ca^{2+} ist als sekundärer Botenstoff an einer Vielzahl physiologischer Prozesse beteiligt, die für eine korrekte Funktionalität von CD8^+ T-Zellen von essentieller Bedeutung sind (Berridge et al., 2000; Dolmetsch, Lewis, Goodnow, & Healy, 1997; Kuklina, 2013; Srinivasan & Frauwirth, 2009; Zheng, Zha, & Gajewski, 2008). Hierunter fallen unter anderem Proliferation (Berridge, 1995), Differenzierung (Kim et al., 2014; Oh-Hora et al., 2008) oder die an der zytotoxischen Funktion mitbeteiligte Exozytose lytischer Granula (Pores-Fernando & Zweifach, 2009; X. Zhou et al., 2018). Den Haupteintrittsweg von Ca^{2+} in CD8^+ T-Zellen repräsentiert hierbei der SOCE, vermittelt über das ER-membranständige Ca^{2+} -Sensorprotein STIM und die in der Plasmamembran befindlichen Orai-Kanäle (Feske et al., 2012; Schwarz, Qu, & Hoth, 2013; Trebak & Kinet, 2019).

Bei Labormäusen wurde bei der gesamten T-Zellpopulation (Proust, Filburn, Harrison, Buchholz, & Nordin, 1987), isolierten CD4^+ T-Zellen (Grossmann et al., 1991; Philosophe & Miller, 1990; Tamura et al., 2000) und CD8^+ T-Zellen (Grossmann et al., 1991; Philosophe & Miller, 1990) bereits vor der Entdeckung der Schlüsselproteine des STIM- und Orai-vermittelten SOCE eine Reduktion der Ca^{2+} -Signale nach Mitogen- oder TZR-Stimulation beschrieben. Um diesen Effekt des Alterns auf Ca^{2+} -Signale zu reproduzieren respektive spezifischer auf den Ca^{2+} -Einstrom durch STIM-aktivierte Orai-Kanäle zu untersuchen wurde Fura2-AM-basiertes Ca^{2+} -Imaging, Whole-Cell Patch-Clamp sowie qRT-PCRs und Western Blots für hierfür relevante Proteine mit unstimulierten und stimulierten CD8^+ T-Zellen sowie gesorteten CD8^+ T-Zellsubtypen durchgeführt.

5.2.1. Reduzierte Ca^{2+} -Signale in unstimulierten CD8^+ T-Zellen alter Mäuse

Für die Untersuchung der Ca^{2+} -Signale unstimulierter CD8^+ T-Zellen über Fura2-AM-basiertes Ca^{2+} -Imaging wurden drei unterschiedliche Protokolle angewendet (Abbildung 4). Als Stimulus wurden entweder der irreversible Inhibitor der SERCA, TG, für eine Entleerung der ER- Ca^{2+} -Speicher verwendet oder anti- CD3 -Antikörper zur Aktivierung des TZR-Signalwegs. Beide Stimuli sorgen über unterschiedliche Mechanismen für einen speichergesteuerten Ca^{2+} -Einstrom. Um sich vom Stress der Isolation erholen zu können, welcher über eine Präaktivierung der Zellen zu Artefakten führen kann, wurden die unstimulierten CD8^+ T-Zellen nach ihrer Isolation aus der murinen Milz bis zu 24 Stunden ruhen gelassen, bevor ihre Ca^{2+} -Signale experimentell bestimmt und auf altersbedingte Unterschiede untersucht wurden.

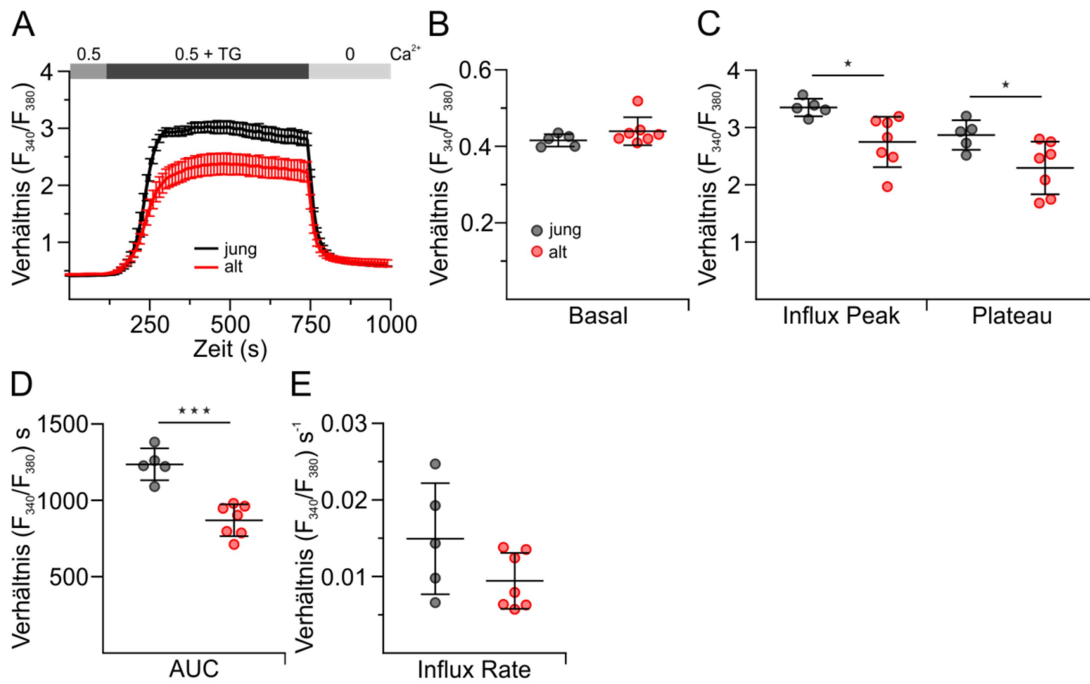


Abbildung 8: Unstimulierte $CD8^+$ T-Zellen alter Mäuse zeigen reduzierte Thapsigargin-vermittelte Ca^{2+} -Signale im kombinierten Protokoll. (A) Fura2-AM basiertes Ca^{2+} -Imaging mit 1 μ M Thapsigargin als Stimulus, appliziert in einer 0,5 mM Ca^{2+} -Ringerlösung, von unstimulierten $CD8^+$ T-Zellen junger (schwarz, $n = 5$) und alter (rot, $n = 7$) Mäuse. Der Dotplot in (B) zeigt die entsprechende statistische Analyse der basalen Ca^{2+} -Konzentration, in (C) die des Influx Peaks zu Beginn des Ca^{2+} -Signals und des Plateaus an dessen Ende. Der Dotplot in (D) zeigt die Quantifizierung des gesamten Ca^{2+} -Signals als Fläche unter der Kurve (engl. ‚area under the curve‘, AUC) und der in (E) die statistische Auswertung der Geschwindigkeit des Ca^{2+} -Signals als Influx Rate. Die Ca^{2+} -Kurven zeigen den Gesamtmittelwert der einzelnen Mittelwerte aller $CD8^+$ T-Zellen aus einer Maus \pm Standardfehler des arithmetischen Mittels. Die Dotplots zeigen die Verteilung der einzelnen Mittelwerte aller $CD8^+$ T-Zellen einer Maus sowie den Gesamtmittelwert aus diesen \pm Standardabweichung. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$. Modifiziert aus (Angenendt et al., 2020).

Abbildung 8A und Abbildung 9A zeigen neben den basalen Ca^{2+} -Levels der ruhenden $CD8^+$ T-Zellen den zeitlichen Verlauf TG-vermittelter Ca^{2+} -Signale und den anschließenden Efflux des Ca^{2+} in zwei unterschiedlichen Protokollen. Der hauptsächliche Unterschied zwischen den beiden Protokollen ist die An- bzw. Abwesenheit von Ca^{2+} in der extrazellulären Flüssigkeit bei der Applikation von TG. Beim kombinierten Protokoll in Abbildung 8A werden die unstimulierten $CD8^+$ T-Zellen in Anwesenheit von Ca^{2+} mit TG stimuliert. Dadurch finden die Entleerung der ER- Ca^{2+} -Speicher, das Öffnen der PM-ständigen Orai-Kanäle durch STIM-Proteine und der dadurch initiierte Ca^{2+} -Einstrom in die Zelle in einer direkten zeitlichen Abfolge statt.

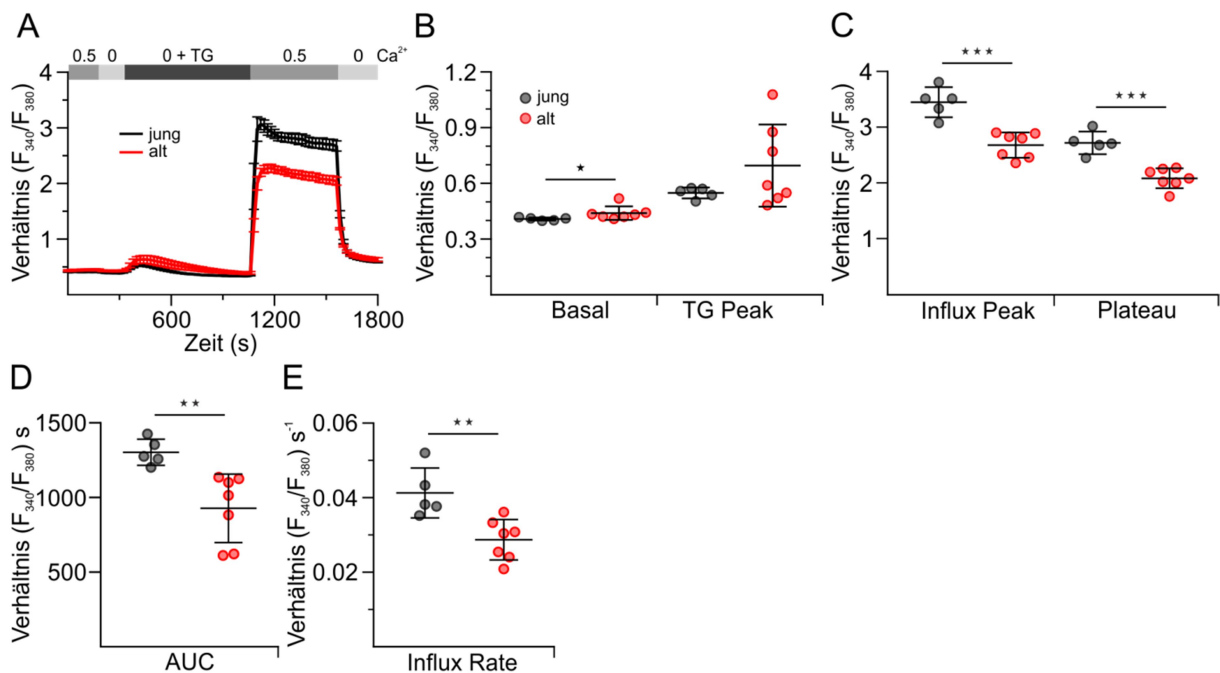


Abbildung 9: Unstimulierte CD8⁺ T-Zellen alter Mäuse zeigen reduzierte Thapsigargin-vermittelte Ca²⁺-Signale im Re-Additionsprotokoll. (A) Fura2-AM basiertes Ca²⁺-Imaging mit 1 μ M Thapsigargin (TG) als Stimulus, appliziert in einer 0 mM Ca²⁺-Ringerlösung mit 1 mM des Ca²⁺-Chelator EGTA, von unstimulierten CD8⁺ T-Zellen junger (schwarz, n = 5) und alter (rot, n = 7) Mäuse. Der Dotplot in (B) zeigt die entsprechende statistische Analyse der basalen Ca²⁺-Konzentration und des durch die TG-Applikation verursachten Peaks, in (C) die des Influx Peaks zu Beginn des Ca²⁺-Signals und des Plateaus an dessen Ende. Der Dotplot in (D) zeigt die Quantifizierung des gesamten Ca²⁺-Signals als Fläche unter der Kurve (engl. ‚area under the curve‘, AUC) und der in (E) die statistische Auswertung der Geschwindigkeit des Ca²⁺-Signals als Influx Rate. Die Ca²⁺-Kurven zeigen den Gesamtmittelwert der einzelnen Mittelwerte aller CD8⁺ T-Zellen aus einer Maus \pm Standardfehler des arithmetischen Mittels. Die Dotplots zeigen die Verteilung der einzelnen Mittelwerte aller CD8⁺ T-Zellen einer Maus sowie den Gesamtmittelwert aus diesen \pm Standardabweichung. * p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001, **** p < 0,0001. Modifiziert aus (Angenendt et al., 2020).

Beim Re-Additionsprotokoll in Abbildung 9A hingegen werden die Zellen in einer Ca²⁺-freien, EGTA-haltigen Ringerlösung mit TG stimuliert, bevor sie in einem anschließenden Spülschritt erneut einer Ca²⁺-haltigen Ringerlösung ausgesetzt werden. Daher erfolgen zunächst nur die TG-vermittelte ER-Ca²⁺-Speicherentleerung und das Öffnen der Orai-Kanäle. Erst nachdem die CD8⁺ T-Zellen erneut Ca²⁺ in der extrazellulären Flüssigkeit ausgesetzt worden sind erfolgt der SOCE.

Die basalen Ca²⁺-Level zwischen 0 s und 120 s (Abbildung 8A) respektive 185 s (Abbildung 9A) liegen in beiden Protokollen für die CD8⁺ T-Zellen der alten Mäuse (rote Kurven) im Vergleich zu denen der jungen Mäuse (schwarze Kurven) geringfügig erhöht vor. Dies geht auch aus der statistischen Analyse der Ca²⁺-Level der ruhenden unstimulierten CD8⁺ T-Zellen hervor, die für die alten Mäuse um 5,48 % (Abbildung 8B) und 7,69 % (Abbildung 9B) höhere basale Ca²⁺-Level aufzeigt, und für das Re-Additionsprotokoll eine statistische Signifikanz (p = 0,0177) aufweist (Abbildung 8B). Zwischen 335 s und 1060 s erkennt man im Re-Additionsprotokoll die ER-Ca²⁺-Speicherentleerung (Abbildung 9A). Das, nach Inhibition der SERCA, über Leckströme aus dem ER ins Zytosol übertretende Ca²⁺ sorgt für eine Zunahme des Verhältnis (F₃₄₀/F₃₈₀) (Abbildung 9A). Hierbei zeigt die Kurve der CD8⁺ T-

Zellen der alten Mäuse eine stärker ausgeprägte Speicherentleerung als die der Zellen der jungen Mäuse (Abbildung 9A). Aus der Analyse geht eine Steigerung um 26,84 % hervor, die allerdings aufgrund der Heterogenität zwischen den mittleren TG-Peaks der CD8⁺ T-Zellen der untersuchten alten Mäuse keine statistische Signifikanz aufweist (Abbildung 9B). Der Influx Peak, als Maximalwert zu Beginn des Ca²⁺-Signals weist für die unstimulierten CD8⁺ T-Zellen der alten Mäuse im kombinierten Protokoll zwischen 125 s und 525 s eine signifikante Reduktion von 17,99 % ($p = 0,0157$) (Abbildung 8C) und im Re-Additionsprotokoll zwischen 1050 s und 1250 s von 22,33 % ($p = 0,0003$) (Abbildung 9C) zu denen der jungen Mäuse auf. Bei der endständigen Plateauphase des Ca²⁺-Signals vor dem Efflux liegt für die CD8⁺ T-Zellen der alten im Vergleich zu denen der jungen Mäuse im kombinierten Protokoll zwischen 610 s und 660 s eine signifikante Reduktion von 20,02 % ($p = 0,0313$) (Abbildung 8C) und im Re-Additionsprotokoll zwischen 1450 s und 1500 s von 23,39 % ($p = 0,0002$) (Abbildung 9C) vor. Das gesamte Ca²⁺-Signal, dargestellt als AUC ist für die CD8⁺ T-Zellen der alten Mäuse signifikant im kombinierten Protokoll um 28,81 % ($p = 0,0062$) (Abbildung 8D) und im Re-Additionsprotokoll um 29,64 % ($p = 0,0001$) (Abbildung 9D) reduziert. Auch die Geschwindigkeit der Signalentstehung als Δ Verhältnis (F_{340}/F_{380})/ Δ Zeit ist bei den CD8⁺ T-Zellen der alten im Vergleich zu denen der jungen Mäuse vermindert (Abbildung 8E, Abbildung 9E). Beim kombinierten Protokoll liegt hierfür aufgrund einer hohen Varianz bei den CD8⁺ T-Zellen der Mäuse aus der gleichen Altersgruppe nur eine Tendenz ohne Signifikanz vor (Abbildung 8E). Beim Re-Additionsprotokoll kommt es für die Ca²⁺-Influxrate hingegen zu einer deutlicheren, signifikanten Reduktion um 30,42 % ($p = 0,0049$) für die T-Zellen der alten Mäuse (Abbildung 9E).

TG-vermittelte Ca²⁺-Signale eignen sich hervorragend für die Untersuchung des SOCE. Allerdings entsprechen die dadurch verursachten einheitlichen, langandauernden Erhöhungen der $[Ca^{2+}]_{int}$ nicht den physiologischen Ca²⁺-Signalen, wie beispielsweise nach einer Aktivierung des TZR (Parekh, 2011). Die TZR-Aktivierung verursacht diverse Ca²⁺-Signale. Hierunter fallen einzelne temporäre Erhöhungen der $[Ca^{2+}]_{int}$, sogenannte Spikes, andauernde Oszillationen der $[Ca^{2+}]_{int}$ oder, ähnlich wie bei TG, Ca²⁺-Plateaus sowie Kombinationen aus diesen Signaltypen (Lewis, 2001). Um mögliche altersbedingte Unterschiede in physiologischeren Ca²⁺-Signalen zu untersuchen, wurde daher Ca²⁺-Imaging mit einem aktivierenden anti-CD3 ϵ -Antikörper als Stimulus anstelle von TG durchgeführt (Abbildung 10). Dieser sorgt über seine Bindung an den TZR/CD3-Komplex für eine IP₃-vermittelte ER-Ca²⁺-Speicherentleerung, die Aktivierung von STIM-Proteinen, die Öffnung plasmamembranständiger Orai-Kanäle und damit für einen SOCE (Sarkadi, Tordai, Homolya, Scharff, & Gárdos, 1991).

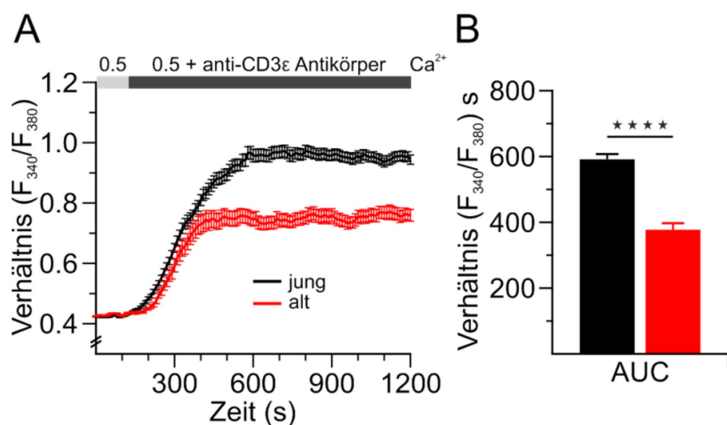


Abbildung 10: Unstimulierte CD8⁺ T-Zellen alter Mäuse weisen verminderte T-Zellrezeptor-vermittelte Ca²⁺-Signale auf. (A) Fura2-AM basiertes Ca²⁺-Imaging mit 2 µg/ml anti-CD3-Antikörper als Stimulus, appliziert in einer 0,5 mM Ca²⁺-Ringerlösung, von unstimulierten CD8⁺ T-Zellen junger (schwarz, n = 664) und alter (rot, n = 327) Mäuse. Das Balkendiagramm in (B) zeigt das arithmetische Mittel der Flächen unter der Kurve (engl. 'area under the curve', AUC) aus allen vermessenen CD8⁺ T-Zellen einer Altersgruppe + Standardfehler des arithmetischen Mittels. Die Ca²⁺-Kurven zeigen den Mittelwert aller vermessenen CD8⁺ T-Zellen einer Altersgruppe ± Standardfehler des arithmetischen Mittels. * p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001, **** p < 0,0001. Modifiziert aus (Angenendt et al., 2020).

Wie in Abbildung 10A zu erkennen ist, zeigen die unstimulierten CD8⁺ T-Zellen der alten Maus im arithmetischen Mittel auch mit physiologischerem Stimulus eine distinkte Reduktion der Ca²⁺-Signalhöhe um 20,89 %. Auch die mittlere Influx Rate ist um 11,14 % langsamer als bei den Zellen der jungen Maus und die Signalentstehung wirkt zeitlich nach hinten versetzt (Abbildung 10A). Das gesamte Ca²⁺-Signal, dargestellt als AUC ist für die CD8⁺ T-Zellen der alten Maus signifikant um 36,17 % (p < 0,0001) reduziert (Abbildung 10B).

Die Ergebnisse der Versuche zu Abbildung 8 bis Abbildung 10 wurden mit CD8⁺ T-Zellen, die in 0,5 mM Ca²⁺-Ringerlösung vermessen wurden produziert, um potenzielle altersbedingte Unterschiede besser auflösen zu können. Um einen Eindruck zu gewinnen, ob der beschriebene Effekt auch bei einer physiologisch relevanteren [Ca²⁺]_{ext} zu beobachten ist oder sich möglicherweise durch die Bereitstellung einer höheren Konzentration relativiert, wurden die Versuche zu Abbildung 8 und Abbildung 9 erneut mit 2 mM Ca²⁺-Ringerlösung durchgeführt.

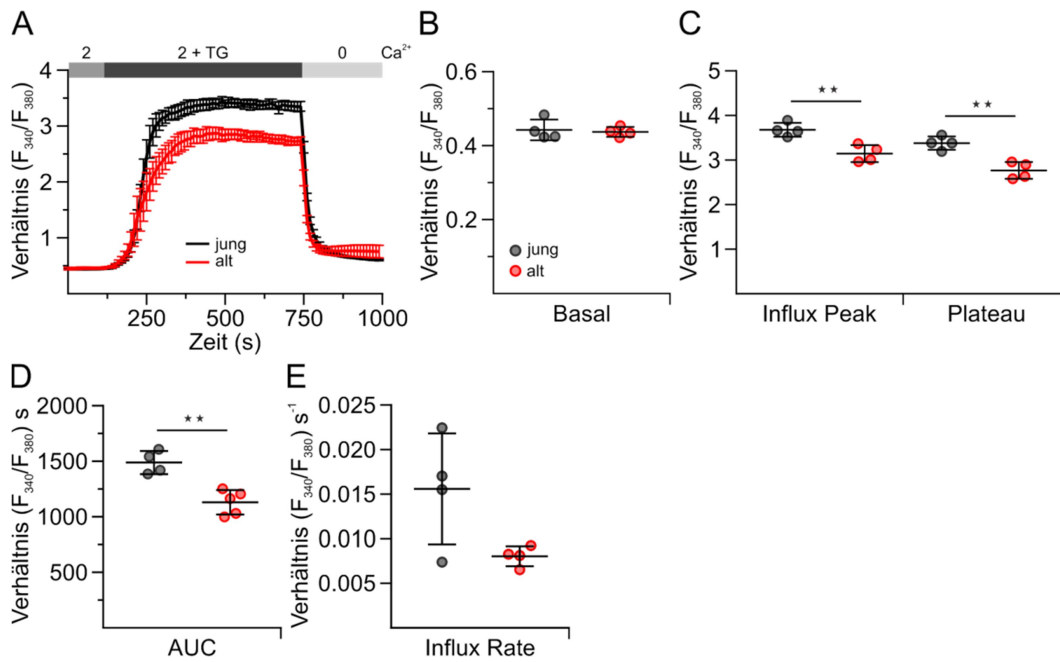


Abbildung 11: Unstimulierte CD8⁺ T-Zellen alter Mäuse zeigen reduzierte Thapsigargin-vermittelte Ca²⁺-Signale im kombinierten Protokoll mit näherungsweise physiologischer extrazellulärer Ca²⁺-Konzentration. (A) Fura2-AM basiertes Ca²⁺-Imaging mit 1 μ M Thapsigargin als Stimulus, appliziert in einer 2 mM Ca²⁺-Ringerlösung, von unstimulierten CD8⁺ T-Zellen junger (schwarz, n = 4) und alter (rot, n = 4) Mäuse. Der Dotplot in (B) zeigt die entsprechende statistische Analyse der basalen Ca²⁺-Konzentration, in (C) die des Influx Peaks zu Beginn des Ca²⁺-Signals und des Plateaus an dessen Ende. Der Dotplot in (D) zeigt die Quantifizierung des gesamten Ca²⁺-Signals als Fläche unter der Kurve (engl. ‚area under the curve‘, AUC) und der in (E) die statistische Auswertung der Geschwindigkeit des Ca²⁺-Signals als Influx Rate. Die Ca²⁺-Kurven zeigen den Gesamtmittelwert der einzelnen Mittelwerte aller CD8⁺ T-Zellen aus einer Maus \pm Standardfehler des arithmetischen Mittels. Die Dotplots zeigen die Verteilung der einzelnen Mittelwerte aller CD8⁺ T-Zellen einer Maus sowie den Gesamtmittelwert aus diesen \pm Standardabweichung. * p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001, **** p < 0,0001. Modifiziert aus (Angenendt et al., 2020).

Die basalen Ca²⁺-Level liegen mit 2 mM $[Ca^{2+}]_{ext}$ in beiden Protokollen im Gegensatz zu den Versuchen mit 0,5 mM $[Ca^{2+}]_{ext}$ für die CD8⁺ T-Zellen der alten Mäuse (rote Kurven) im Vergleich zu denen der jungen Mäuse (schwarze Kurven) unmerklich reduziert vor (Abbildung 11A, Abbildung 12A). Die statistischen Analyse der basalen Ca²⁺-Level der unstimulierten CD8⁺ T-Zellen zeigt für die alten Mäuse eine Reduktion um 1,22 % (Abbildung 11B) im kombinierten und um 0,51 % im Re-Additionsprotokoll (Abbildung 12B).

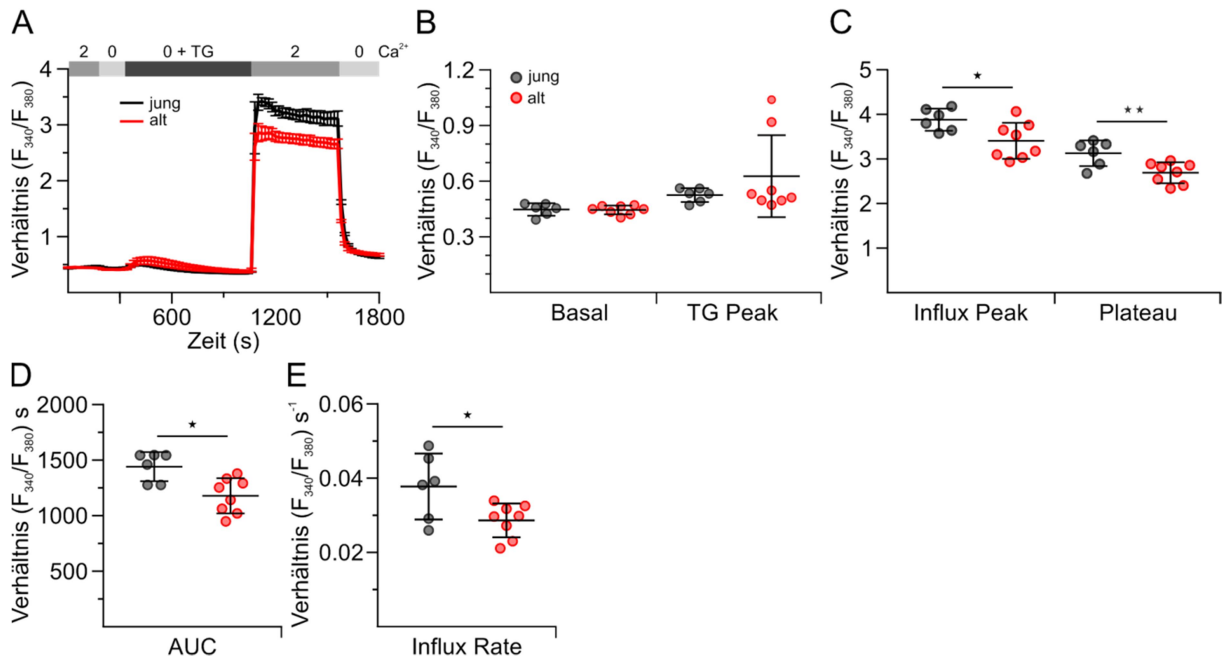


Abbildung 12: Unstimulierte CD8⁺ T-Zellen alter Mäuse zeigen reduzierte Thapsigargin-vermittelte Ca²⁺-Signale im Re-Additionsprotokoll mit näherungsweise physiologischer extrazellulärer Ca²⁺-Konzentration. (A) Fura2-AM basiertes Ca²⁺-Imaging mit 1 µM Thapsigargin (TG) als Stimulus, appliziert in einer 0 mM Ca²⁺-Ringerlösung mit 1 mM des Ca²⁺-Chelator EGTA, von unstimulierten CD8⁺ T-Zellen junger (schwarz, n = 6) und alter (rot, n = 8) Mäuse. Der Dotplot in (B) zeigt die entsprechende statistische Analyse der basalen Ca²⁺-Konzentration und des durch die TG-Applikation verursachten Peaks, in (C) die des Influx Peaks zu Beginn des Ca²⁺-Signals und des Plateaus an dessen Ende. Der Dotplot in (D) zeigt die Quantifizierung des gesamten Ca²⁺-Signals als Fläche unter der Kurve (engl. 'area under the curve', AUC) und der in (E) die statistische Auswertung der Geschwindigkeit des Ca²⁺-Signals als Influx Rate. Die Ca²⁺-Kurven zeigen den Gesamtmittelwert der einzelnen Mittelwerte aller CD8⁺ T-Zellen aus einer Maus ± Standardfehler des arithmetischen Mittels. Die Dotplots zeigen die Verteilung der einzelnen Mittelwerte aller CD8⁺ T-Zellen einer Maus sowie den Gesamtmittelwert aus diesen ± Standardabweichung. * p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001, **** p < 0,0001. Modifiziert aus (Angenendt et al., 2020).

Der TG-bedingte Peak im Re-Additionsprotokoll fällt für die Kurve der CD8⁺ T-Zellen alter Mäuse deutlicher aus als für die der jungen Mäuse (Abbildung 12A). Aus der Analyse geht eine Steigerung um 19,41 % hervor, die wie auch schon bei 0,5 mM [Ca²⁺]_{ext} aufgrund der hohen Varianz keine statistische Signifikanz aufweist (Abbildung 12B). Der Influx Peak ist für die unstimulierten CD8⁺ T-Zellen der alten Mäuse im kombinierten Protokoll signifikant um 14,52 % (p = 0,0049) (Abbildung 11C) und im Re-Additionsprotokoll um 12,19 % (p = 0,0269) (Abbildung 12C) reduziert. Bei der endständigen Plateauphase des Ca²⁺-Signals liegt für die CD8⁺ T-Zellen der alten im Vergleich zu denen der jungen Mäuse im kombinierten Protokoll eine signifikante Reduktion um 18,12 % (p = 0,0022) (Abbildung 11C) und im Re-Additionsprotokoll um 13,98 % (p = 0,0087) (Abbildung 12C) vor. Das gesamte Ca²⁺-Signal, dargestellt als AUC, ist für die CD8⁺ T-Zellen der alten Maus im kombinierten Protokoll signifikant um 24,04 % (p = 0,0016) (Abbildung 11D) und im Re-Additionsprotokoll um 18,24 % (p = 0,0190) (Abbildung 12D) reduziert. Die Reduktion der Geschwindigkeit der Signalentstehung bei CD8⁺ T-Zellen alter Mäuse ist wie bei den Messungen mit 0,5 mM [Ca²⁺]_{ext} beim kombinierten Protokoll aufgrund einer hohen Varianz nur eine Tendenz ohne Signifikanz (Abbildung 11E). Beim Re-Additionsprotokoll kommt es jedoch auch zu einer

deutlicheren, signifikanten Reduktion um 24,16 % ($p = 0,0269$) für die Ca^{2+} -Influxrate der CD8^+ T-Zellen der alten Mäuse (Abbildung 12E).

Zusammengefasst kommt es zu einer deutlichen, signifikanten altersbedingten Reduktion der Ca^{2+} -Signalhöhe unstimulierter CD8^+ T-Zellen und einer Verlangsamung der Geschwindigkeit des Ca^{2+} -Signals. Das basale $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{int}}$ liegt bei den T-Zellen alter Mäuse geringfügig erhöht vor. Diese Ergebnisse treffen sowohl für TG- als auch für anti-CD3-antikörperstimulierte CD8^+ T-Zellen zu. Weiterhin ist der Effekt bei der subphysiologischen Konzentration von 0,5 mM $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ext}}$ und der physiologischeren von 2 mM $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ext}}$ nachweisbar. Zudem ist die in den Re-Additionsprotokollen ersichtliche ER- Ca^{2+} -Speicherentleerung im Alter tendenziell erhöht.

5.2.2. Reduzierte Ca^{2+} -Signale in stimulierten CD8^+ T-Zellen alter Mäuse

Erkennt eine naive CD8^+ T-Zelle im Falle einer Virusinfektion oder Krebserkrankung mit ihrem TZR ihr von der jeweiligen Zielzelle in einem MHC-Klasse-1-Komplex präsentiertes, spezifisches Antigen, kommt es zu einer Aktivierung der T-Zelle. Diese Aktivierung führt zur klonalen Expansion der T-Zelle und die Differenzierung zur zytotoxischen CD8^+ Effektor-T-Zelle. Gleiches gilt für Gedächtnis-T-Zellen, die bei einer Reinfektion oder, im Falle von Krebs, bei einem Rezidiv erneut auf ihr bekanntes Antigen treffen (Murphy & Weaver, 2018). Um die Ca^{2+} -Signale aktivierter T-Zellen zu untersuchen, wie sie im Falle einer Erkrankung im Körper vorliegen, wurde Ca^{2+} -Imaging mit CD8^+ T-Zellen durchgeführt, die zuvor für drei Tage mit anti-CD3-/anti-CD28-antikörpergekoppelten Beads stimuliert wurden. Hierbei simuliert die Aktivierung des TZR-assoziierten CD3-Rezeptors und des co-stimulatorischen CD28 Oberflächenproteins die physiologische Aktivierung des TZR/CD3-Komplexes.

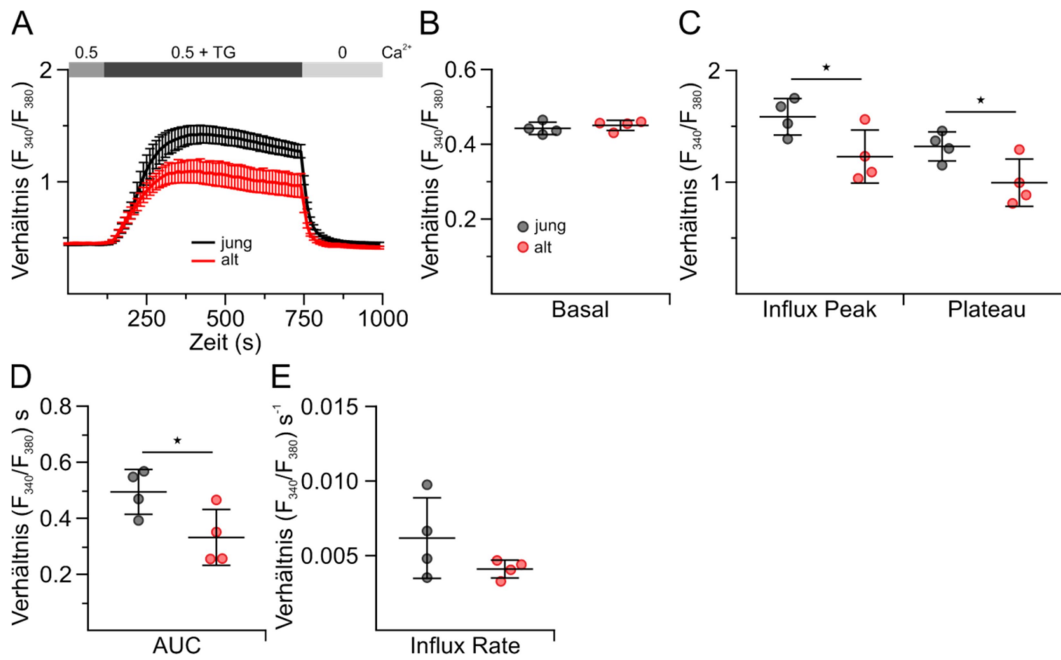


Abbildung 13: Stimulierte CD8⁺ T-Zellen alter Mäuse zeigen reduzierte Thapsigargin-vermittelte Ca²⁺-Signale im kombinierten Protokoll. (A) Fura2-AM basiertes Ca²⁺-Imaging mit 1 μ M Thapsigargin als Stimulus, appliziert in einer 0,5 mM Ca²⁺-Ringerlösung, von stimulierten CD8⁺ T-Zellen junger (schwarz, n = 4) und alter (rot, n = 4) Mäuse. Der Dotplot in (B) zeigt die entsprechende statistische Analyse der basalen Ca²⁺-Konzentration, in (C) die des Influx Peaks zu Beginn des Ca²⁺-Signals und des Plateaus an dessen Ende. Der Dotplot in (D) zeigt die Quantifizierung des gesamten Ca²⁺-Signals als Fläche unter der Kurve (engl. ‚area under the curve‘, AUC) und der in (E) die statistische Auswertung der Geschwindigkeit des Ca²⁺-Signals als Influx Rate. Die Ca²⁺-Kurven zeigen den Gesamtmittelwert der einzelnen Mittelwerte aller CD8⁺ T-Zellen aus einer Maus \pm Standardfehler des arithmetischen Mittels. Die Dotplots zeigen die Verteilung der einzelnen Mittelwerte aller CD8⁺ T-Zellen einer Maus sowie den Gesamtmittelwert aus diesen \pm Standardabweichung. * p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001, **** p < 0,0001. Modifiziert aus (Angenendt et al., 2020).

Bei den aktivierten CD8⁺ T-Zellen zeigen die basalen Ca²⁺-Levels zwischen 0 s und 120 s (Abbildung 13A), respektive 185 s (Abbildung 14A) in beiden Protokollen für die CD8⁺ T-Zellen der alten Mäuse (rote Kurven) keine deutlichen Unterschiede zu denen der jungen Mäuse (schwarze Kurven). Im kombinierten Protokoll sind sie geringfügig erhöht (Abbildung 13A) und im Re-Additionsprotokoll reduziert (Abbildung 14A). Dies geht auch aus der statistischen Analyse der basalen Ca²⁺-Levels hervor (Abbildung 13B, Abbildung 14B).

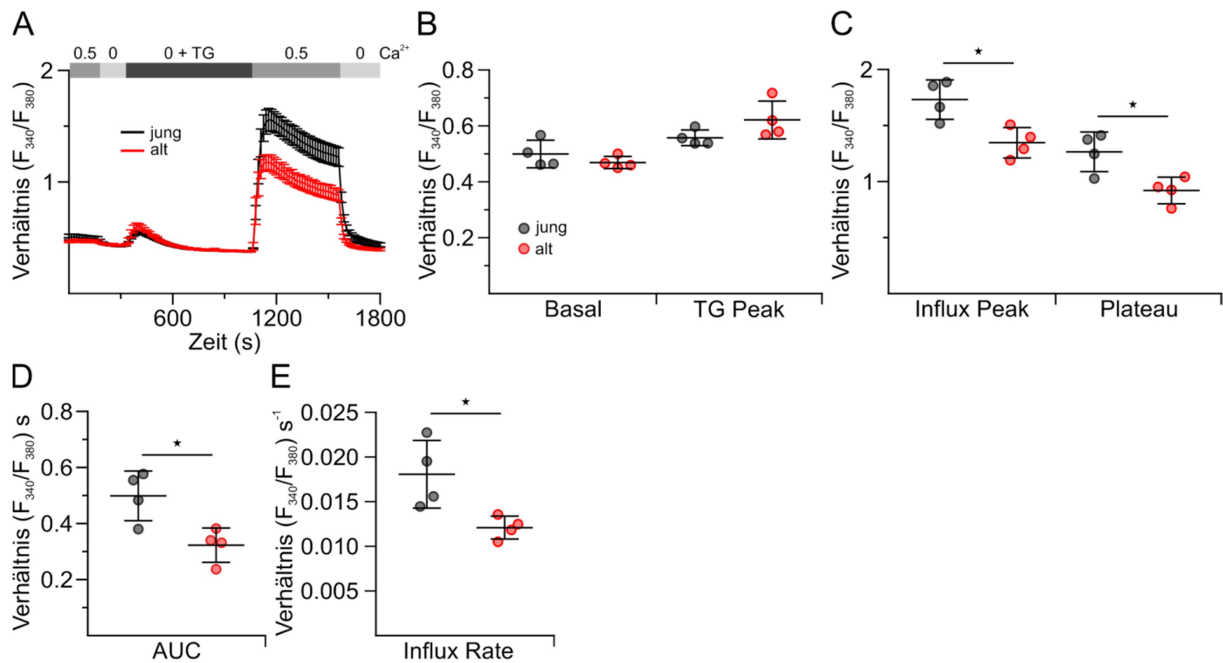


Abbildung 14: Stimulierte CD8⁺ T-Zellen alter Mäuse zeigen reduzierte Thapsigargin-vermittelte Ca²⁺-Signale im Re-Additionsprotokoll. (A) Fura2-AM basiertes Ca²⁺-Imaging mit 1 µM Thapsigargin (TG) als Stimulus, appliziert in einer 0 mM Ca²⁺-Ringerlösung mit 1 mM des Ca²⁺-Chelator EGTA, von stimulierten CD8⁺ T-Zellen junger (schwarz, n = 4) und alter (rot, n = 4) Mäuse. Der Dotplot in (B) zeigt die entsprechende statistische Analyse der basalen Ca²⁺-Konzentration und des durch die TG-Applikation verursachten Peaks, in (C) die des Influx Peaks zu Beginn des Ca²⁺-Signals und des Plateaus an dessen Ende. Der Dotplot in (D) zeigt die Quantifizierung des gesamten Ca²⁺-Signals als Fläche unter der Kurve (engl. ‚area under the curve‘, AUC) und der in (E) die statistische Auswertung der Geschwindigkeit des Ca²⁺-Signals als Influx Rate. Die Ca²⁺-Kurven zeigen den Gesamtmittelwert der einzelnen Mittelwerte aller CD8⁺ T-Zellen aus einer Maus ± Standardfehler des arithmetischen Mittels. Die Dotplots zeigen die Verteilung der einzelnen Mittelwerte aller CD8⁺ T-Zellen einer Maus sowie den Gesamtmittelwert aus diesen ± Standardabweichung. * p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001, **** p < 0,0001. Modifiziert aus (Angenendt et al., 2020).

Bei der ER-Ca²⁺-Speicherentleerung zwischen 335 s und 1060 s erkennt man im Re-Additionsprotokoll wie auch schon für die unstimulierten CD8⁺ T-Zellen bei den Zellen der alten Mäuse eine etwas stärker ausgeprägte Speicherentleerung als bei denen der jungen Mäuse (Abbildung 14A). Diese Tendenz weist bei den stimulierten T-Zellen ebenfalls keine statistische Signifikanz auf (Abbildung 14B). Die Ca²⁺-Signalhöhen betreffend fällt zunächst auf, dass die der stimulierten CD8⁺ T-Zellen beider Altersgruppen (Abbildung 13A, Abbildung 14A) im Vergleich zu denen der entsprechenden unstimulierten (Abbildung 8A, Abbildung 9A) um etwa 59,63 % bis 62,09 % niedriger ausfällt. Beim Vergleich zwischen stimulierten CD8⁺ T-Zellen junger und alter Mäuse weist der Influx Peak im kombinierten Protokoll zwischen 125 s und 525 s eine signifikante Reduktion von 22,45 % (p = 0,0480) (Abbildung 13C) und im Re-Additionsprotokoll zwischen 1050 s und 1250 s von 22,22 % (p = 0,0127) (Abbildung 14C) für die Zellen der alten Mäuse auf. Bei der endständigen Plateauphase des Ca²⁺-Signals vor dem Efflux liegt für die CD8⁺ T-Zellen der alten im Vergleich zu denen der jungen Mäuse im kombinierten Protokoll zwischen 610 s und 660 s eine signifikante Reduktion von 24,59 % (p = 0,0399) (Abbildung 13C) und im Re-Additionsprotokoll zwischen 1450 s und 1500 s von 27,28 % (p = 0,0165) (Abbildung 14C) vor. Die AUC des Ca²⁺-Signals

ist für die CD8⁺ T-Zellen der alten Mäuse signifikant im kombinierten Protokoll um 32,85 % ($p = 0,0442$) (Abbildung 13D) und im Re-Additionsprotokoll um 35,35 % ($p = 0,0169$) (Abbildung 14D) reduziert. Die Geschwindigkeit der Signalentstehung als Δ Verhältnis (F_{340}/F_{380})/ Δ Zeit ist, wie bei den unstimulierten CD8⁺ T-Zellen, für die stimulierten T-Zellen der alten im Vergleich zu denen der jungen Mäuse vermindert (Abbildung 13E, Abbildung 14E). Beim kombinierten Protokoll liegt hierfür aufgrund einer hohen Varianz zwischen den T-Zellen der jungen Mäuse nur eine Tendenz ohne Signifikanz vor (Abbildung 13E). Beim Re-Additionsprotokoll kommt es für die Ca²⁺-Influxrate hingegen zu einer prominenteren, signifikanten Reduktion um 33,08 % ($p = 0,0243$) für die T-Zellen der alten Mäuse (Abbildung 14E).

Um mögliche altersbedingte Unterschiede in physiologischeren Ca²⁺-Signalen zu untersuchen wurde, wie auch für die unstimulierten CD8⁺ T-Zellen, Ca²⁺-Imaging mit einem aktivierenden anti-CD3 ϵ -Antikörper als Stimulus anstelle von TG durchgeführt. Wie in Kapiteln 4.2.6 und 5.2.1 beschrieben, sorgt die Bindung an den TZR/CD3-Komplex über eine IP₃-vermittelte ER-Ca²⁺-Speicherentleerung für einen SOCE.

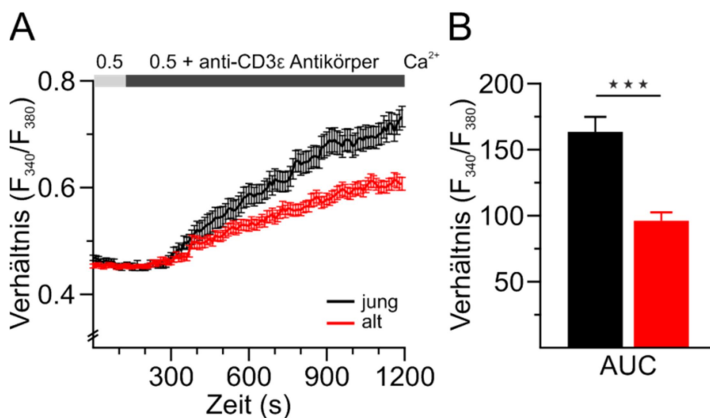


Abbildung 15: Stimulierte CD8⁺ T-Zellen alter Mäuse weisen verminderte T-Zellrezeptor-vermittelte Ca²⁺-Signale auf. (A) Fura2-AM basiertes Ca²⁺-Imaging mit 2 μ g/ml anti-CD3-Antikörper als Stimulus, appliziert in einer 0,5 mM Ca²⁺-Ringerlösung, von stimulierten CD8⁺ T-Zellen junger (schwarz, $n = 155$) und alter (rot, $n = 116$) Mäuse. Das Balkendiagramm in (B) zeigt das arithmetische Mittel der Flächen unter der Kurve (engl. ‚area under the curve‘, AUC) aus allen vermessenen CD8⁺ T-Zellen einer Altersgruppe + Standardfehler des arithmetischen Mittels. Die Ca²⁺-Kurven zeigen den Mittelwert aller vermessenen CD8⁺ T-Zellen einer Altersgruppe \pm Standardfehler des arithmetischen Mittels. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$. Modifiziert aus (Angenendt et al., 2020).

Wie in Abbildung 15A zu erkennen ist, zeigen die stimulierten CD8⁺ T-Zellen der alten Maus auch mit dem physiologischeren Stimulus eine sichtbare Reduktion der Ca²⁺-Signalhöhe um 14,66 % im Mittelwert. Auch die Influx Rate ist im arithmetischen Mittel um 49,93 % langsamer als bei den Zellen der jungen Maus (Abbildung 15A). Das gesamte Ca²⁺-Signal, dargestellt als AUC ist für die CD8⁺ T-Zellen der alten Maus signifikant um 41,12 % ($p = 0,0002$) reduziert (Abbildung 15B).

Wie auch schon für die unstimulierten $CD8^+$ T-Zellen in Kapitel 5.2.1, wurden die Ca^{2+} -Imagingversuche für die stimulierten $CD8^+$ T-Zellen mit einer physiologisch relevanteren $[Ca^{2+}]_{ext}$ von 2 mM wiederholt, um zu überprüfen, ob der aufgezeigte Effekt auch bei dieser höheren $[Ca^{2+}]_{ext}$ zu beobachten ist oder sich durch die höhere Ca^{2+} -Abundanz möglicherweise aufhebt.

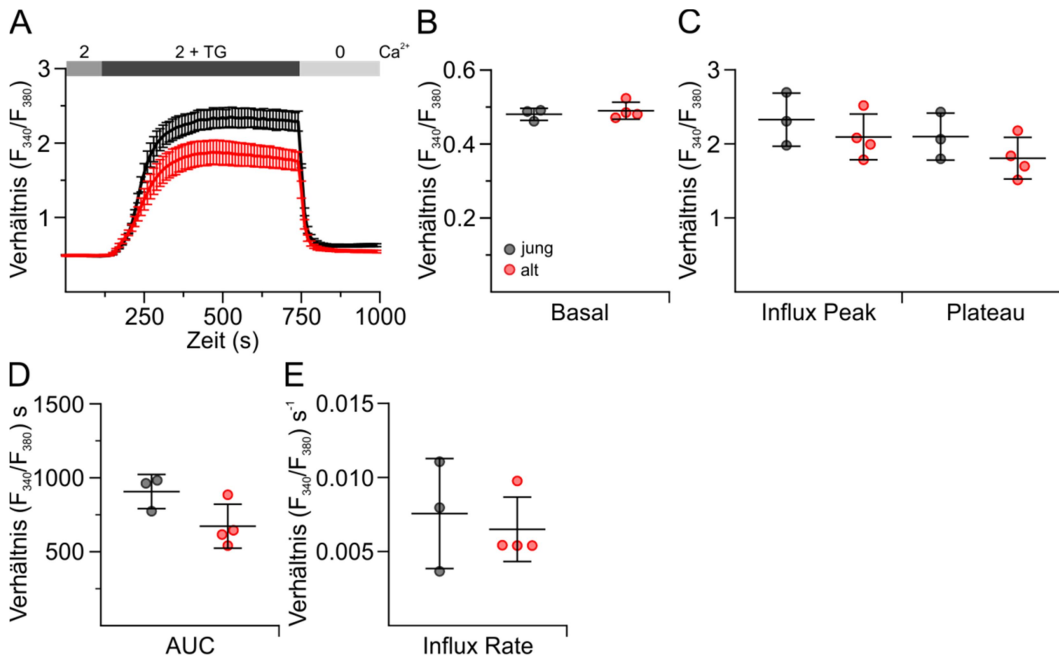


Abbildung 16: Stimulierte $CD8^+$ T-Zellen alter Mäuse zeigen reduzierte Thapsigargin-vermittelte Ca^{2+} -Signale im kombinierten Protokoll mit näherungsweise physiologischer extrazellulärer Ca^{2+} -Konzentration. (A) Fura2-AM basiertes Ca^{2+} -Imaging mit $1 \mu M$ Thapsigargin als Stimulus, appliziert in einer 2 mM Ca^{2+} -Ringerlösung, von stimulierten $CD8^+$ T-Zellen junger (schwarz, $n = 3$) und alter (rot, $n = 4$) Mäuse. Der Dotplot in (B) zeigt die entsprechende statistische Analyse der basalen Ca^{2+} -Konzentration, in (C) die des Influx Peaks zu Beginn des Ca^{2+} -Signals und des Plateaus an dessen Ende. Der Dotplot in (D) zeigt die Quantifizierung des gesamten Ca^{2+} -Signals als Fläche unter der Kurve (engl. ‚area under the curve‘, AUC) und der in (E) die statistische Auswertung der Geschwindigkeit des Ca^{2+} -Signals als Influx Rate. Die Ca^{2+} -Kurven zeigen den Gesamtmittelwert der einzelnen Mittelwerte aller $CD8^+$ T-Zellen aus einer Maus \pm Standardfehler des arithmetischen Mittels. Die Dotplots zeigen die Verteilung der einzelnen Mittelwerte aller $CD8^+$ T-Zellen einer Maus sowie den Gesamtmittelwert aus diesen \pm Standardabweichung. Modifiziert aus (Angenendt et al., 2020).

Die Ca^{2+} -Levels der ruhenden stimulierten $CD8^+$ T-Zellen liegen mit 2 mM $[Ca^{2+}]_{ext}$ in beiden Protokollen für die $CD8^+$ T-Zellen der alten Mäuse (rote Kurven) im Vergleich zu denen der jungen Mäuse (schwarze Kurven) unmerklich erhöht vor (Abbildung 16A, Abbildung 17A). Dies geht auch aus der statistischen Analyse hervor (Abbildung 16B, Abbildung 17B).

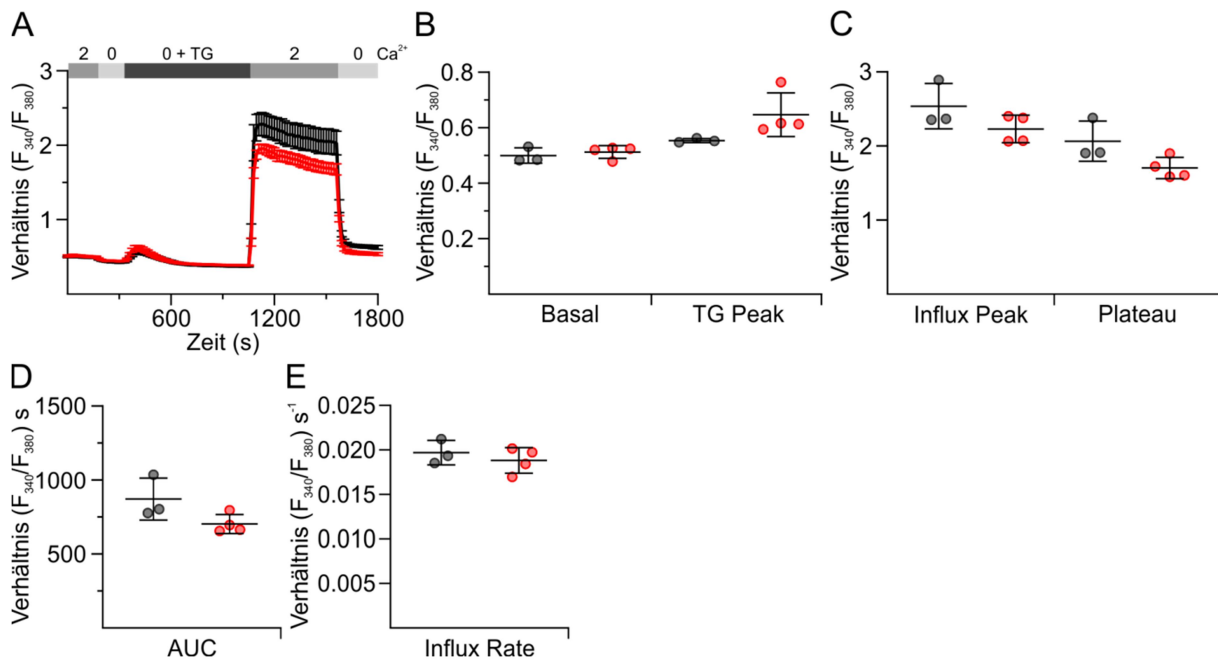


Abbildung 17: Stimulierte CD8⁺ T-Zellen alter Mäuse zeigen reduzierte Thapsigargin-vermittelte Ca²⁺-Signale im Re-Additionsprotokoll mit näherungsweise physiologischer extrazellulärer Ca²⁺-Konzentration. (A) Fura2-AM basiertes Ca²⁺-Imaging mit 1 μ M Thapsigargin (TG) als Stimulus, appliziert in einer 0 mM Ca²⁺-Ringerlösung mit 1 mM des Ca²⁺-Chelator EGTA, von stimulierten CD8⁺ T-Zellen junger (schwarz, n = 3) und alter (rot, n = 4) Mäuse. Der Dotplot in (B) zeigt die entsprechende statistische Analyse der basalen Ca²⁺-Konzentration und des durch die TG-Applikation verursachten Peaks, in (C) die des Influx Peaks zu Beginn des Ca²⁺-Signals und des Plateaus an dessen Ende. Der Dotplot in (D) zeigt die Quantifizierung des gesamten Ca²⁺-Signals als Fläche unter der Kurve (engl. ‚area under the curve‘, AUC) und der in (E) die statistische Auswertung der Geschwindigkeit des Ca²⁺-Signals als Influx Rate. Die Ca²⁺-Kurven zeigen den Gesamtmittelwert der einzelnen Mittelwerte aller CD8⁺ T-Zellen aus einer Maus \pm Standardfehler des arithmetischen Mittels. Die Dotplots zeigen die Verteilung der einzelnen Mittelwerte aller CD8⁺ T-Zellen einer Maus sowie den Gesamtmittelwert aus diesen \pm Standardabweichung. Modifiziert aus (Angenendt et al., 2020).

Im Re-Additionsprotokoll weist die Kurve der CD8⁺ T-Zellen alter Mäuse einen etwas höheren, durch die Applikation von TG bedingten Peak auf (Abbildung 17A). Aus der Analyse geht eine Steigerung des TG-Peaks um 16,84 % hervor, die jedoch bei der geringen Versuchszahl keine statistische Signifikanz aufweist (Abbildung 17B). Der Influx Peak ist für die aktivierten CD8⁺ T-Zellen der alten Mäuse im kombinierten Protokoll um 10,01 % (Abbildung 16C) und im Re-Additionsprotokoll um 12,14 % (Abbildung 17C) reduziert. Die endständige Plateauphase des Ca²⁺-Signals zeigt bei den CD8⁺ T-Zellen der alten Mäuse im kombinierten Protokoll eine Reduktion um 13,91 % (Abbildung 16C) und im Re-Additionsprotokoll um 17,53 % (Abbildung 17C) auf. Die AUCs der Ca²⁺-Kurven CD8⁺ T-Zellen alter Mäuse sind im kombinierten Protokoll um 25,84 % (Abbildung 16D) und im Re-Additionsprotokoll um 19,40 % (Abbildung 17D) vermindert. Auch die Geschwindigkeit der Signalentstehung bei CD8⁺ T-Zellen alter Mäuse ist um 14,03 % im kombinierten (Abbildung 16E) und um 4,47 % im Re-Additionsprotokoll (Abbildung 17E) reduziert. Aufgrund der geringen Versuchszahl ($n_{\text{jung}} = 3$, $n_{\text{alt}} = 4$) bei relativ hoher Varianz ist bei den stimulierten, mit 2 mM $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ext}}$ vermessenen CD8⁺ T-Zellen keiner dieser altersbedingten Unterschiede der Ca²⁺-Signalparameter signifikant.

Zusammengefasst liegt auch bei den aktivierten CD8⁺ T-Zellen eine deutliche, signifikante altersbedingte Reduktion der Ca²⁺-Signalhöhe und eine Verlangsamung der Geschwindigkeit des Ca²⁺-Signals vor. Der TG-Peak weist eine tendenzielle Erhöhung bei den stimulierten CD8⁺ T-Zellen der alten Mäuse im Vergleich zu denen der jungen Mäuse auf. Generell fallen die Ca²⁺-Signale bei stimulierten niedriger aus als bei unstimulierten CD8⁺ T-Zellen. Diese Resultate treffen sowohl auf TG- als auch auf anti-CD3-antikörperstimulierte CD8⁺ T-Zellen zu. Weiterhin verliert der Effekt bei stimulierten, im Gegensatz zu unstimulierten CD8⁺ T-Zellen, bei einer physiologischen Konzentration von 2 mM [Ca²⁺]_{ext} im Vergleich zur subphysiologischen von 0,5 mM [Ca²⁺]_{ext} seine Signifikanz. Dies könnte allerdings den geringen Versuchszahlen geschuldet sein und eine Signifikanz vermutlich durch Wiederholung der Versuche erreicht werden. Zudem fällt, im Gegensatz zu den unstimulierten CD8⁺ T-Zellen, bei den stimulierten Zellen die altersbedingte Steigerung der in den Re-Additionsprotokollen ersichtlichen ER-Ca²⁺-Speicherentleerung geringer aus.

5.2.3. Reduzierte Ca²⁺-Signale in gesorteten CD8⁺ zentralen und Effektor-Gedächtnis-T-Zellen

Wie schon in Kapitel 3.2.2 beschrieben, ist die altersbedingte Veränderung der Subtypenverteilung von T-Zellen ein Merkmal der Immunoseneszenz. Hierbei kommt es in älteren Individuen zu einer Zunahme an Gedächtnis-T-Zellen, wohingegen die Anzahl an naiven CD8⁺ T-Zellen abnimmt (Abbildung 7) (Grossmann et al., 1991; Pinchuk & Filipov, 2008; Quinn et al., 2018). Um mögliche Unterschiede in den Ca²⁺-Signalen von CD8⁺ T-Zellsubtypen und deren Beteiligung an der altersbedingten Reduktion der Ca²⁺-Signale der Gesamtpopulation zu untersuchen, wurde Ca²⁺-Imaging mit den beiden prädominierenden T-Zellsubtypen stimulierter CD8⁺ T-Zellen, T_{CM} und T_{EM}, durchgeführt.

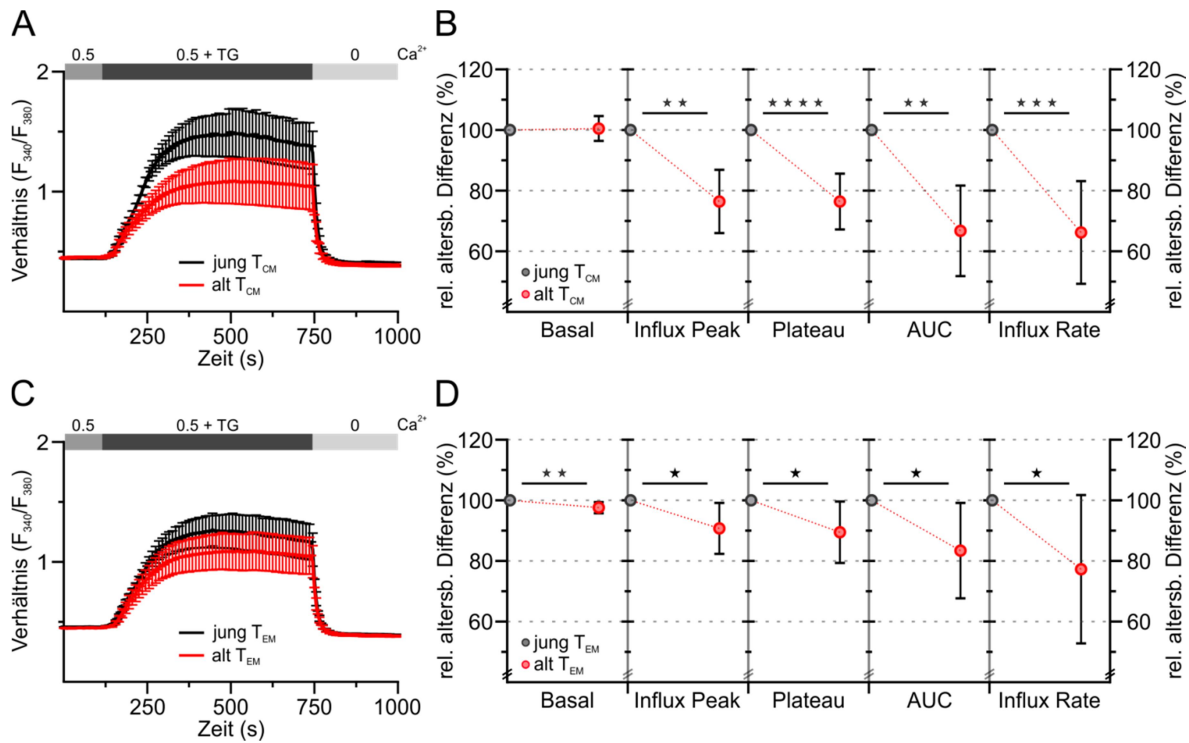


Abbildung 18: Gesortete CD8⁺ zentrale und Effektor-Gedächtnis-T-Zellen alter Mäuse zeigen reduzierte Thapsigargin-vermittelte Ca²⁺-Signale im kombinierten Protokoll. Fura2-AM basiertes Ca²⁺-Imaging mit 1 μ M Thapsigargin als Stimulus, appliziert in einer 0,5 mM Ca²⁺-Ringerlösung, von CD8⁺ (A) zentralen Gedächtnis-T-Zellen (T_{CM}) und (C) Effektor-Gedächtnis-T-Zellen (T_{EM}) junger (schwarz, n = 6) und alter (rot, n = 6) Mäuse. Die altersbedingten prozentualen Unterschiede des basalen Ca²⁺, des Influx Peaks zu Beginn und des Plateaus zum Ende des Ca²⁺-Signals, der Fläche unter der Kurve (engl. ‚area under the curve‘, AUC) und der Geschwindigkeit des Ca²⁺-Signals sind für die T_{CM} in (B) und die T_{EM} in (D) dargestellt. Die Dotplots zeigen die mittlere prozentuale Abweichung der alten von der als 100 % definierten jungen Kohorte \pm Standardabweichung. * p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001, **** p < 0,0001. Modifiziert aus (Angenendt et al., 2020).

Um diese T_{CM} und T_{EM} zu erhalten ist eine Reihe von Versuchsschritten nötig. Die CD8⁺ T-Zellen werden aus der murinen Milz isoliert, für drei Tage *in vitro* stimuliert, und schlussendlich durchflusszytometrisch in T-Zellsubtypen separiert. Da jedes dieser Verfahren einen Faktor für Zellstress darstellt und damit Einfluss auf die Ca²⁺-Signale der Zellen hat, kam es, allem voran wegen der Variabilität der Leistung des FACS, zu starken Unterschieden bei der Ca²⁺-Signalhöhe zwischen den einzelnen Versuchswochen.

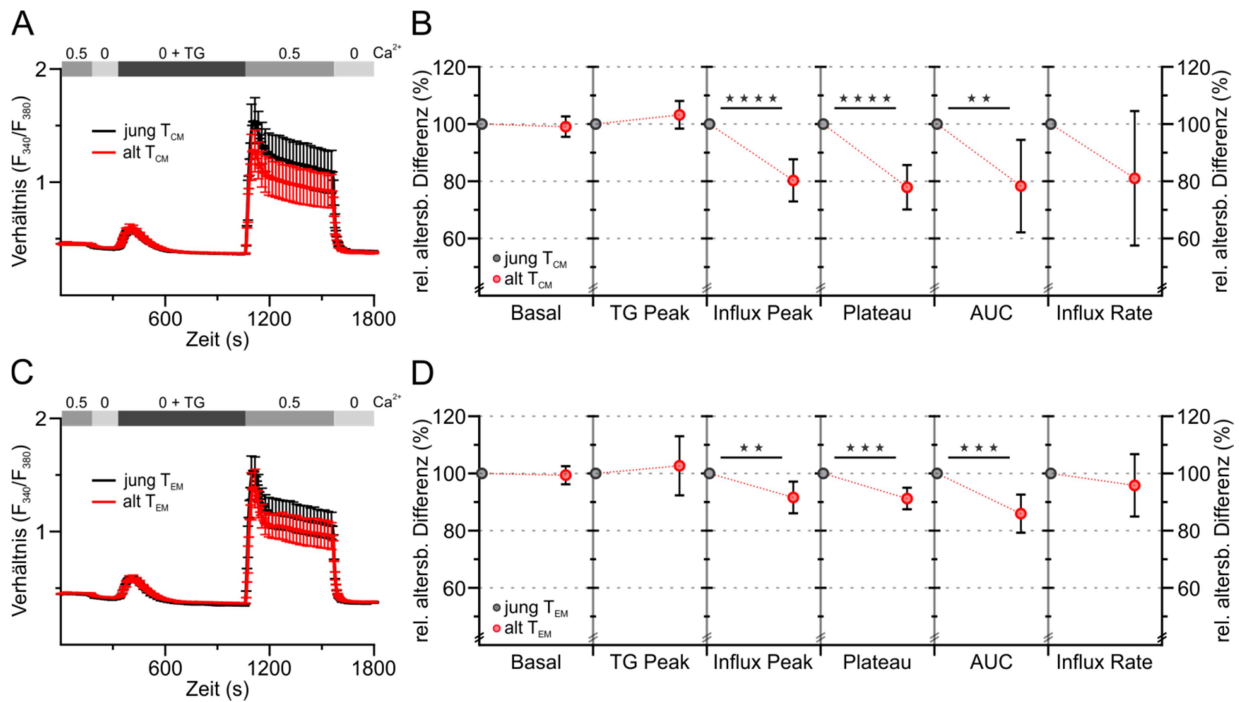


Abbildung 19: Gesortete CD8⁺ zentrale und Effektor-Gedächtnis-T-Zellen alter Mäuse zeigen reduzierte Thapsigargin-vermittelte Ca²⁺-Signale im Re-Additionsprotokoll. Fura2-AM basiertes Ca²⁺-Imaging mit 1 μM Thapsigargin (TG) als Stimulus, appliziert in einer 0 mM Ca²⁺-Ringerlösung mit 1 mM des Ca²⁺-Chelator EGTA, von CD8⁺ **(A)** zentralen Gedächtnis-T-Zellen (T_{CM}) und **(C)** Effektor-Gedächtnis-T-Zellen (T_{EM}) junger (schwarz, n = 6) und alter (rot, n = 6) Mäuse. Die altersbedingten prozentualen Unterschiede des basalen Ca²⁺, des TG-vermittelten Peaks, des Influx Peaks zu Beginn und des Plateaus zum Ende des Ca²⁺-Signals, der Fläche unter der Kurve (engl. ‚area under the curve‘, AUC) und der Geschwindigkeit des Ca²⁺-Signals sind für die T_{CM} in **(B)** und die T_{EM} in **(D)** dargestellt. Die Ca²⁺-Kurven zeigen den Gesamtmittelwert der einzelnen Mittelwerte aller CD8⁺ T-Zellen einer Maus ± Standardfehler des arithmetischen Mittels. Die Dotplots zeigen die mittlere prozentuale Abweichung der alten von der als 100 % definierten jungen Kohorte ± Standardabweichung. * p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001, **** p < 0,0001. Modifiziert aus (Angenendt et al., 2020).

Hieraus resultiert die ausgeprägte Varianz der Ca²⁺-Kurven (Abbildung 18A, Abbildung 18C, Abbildung 19A, Abbildung 19C). Daher wurden für die statistische Auswertung (Abbildung 18B, Abbildung 18D, Abbildung 19B, Abbildung 19D) die CD8⁺ T-Zellsubtypen der alten Mäuse auf die am selben Tag vermessenen der jungen Mäuse normiert, um eine präzisere Aussage über die allgemeinen altersbedingten Differenzen zwischen den Subtypen treffen zu können.

Sowohl die Ca²⁺-Kurven (Abbildung 18A, Abbildung 18C, Abbildung 19A, Abbildung 19C) als auch deren statistische Auswertung (Abbildung 18B, Abbildung 18D, Abbildung 19B, Abbildung 19D) zeigen, wie auch schon für die gesamte CD8⁺ T-Zellpopulation in Kapitel 5.2.2 beschrieben, eine altersbedingte Reduktion des Ca²⁺-Signals für beide CD8⁺ T-Zellsubtypen. Diese Reduktion ist bei den T_{CM} in beiden Messprotokollen ausgeprägter (Abbildung 18A, Abbildung 19A) als bei den T_{EM} (Abbildung 18C, Abbildung 19C). Das basale Ca²⁺ zeigt lediglich für die T_{EM} im kombinierten Protokoll eine geringe, aber signifikante Reduktion von 2,39 % (p = 0,0091) (Abbildung 18D), die im Re-Additionsprotokoll allerdings nicht vorliegt (Abbildung 19D). Beim Influx Peak zeigen die T_{CM} alter Mäuse im kombinierten Protokoll eine Reduktion von 23,54 % (p = 0,0022) (Abbildung

18B) und im Re-Additionsprotokoll von 19,69 % ($p < 0,0001$) (Abbildung 19B). Für die T_{EM} liegen die altersbedingten Reduktionen für diesen Parameter für beide Applikationsprotokolle lediglich bei 10,50 % ($p = 0,0476$) (Abbildung 18D) respektive 8,39 % ($p = 0,0040$) (Abbildung 19D). Gleiches trifft für das signalendständige Ca^{2+} Plateau zu. Bei den T_{CM} liegen die altersbedingten Reduktionen im kombinierten Protokoll bei 23,60 % ($p < 0,0001$) (Abbildung 18B) und im Re-Additionsprotokoll bei 22,08 % ($p < 0,0001$) (Abbildung 19B), wohingegen bei den T_{EM} dieser Parameter altersbedingt nur um 9,23 % ($p = 0,0226$) (Abbildung 18D) respektive 8,74 % ($p = 0,0002$) reduziert ist (Abbildung 19D). Sowohl für T_{CM} , als auch für T_{EM} sind diese Reduktionen von Ca^{2+} Influx Peak und Plateau für beide Applikationsprotokolle signifikant. Korrelierend mit Influx Peak und Plateau sind auch die AUC der Ca^{2+} -Signale in beiden Protokollen für T_{CM} und T_{EM} altersbedingt signifikant um 14,04 % bis 33,24 % ($p = 0,0274$ bis $p = 0,0004$) reduziert (Abbildung 18B, Abbildung 18D, Abbildung 19B, Abbildung 19D). Bei der Geschwindigkeit des TG-vermittelten Ca^{2+} -Signals kommt es lediglich beim physiologischeren kombinierten Protokoll zu signifikanten altersbedingten Reduktionen, die für die T_{CM} mit 33,77 % ($p = 0,0006$) (Abbildung 18B) ebenfalls höher ausfallen als für die T_{EM} mit 22,70 % ($p = 0,0464$) (Abbildung 18D). Beim Re-Additionsprotokoll liegen nicht signifikante Reduktionen von 18,94 % für die T_{CM} (Abbildung 19B) und 4,14 % für die T_{EM} (Abbildung 19D) alter Mäuse im Vergleich zu denen junger Mäuse vor.

Resümierend lässt sich bei beiden prädominierenden Subtypen stimulierter $CD8^+$ T-Zellen eine altersbedingte Reduktion der Ca^{2+} -Signalparameter mit Ausnahme der vorwiegend unveränderten basalen Ca^{2+} -Levels feststellen. Die Reduktionen fallen für die T_{CM} deutlicher aus als für die T_{EM} .

5.2.4. Schnellerer Efflux von Ca^{2+} aus $CD8^+$ T-Zellen alter Mäuse

Neben dem Ca^{2+} -Einstrom stellt natürlich auch der Ausstrom von Ca^{2+} eine bedeutende Komponente der Ca^{2+} -Homöostase dar. Zentrale Proteine für den Efflux von Ca^{2+} aus dem Zytosol von T-Zellen sind die PMCAs (Bautista et al., 2002; Donnadieu, Bismuth, & Trautmann, 1992). Diese pumpen unter Hydrolyse von ATP Ca^{2+} entgegen seines elektrochemischen Gradienten aus der Zelle in den Extrazellularraum (Abbildung 1) (Dunham & Glynn, 1961; Schatzmann, 1966). Die Effizienz der PMCA wird mitunter durch die $[Ca^{2+}]_{int}$ bestimmt, wobei höhere $[Ca^{2+}]_{int}$ zu einer schnelleren Pumprate führen (Bautista et al., 2002). Um eine Aussage über die in T-Zellen hauptsächlich über PMCA's vermittelte Extrusion von Ca^{2+} aus dem Zytosol treffen zu können wurde daher für die unstimulierten und stimulierten $CD8^+$ T-Zellen alter und junger Mäuse die Geschwindigkeitskonstante des Ca^{2+} -Ausstroms (s^{-1}) gegen die endständige Plateauphase des Ca^{2+} -Signals (Verhältnis (F_{340}/F_{380})) der jeweiligen Zellen aufgetragen (Abbildung 20). Hierfür wurden ausschließlich die Ergebnisse aus dem kombinierten Protokoll verwendet, da die Zellen in diesem

physiologischeren Protokoll vor dem finalen Ca^{2+} -Efflux im Gegensatz zum Re-Additionsprotokoll vorher nicht in einer 0 mM Ca^{2+} -Ringerlösung mit dem Ca^{2+} -Chelator EGTA verweilen.

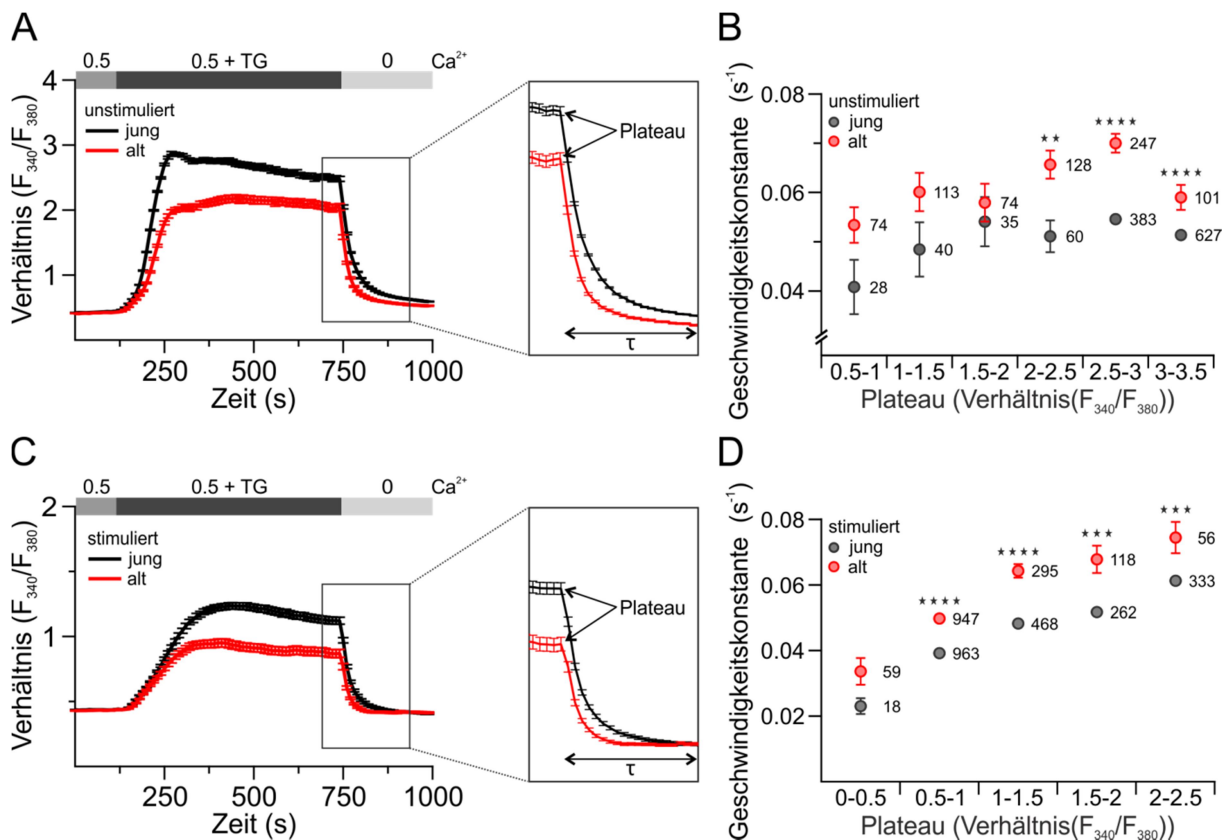


Abbildung 20: CD8⁺ T-Zellen alter Mäuse zeigen eine beschleunigte Ca²⁺-Extrusion. Exemplarische Ca²⁺-Kurven (A) unstimulierter und (C) stimulierter CD8⁺ T-Zellen junger (schwarz) und alter (rot) Mäuse mit einem Fokus auf dem Ca²⁺-Ausstrom nach 750 s zur Erläuterung der Ableitungen in (B) und (D). Die Ca²⁺-Kurven zeigen den Mittelwert aller vermessenen CD8⁺ T-Zellen (jung: $n_{\text{unstimuliert}} = 72$, $n_{\text{stimuliert}} = 397$; alt: $n_{\text{unstimuliert}} = 193$, $n_{\text{stimuliert}} = 213$) einer Altersgruppe \pm Standardfehler des arithmetischen Mittels. Die Dotplots für (B) unstimulierte und (D) stimulierte CD8⁺ T-Zellen zeigen die Mittelwerte der Geschwindigkeitskonstanten des Ca²⁺-Ausstroms ($1/\tau$) \pm Standardfehler des arithmetischen Mittels für den jeweiligen Ca²⁺-Plateaubereich vor Ca²⁺-Ausstrom für alle Zellen jeder verwendeten jungen (schwarz, $n = 4 - 5$) und alten (rot, $n = 4 - 7$) Maus. Die Stichprobenmenge pro Plateaubereich ist rechtsseitig neben dem Punkt angegeben. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$. Modifiziert aus (Angenendt et al., 2020).

Sowohl für die unstimulierten (Abbildung 20A) als auch für die stimulierten (Abbildung 20C) CD8⁺ T-Zellen alter Mäuse lässt sich in den exemplarischen Messungen eine höhere Geschwindigkeitskonstante trotz niedrigeren Ca²⁺-Plateaus im Vergleich zu CD8⁺ T-Zellen junger Mäuse erahnen. Aus der Analyse dieser beiden Parameter zueinander geht hervor, dass die CD8⁺ T-Zellen alter Mäuse generell über einen gesteigerten Ca²⁺-Ausstrom verfügen (Abbildung 20B, D). Für die unstimulierten CD8⁺ T-Zellen alter Mäuse ist die Geschwindigkeitskonstante des Ca²⁺-Ausstroms ($1/\tau$) in einem Ca²⁺-Plateaubereich zwischen 2 und 3,5 (Abbildung 20B) und für die stimulierten zwischen 0,5 und 2,5 sogar signifikant erhöht (Abbildung 20D). Hieraus folgt, dass die CD8⁺ T-Zellen alter im Vergleich zu denen junger Mäuse eine gesteigerte Ca²⁺-Ausstromgeschwindigkeit aufweisen.

Um zu untersuchen, ob diese gesteigerte Ca^{2+} -Extrusionseffizienz möglicherweise auf altersbedingten Veränderungen der PMCA-Expression beruht, wurden qRT-PCRs für die mRNA-Levels dieser Ca^{2+} -Pumpen durchgeführt (Abbildung 21). Unter den vier Isoformen der PMCA werden PMCA1 und PMCA4 ubiquitär in allen Geweben des Körpers exprimiert (Strehler et al., 2007), wobei PMCA4b die prädominierende Isoform in T-Zellen darstellt (Caride et al., 2001). Die qRT-PCRs für die beiden ubiquitären PMCA wurden mit Hilfe von Gertrud Schwär umgesetzt.

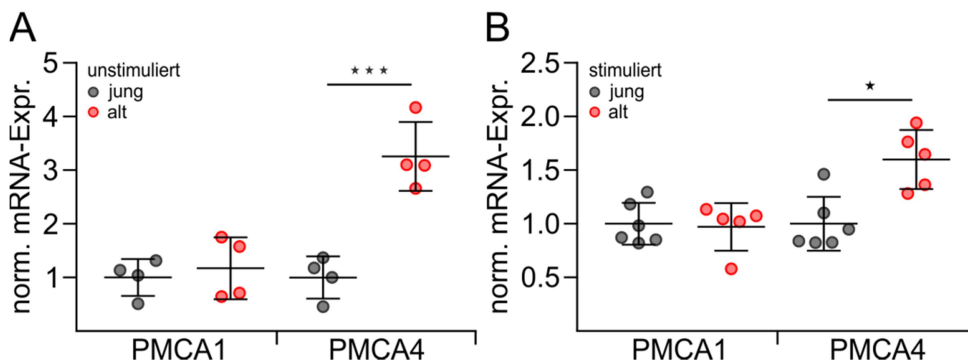


Abbildung 21: CD8⁺ T-Zellen weisen eine altersbedingt erhöhte mRNA-Expression der PMCA4 auf. Relative mRNA-Expression von PMCA1 und PMCA4 in (A) unstimulierten und (B) stimulierten CD8⁺ T-Zellen aus jungen (grau, $n_{\text{unstimuliert}} = 4$, $n_{\text{stimuliert}} = 6$) und alten (rot, $n_{\text{unstimuliert}} = 4$, $n_{\text{stimuliert}} = 5$) Mäusen. Die Dotplots zeigen die Verteilung der auf die Werte der jungen Mäuse normierten Messwerte sowie den Gesamtmittelwert aus diesen \pm Standardabweichung. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$. Modifiziert aus (Angenendt et al., 2020).

Im Einklang mit der altersbedingt gesteigerten Ca^{2+} -Extrusion (Abbildung 20) weisen sowohl die unstimulierten (Abbildung 21A) als auch die stimulierten (Abbildung 21B) CD8⁺ T-Zellen alter Mäuse signifikant um 225,50 % ($p = 0,0010$) respektive um 60,00 % ($p = 0,0173$) erhöhte PMCA4-mRNA-Levels auf. Für die PMCA1-mRNA-Levels konnten weder für unstimulierte noch stimulierten CD8⁺ T-Zellen bedeutende Unterschiede zwischen CD8⁺ T-Zellen junger und alter Mäuse festgestellt werden (Abbildung 21).

Zusammenfassend konnte somit eine altersbedingte Steigerung der Ca^{2+} -Extrusion für unstimulierte und stimulierten CD8⁺ T-Zellen festgestellt werden, die mit einer signifikant gesteigerten mRNA-Expression der PMCA4 einhergeht. Die gesteigerte Extrusion könnte zu den beobachteten Reduktionen der Ca^{2+} -Signale CD8⁺ T-Zellen alter Mäuse beitragen.

5.2.5. Reduzierter I_{CRAC} in unstimulierten CD8⁺ T-Zellen alter Mäuse

Um den über den Einstrom von Ca^{2+} -Ionen durch Orai-Kanäle in der Zellmembran vermittelten elektrischen Strom zu erfassen und auf altersbedingte Unterschiede zu untersuchen, wurden unstimulierte CD8⁺ T-Zellen junger und alter Mäuse mittels Whole-Cell-Konfiguration gepatcht. Hierfür wurden die Zellen mit IP_3 und BAPTA in der pipetteninternen Lösung perfundiert. IP_3 öffnet ER-membranständige Ca^{2+} -Kanäle und bewirkt dadurch eine ER- Ca^{2+} -Speicherentleerung, die wiederum die Aktivierung und Öffnung

plasmamembranständiger Orai-Kanäle verursacht. Der Ca^{2+} -spezifische Chelator BAPTA fängt das einströmende Ca^{2+} des damit ausgelösten speichergesteuerten Ca^{2+} -Einstroms ab und hält somit den elektrochemischen Gradienten für Ca^{2+} aufrecht. Die Whole-Cell Patch-Clamp Versuche wurden in Zusammenarbeit mit Dr. Annette Lis durchgeführt.

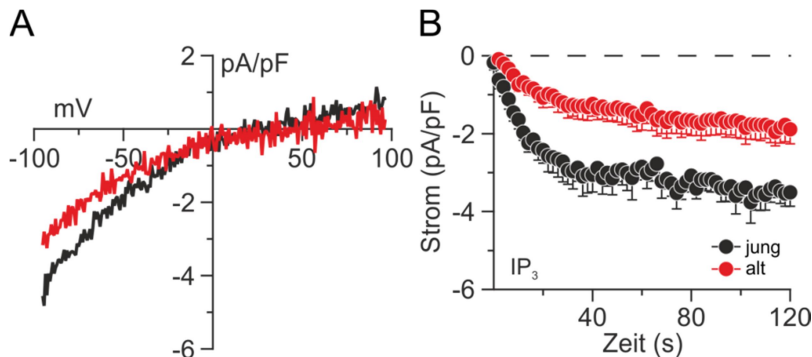


Abbildung 22: Unstimulierte CD8^+ T-Zellen zeigen einen altersbedingt verminderten, IP_3 -vermittelten I_{CRAC} . (A) Strom-Spannungskennlinie des in (B) dargestellten Ca^{2+} -freisetzungsaktivierten Ca^{2+} -Strom (engl. ‚ Ca^{2+} -release activated Ca^{2+} current‘, I_{CRAC}). (B) Mittlerer, zur Zellgröße normierter IP_3 -vermittelter I_{CRAC} bei -80 mV von unstimulierten CD8^+ T-Zellen junger (schwarz, $n = 8$) und alter (rot, $n = 7$) Mäuse – Standardfehler des arithmetischen Mittels. Modifiziert aus (Angenendt et al., 2020).

Sowohl bei den unstimulierten CD8^+ T-Zellen der jungen (schwarz, $n = 8$) als auch der alten (rot, $n = 7$) Mäuse bildet sich der für Orai-Kanäle typische einwärts gleichrichtende Ca^{2+} -freisetzungsaktivierte Ca^{2+} -Strom (engl. ‚ Ca^{2+} -release activated Ca^{2+} current‘, I_{CRAC}) mit einem Umkehrpotenzial über +40 mV aus (Abbildung 22A). Der I_{CRAC} der CD8^+ T-Zellen der alten Mäuse ist gegenüber dem der Zellen aus jungen Mäusen bei 120 s im Mittelwert signifikant um 46,15 % ($p < 0,0001$) reduziert (Abbildung 22B). Im Gegensatz zu den unstimulierten blieb das Patchen der stimulierten CD8^+ T-Zellen aufgrund zu geringer Ströme erfolglos.

5.2.6. Reduktion in Ca^{2+} -Signalen korreliert mit verminderten Expressionen einiger Bestandteile des STIM-Orai-vermittelten Ca^{2+} -Einstroms

Da der über STIM-Proteine und Orai-Kanäle vermittelte SOCE den Haupteintrittsweg für Ca^{2+} in CD8^+ T-Zellen darstellt (Feske et al., 2012; Schwarz et al., 2013; Trebak & Kinet, 2019), wurden die Expressionslevels der STIMs (STIM1 und STIM2) und Orais (Orai1, Orai2 und Orai3) auf mRNA- und Proteinebene für unstimulierte und stimulierte CD8^+ T-Zellen aus jungen und alten Mäusen erfasst und auf altersbedingte Unterschiede untersucht. Hierfür wurden qRT-PCRs und Western Blots durchgeführt. Die qRT-PCRs wurden mit Hilfe von Gertrud Schwär und die Western Blots mit Hilfe von Dr. Maik Konrad und Romy Steiner durchgeführt.

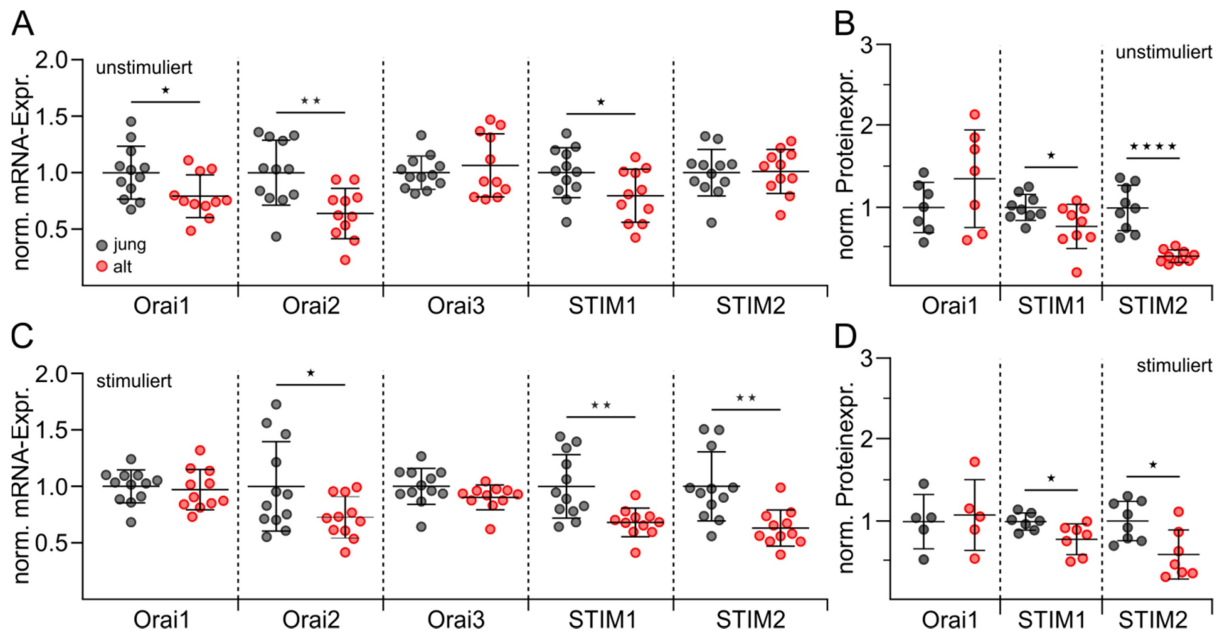


Abbildung 23: Altersbedingte Veränderungen der mRNA- und Proteinexpressionen von Orais und STIMs. Auf die Referenzgene Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase 1 und TATA-Box Binding Protein und anschließend auf die Werte der $CD8^+$ T-Zellen der jungen Mäuse normierte mRNA-Expression der Orais und STIMs von (A) unstimulierten und (C) stimulierten $CD8^+$ T-Zellen junger (grau, $n = 12$) und alter (rot, $n = 11$) Mäuse. Auf das Referenzprotein Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase und anschließend auf die Werte der $CD8^+$ T-Zellen der jungen Mäuse normierte Proteinexpression von Orai1, STIM1 und STIM2 von (B) unstimulierten und (D) stimulierten $CD8^+$ T-Zellen junger (grau, $n = 5 - 9$) und alter (rot, $n = 5 - 9$) Mäuse. Die Dotplots zeigen die Verteilung der auf die Werte der jungen Mäuse normierten Messwerte sowie den Gesamtmittelwert aus diesen \pm Standardabweichung. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$. Modifiziert aus (Angenendt et al., 2020).

Sowohl die $CD8^+$ T-Zellen der jungen (grau) als auch der alten Mäuse (rot) weisen vor (Abbildung 23A) und nach (Abbildung 23C) der Stimulation eine deutliche Expression aller STIM- und OraimRNAs auf. Um einen Vergleich zu ermöglichen wurden die mRNA-Expressionslevels der STIMs und Orais auf die Referenzgene HPRT1 und TBP und anschließend die Werte der $CD8^+$ T-Zellen alter auf die der jungen Mäuse normiert (Abbildung 23A, C). Die unstimulierten $CD8^+$ T-Zellen alter Mäuse weisen im Vergleich zu denen junger Mäuse eine signifikante Reduktion der mRNA-Levels von Orai1 (20,80 %, $p = 0,0302$), Orai2 (36,13 %, $p = 0,0031$) und STIM1 (20,42 %, $p = 0,0430$) auf (Abbildung 23A). Die stimulierten $CD8^+$ T-Zellen alter Mäuse zeigen im Vergleich zu denen junger Mäuse eine signifikante Reduktion der mRNA-Levels von Orai2 (27,44 %, $p = 0,0480$), STIM1 (31,94 %, $p = 0,0020$) und STIM2 (36,88 %, $p = 0,0018$) (Abbildung 23C). Die Orai3-mRNA-Expressionslevels zeigen sowohl bei unstimulierten als auch stimulierten $CD8^+$ T-Zellen zwischen beiden Altersgruppen keine deutlichen Unterschiede (Abbildung 23A, C). Aus der densitometrischen Analyse der Western Blots geht hervor, dass die Ergebnisse der qRT-PCRs (Abbildung 23A, C) auf Proteinebene für Orai1, STIM1 und STIM2 mit wenigen Ausnahmen ebenfalls zutreffen (Abbildung 23B, D). Im Gegensatz zu den altersbedingt signifikant reduzierten Orai1-mRNA-Levels liegt bei den unstimulierten $CD8^+$ T-Zellen für die entsprechenden Proteinlevels eine tendenzielle Erhöhung um 35,50 % vor (Abbildung 23B).

Zudem liegt für die unstimulierten $CD8^+$ T-Zellen der alten Mäuse auf Proteinebene eine deutliche, signifikante Reduktion der STIM2-Levels um 63,38 % ($p < 0,0001$) (Abbildung 23B) vor, die sich nicht mit den altersbedingt unveränderten STIM2-mRNA-Levels (Abbildung 23A) deckt. Die für die stimulierten $CD8^+$ T-Zellen der alten Mäuse bereits auf mRNA-Ebene signifikant reduzierten STIM2-Levels (Abbildung 23C) sind auch auf Proteinebene signifikant um 41,69 % ($p = 0,0115$) (Abbildung 23D) reduziert. Die STIM1-Proteinlevels zeigen, wie auch die STIM1-mRNA-Levels, eine signifikante Reduktion um 23,56 % ($p = 0,041$) für die unstimulierten (Abbildung 23B) und um 21,87 % ($p = 0,021$) für die stimulierten (Abbildung 23D) $CD8^+$ T-Zellen alter Mäuse auf. Da für Orai2 und Orai3 keine kommerziell erwerblichen Antikörper mit zufriedenstellender Spezifität erhältlich waren, lässt sich zu beiden Isoformen auf Proteinebene keine Aussage treffen.

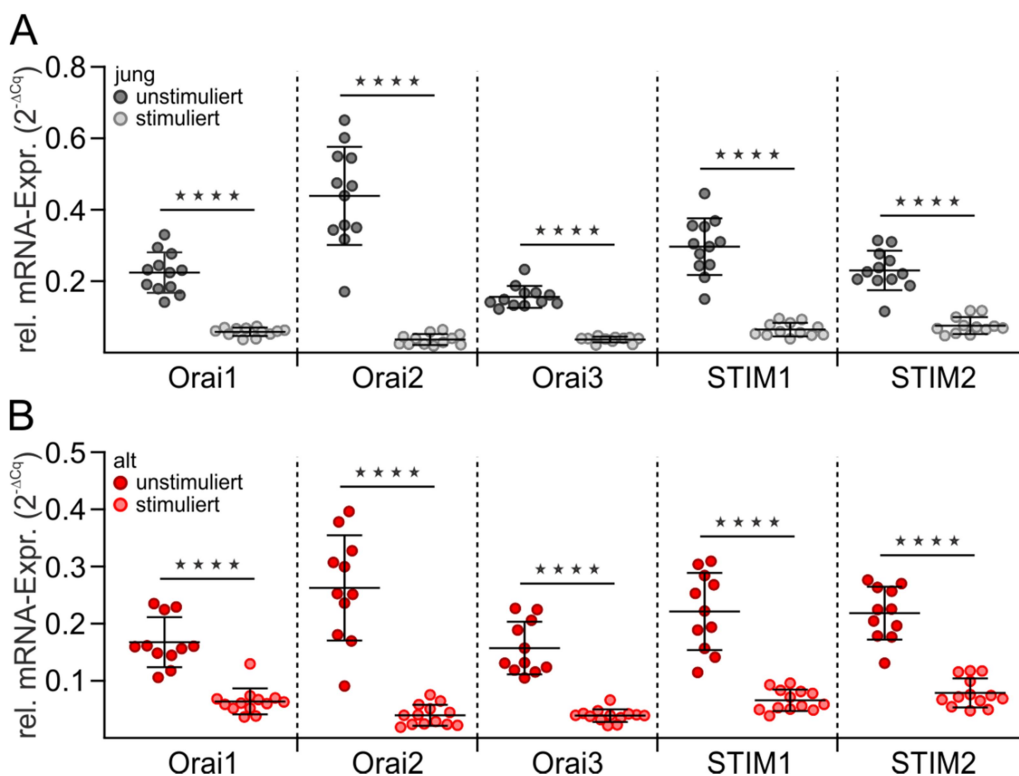


Abbildung 24: Die *in vitro* Stimulation von $CD8^+$ T-Zellen aus Mäusen beider Altersgruppen mit anti-CD3/anti-CD28-gekoppelten Aktivatorbeads verursacht eine drastische Reduktion der mRNA-Level für sämtliche untersuchten Orais und STIMs. Auf das Referenzgen Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase 1 normierte mRNA-Expressionen der Orais und STIMs von unstimulierten (jung: dunkelgrau, $n = 12$; alt: dunkelrot, $n = 11$) und stimulierten (jung: hellgrau, $n = 12$; alt: hellrot, $n = 13$) $CD8^+$ T-Zellen (A) junger und (B) alter Mäuse. Die Dotplots zeigen die Verteilung der normierten Messwerte sowie den Gesamtmittelwert aus diesen \pm Standardabweichung. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$. Modifiziert aus (Angenendt et al., 2020).

Da die stimulierten $CD8^+$ T-Zellen beider Altersgruppen in Kapitel 5.2.2 kleinere Ca^{2+} -Signale aufwiesen als die unstimulierten in Kapitel 5.2.1 und sich, wie in Kapitel 5.2.5 erwähnt, aufgrund zu geringer Ströme nicht patchen ließen, wurde die Hypothese aufgestellt, dass die unstimulierten im Vergleich zu den stimulierten $CD8^+$ T-Zellen über eine höhere Expression der STIMs und Orais verfügen. Der direkte Vergleich zwischen beiden Zellpopulationen bestätigt diese Hypothese für beide Altersgruppen (Abbildung 24). Alle untersuchten

Isoformen der Orais und STIMs liegen im Vergleich zu den unstimulierten bei den stimulierten CD8⁺ T-Zellen signifikant reduziert vor (Abbildung 24). Die mRNA-Levels sind bei den stimulierten Zellen der jungen Mäuse um 67,01 % bis 91,61 % (Abbildung 24A) und bei denen der alten Mäuse um 61,82 % bis 84,85 % (Abbildung 24B) reduziert. Hierbei tritt die jeweils stärkste Reduktion bei beiden Altersgruppen bei den Orai2-mRNA-Levels auf (Abbildung 24).

Zusammenfassend lässt sich korrelierend mit den, in Kapiteln 5.2.1 und 5.2.2 beschriebenen altersbedingten Reduktionen des Ca²⁺-Einstroms eine Reduktion der Orai1-Levels bei unstimulierten, eine Reduktion der STIM2-Levels bei stimulierten sowie eine stimulationsunabhängige Reduktion der STIM1- und Orai2-Levels für CD8⁺ T-Zellen alter Mäuse im Vergleich zu denen junger Mäuse auf mRNA-Ebene feststellen. Auf Proteinebene kommt es zu einer konstanten Reduktion der STIM1- und STIM2-Levels bei unstimulierten und stimulierten CD8⁺ T-Zellen alter Mäuse. Weiterhin kommt es unabhängig vom Alter zu einer umfassenden Reduktion aller STIM- und Orai-mRNA-Levels durch die Stimulation mit anti-CD3/anti-CD28-gekoppelten Aktivatorbeads.

5.3. Einfluss des Alterns auf die Zytotoxizität muriner CD8⁺ T-Zellen

Nachdem ein CD8⁺ T-Lymphozyt sein in einem MHC-Klasse1-Komplex präsentiertes spezifisches Antigen erkennt kommt es zur Ausbildung einer immunologischen Synapse (IS) (Dustin & Long, 2010). Hieran anschließend kann die T-Zelle mittels verschiedener Mechanismen die virusinfizierte oder entartete Zielzelle töten. Die beiden Hauptmechanismen, die CD8⁺ T-Zellen für ihre zytotoxische Funktion benutzen sind die Exozytose lytischer Granula und das Aktivieren sogenannter Todesrezeptoren auf der Membran der Zielzelle (Chávez-Galán et al., 2009). Bei ersterem werden durch die T-Zelle an der IS Perforin und Granzyme sezerniert, welche die entartete Zelle entweder über Apoptose oder Nekrose töten (de Saint Basile, Ménasché, & Fischer, 2010; Trapani & Smyth, 2002) (Abbildung 2). Bei den Todesrezeptoren stellt der Fas-Rezeptor (FasR) den prominentesten Vertreter der rezeptorvermittelten Zytotoxizität von CD8⁺ T-Zellen dar (Andersen, Schrama, Thor Straten, & Becker, 2006). Wird er über den auf der Zelloberfläche der CD8⁺ T-Zellen befindlichen Fas-Liganden (FasL) aktiviert, wird in der Zielzelle, wie auch durch die Granzyme, über Caspasen die Apoptose eingeleitet (Varfolomeev et al., 1998) (Abbildung 2).

Um den altersbedingten Einfluss auf diese zytotoxische Funktion der murinen CD8⁺ T-Zellen zu untersuchen wurden kinetische Zytotoxizitätsassays durchgeführt und relevante Proteine der Tötungsmechanismen von CD8⁺ T-Zellen quantifiziert.

5.3.1. Schnellere Zytotoxizitätskinetik von CD8⁺ T-Zellen aus alten Mäusen

Um die Effizienz der CD8⁺ T-Zellen alter Mäuse bei der Zielzelllyse mit der der jungen Mäuse zu vergleichen wurden fluoreszenzbasierte Zytotoxizitätsassays durchgeführt. Hierfür wurde die durch die Zytotoxizität der CD8⁺ T-Zellen vermittelte Abnahme der Fluoreszenz Calcein-gefärbter muriner Krebszelllinien mit der Fluoreszenz einer Lebendkontrolle sowie einer Totkontrolle derselben Zielzellen verglichen. Die Zytotoxizitätsassays wurden unter Mithilfe von Michelle Mansion und Dorina Zöphel ausgeführt.

Die unstimulierten CD8⁺ T-Zellen sind nur in geringem Ausmaß in der Lage, die P815-Mastozytomzielzellen zu lysieren (Abbildung 25).

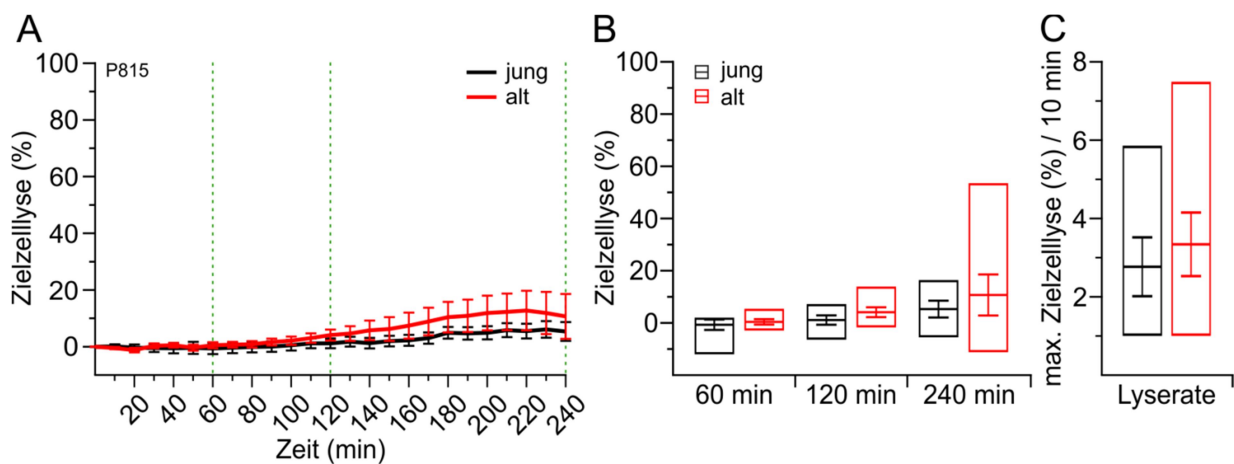


Abbildung 25: Unstimulierte CD8⁺ T-Zellen junger und alter Mäuse weisen kaum zytotoxische Funktion gegen die murine P815-Krebszelllinie auf. (A) Kinetischer Zytotoxizitätsassay mit unstimulierten CD8⁺ T-Zellen junger (schwarz, n = 7) und alter (rot, n = 8) Mäuse als Effektor- und P815 als Zielzellen in einem Effektor-Zielzell-Verhältnis von 20:1. Die schwebenden Balken in (B) zeigen die jeweiligen prozentualen Zielzelllysen der CD8⁺ T-Zellen beider Altersgruppen zu den Zeitpunkten 60 min, 120 min und 240 min. Die schwebenden Balken in (C) repräsentieren die maximale Zielzelllyse in einem 10-Minutenintervall als Maß der Kinetik. Die Zytotoxizitätskurven sind als Mittelwert \pm Standardfehler des arithmetischen Mittels angegeben. Die äußere Abgrenzung der schwebenden Balken zeigt die Probenverteilung von Minimum bis Maximum. Innerhalb der Balken ist das arithmetische Mittel \pm Standardfehler des arithmetischen Mittels dargestellt.

Die, die Zytotoxizität der CD8⁺ T-Zellen der alten Mäuse darstellende, rote Kurve erreicht maximal 12,77 % (n = 8) und die, die CD8⁺ T-Zellen der jungen Mäuse repräsentierende, schwarze Kurve maximal 6,10 % (n = 7) Zielzelllyse (Abbildung 25A). Es ist also bei unstimulierten CD8⁺ T-Zellen kaum Zytotoxizität nachzuweisen. Dennoch fällt bei dieser geringen Zielzelllyse das Maximum der Zellen der alten Mäuse etwa doppelt so hoch aus wie das der Zellen junger Mäuse (Abbildung 25A). Auch die maximale Zielzelllyse innerhalb eines 10-Minutenintervalls, als Maß der Geschwindigkeit der zytotoxischen Funktion der CD8⁺ T-Zellen, ist altersbedingt um 20,87 % erhöht (Abbildung 25C).

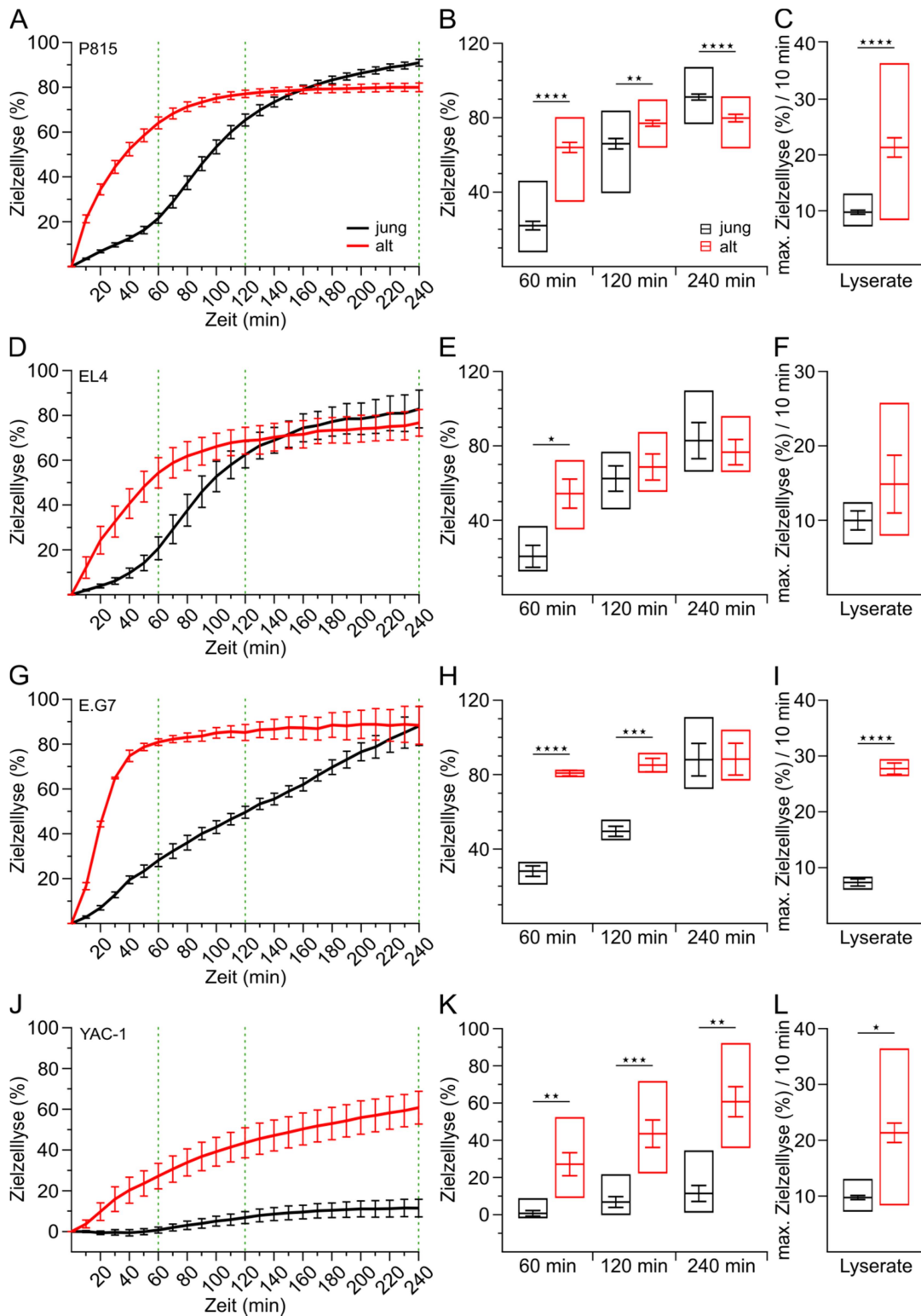


Abbildung 26: Stimulierte murine CD8⁺ T-Zellen zeigen eine altersbedingt gesteigerte Kinetik beim Abtöten verschiedener Krebszelllinien. Kinetische Zytotoxizitätsassays mit drei Tage stimulierten CD8⁺ T-Zellen junger (schwarz, n = 4 - 23) und alter (rot, n = 3 - 21) Mäuse als Effektor- und (A) P815, (D) EL4, (G) E.G7 oder (J) YAC-1 als Zielzellen in einem Effektor:-Zielzell-Verhältnis von 20:1. Die benachbarten schwebenden Balkendiagramme in (B), (E), (H) und (K) zeigen die zugehörigen prozentualen Zielzelllysen der CD8⁺ T-Zellen beider Altersgruppen zu den Zeitpunkten 60 min, 120 min und 240 min. Die schwebenden Balken in (C), (F), (I) und (L) repräsentieren die entsprechenden maximalen Zielzelllysen in einem 10-Minutenintervall als Maß der Kinetik. Die Zytotoxizitätskurven sind als Mittelwert ± Standardfehler des arithmetischen Mittels angegeben. Die äußere Abgrenzung der schwebenden Balken zeigt die Probenverteilung von Minimum bis Maximum. Innerhalb der Balken ist das arithmetische Mittel ± Standardfehler des arithmetischen Mittels dargestellt. * p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001, **** p < 0,0001.

Nach drei Tagen Stimulation und damit einhergehender Aktivierung der Zellen ist im Gegensatz zu den unstimulierten CD8⁺ T-Zellen (Abbildung 25A) für beide Altersgruppen eine ausgeprägte Lyse der P815 Mastozytomzellen zu erkennen (Abbildung 26A). Die aktivierten CD8⁺ T-Zellen alter Mäuse weisen hierbei eine signifikant schnellere Kinetik bei der Abtötung der Zielzellen auf. Die, die Zellen der alten Maus repräsentierende, rote Kurve (n = 21) zeigt einen steileren, hyperbolischen Anstieg im Gegensatz zum sigmoidalen Verlauf der schwarzen Kurve der CD8⁺ T-Zellen junger Mäuse (n = 25) (Abbildung 26A). Mit einer Differenz von 42,04 % (p < 0,0001) liegt vor allem nach 60 min, mit 11,01 % (p = 0,0021) aber auch immer noch nach 120 min eine signifikant höhere Zielzelllyse für die CD8⁺ T-Zellen der alten Mäuse vor (Abbildung 26B). Nach etwa 160 min übersteigt die Zielzelllyse der Zellen der jungen die der alten Mäuse und es kommt zu einer signifikant um 11,25 % (p < 0,0001) höheren Zytotoxizität der CD8⁺ T-Zellen der jungen Mäuse am Ende des Assays nach 240 min (Abbildung 26A, B). Die Quantifizierung der maximalen Lyserate, als maximale Steigung der Kurven in einem Zeitintervall von 10 min, ergibt eine signifikant um 119,28 % (p < 0,0001) schnellere Zielzelllyse der CD8⁺ T-Zellen alter Mäuse mit 21,36 % / 10 min im Vergleich zu 9,74 % / 10 min bei den CD8⁺ T-Zellen der jungen Mäuse (Abbildung 26C). Um ausschließen zu können, dass diese Effekte nur spezifisch für die P815-Zielzelllinie zutreffen, wurden die Experimente mit EL4-Lymphomzellen (Abbildung 26D, E, F), den davon abgeleiteten E.G7-Lymphomzellen (Abbildung 26G, H, I) und der eigentlich lediglich für die Untersuchung der Zytotoxizität von NK-Zellen verwendeten YAC-1-Lymphomzelllinie (Abbildung 26J, K, L) wiederholt. Die Ergebnisse des Zytotoxizitätsassays mit EL4-Zellen als Zielzelllinie (Abbildung 26D, E, F) ähneln im Prinzip denen mit P815-Zielzellen (Abbildung 26A, B, C). Die CD8⁺ T-Zellen der alten Mäuse (rot, n = 4) weisen wegen einer schnelleren Kinetik zu Beginn des Assays (Abbildung 26D, F) nach 60 min eine mit einer Differenz von 34,15 % (p = 0,0138) signifikant höhere prozentuale Zielzelllyse auf als die der jungen Mäuse (schwarz, n = 4) (Abbildung 26D, E). Diese Differenz verkleinert sich wie bei den P815-Zielzellen stetig, bis die prozentuale EL4-Lyse der CD8⁺ T-Zellen der jungen Mäuse nach 150 min die der alten Mäuse übersteigt und am Ende mit einer Differenz von 6,15 % höher ausfällt als die der CD8⁺ T-Zellen der alten Mäuse (Abbildung 26D, E). Aufgrund der geringen Versuchszahl (n = 4) entfällt die Signifikanz des altersbedingten Effekts bei vielen Parametern im Gegensatz zu den P815-Zielzellen. Auch gegen die E.G7- und die YAC-1-Zielzellen weisen die CD8⁺ T-Zellen der alten Mäuse (rot, n_{E.G7} = 3, n_{YAC-1} = 6) eine schnellere Kinetik auf als die der jungen Mäuse (rot, n_{E.G7} = 4, n_{YAC-1} = 7) (Abbildung 26G, I, J, L). Die Unterschiede von 20,39 % / 10 min (p < 0,0001) (Abbildung 26I) respektive 5,95 % / 10 min (p = 0,0103) (Abbildung 26L) weisen für beide Zielzelllinien Signifikanz auf. Im Gegensatz zu den Ergebnissen der Zytotoxizitätsassays mit P815- (Abbildung 26A) und EL4-Zellen (Abbildung 26D) als Zielzelllinien übersteigt die mittlere prozentuale Zielzelllyse der CD8⁺ T-Zellen der jungen Mäuse die der alten Mäuse mit E.G7- (Abbildung 26G) und

YAC-1-Zielzellen (Abbildung 26J) zu keinem untersuchten Zeitpunkt. Die Zytotoxizitätsassays mit E.G7-Zielzellen zeigen eine höhere Zytotoxizität bei den CD8⁺ T-Zellen der alten Mäuse mit einer signifikanten Differenz von 52,73 % nach 60 min ($p < 0,0001$) und von 35,59 % nach 120 min ($p = 0,0004$) (Abbildung 26H). Die mittlere prozentuale E.G7-Zielzelllyse zum letzten Zeitpunkt des Assays fällt für die CD8⁺ T-Zellen beider Altersgruppen nahezu identisch aus (Abbildung 26H). Die Zytotoxizitätsassays mit YAC-1-Zielzellen zeigen im Gegensatz zu den bereits beschriebenen vor allem für die CD8⁺ T-Zellen der jungen Mäuse eine geringere Effizienz der zytotoxischen Funktion (Abbildung 26J). Die finale prozentuale Lyse der YAC-1-Zellen bei 240 min fällt mit 60,77 % für die CD8⁺ T-Zellen der alten Mäuse etwas geringer aus als bei den übrigen Zielzelllinien (Abbildung 26K). Die der jungen Mäuse sind in 240 min lediglich in der Lage 11,46 % der YAC-1-Zellen abzutöten (Abbildung 26K). Die altersbedingte Erhöhung der Zytotoxizität gegenüber YAC-1-Zellen weist mit einer Differenz von 26,41 % nach 60 min ($p = 0,0023$), von 36,70 % nach 120 min ($p = 0,0005$) und von 49,31 % nach 240 min ($p = 0,0012$) zu allen dargestellten Zeitpunkten eine statistische Signifikanz auf (Abbildung 26K).

Um zu überprüfen, ob sich die Zytotoxizität, ähnlich wie die in Kapitel 5.1.3 beschriebene Subtypenverteilung der CD8⁺ T-Zellpopulation, *in vitro* mit längerer Dauer verändert, wurden die CD8⁺ T-Zellen bis zu zehn Tage in Kultur gehalten und zusätzlich zu den in Abbildung 25 und Abbildung 26 dargestellten Zeitpunkten nach vier, fünf, sechs und zehn Tagen Kultivierung Zytotoxizitätsassays durchgeführt.

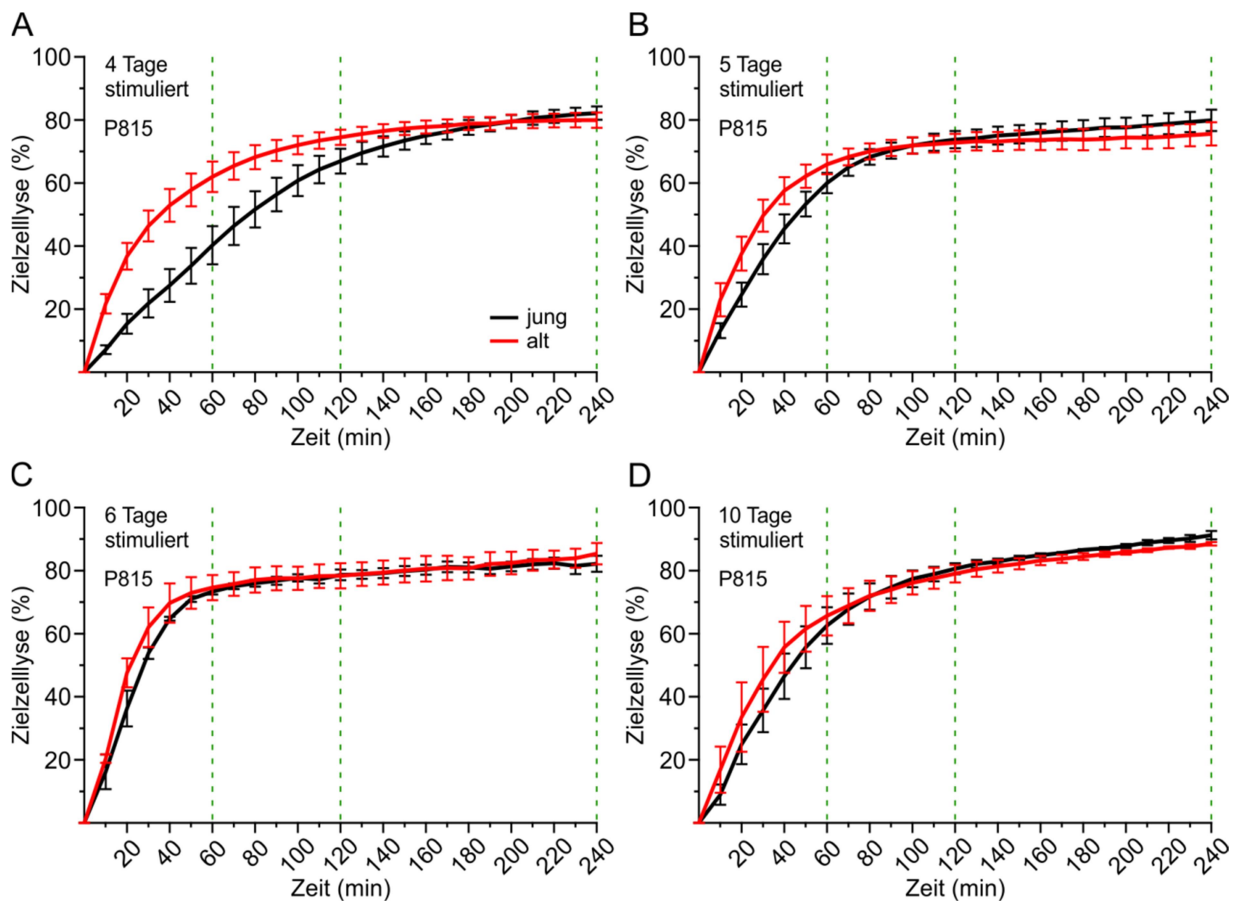


Abbildung 27: Die Unterschiede in der zytotoxischen Funktion zwischen $CD8^+$ T-Zellen junger und alter Mäuse heben sich mit zunehmender *in vitro* Stimulationsdauer auf. Kinetische Zytotoxizitätsassays mit (A) vier, (B) fünf, (C) sechs oder (D) zehn Tage stimulierten $CD8^+$ T-Zellen junger (schwarz, $n = 3 - 20$) und alter (rot, $n = 3 - 19$) Mäuse als Effektor- und P815 als Zielzellen in einem Effektor-Zielzell-Verhältnis von 20:1. Die Zytotoxizitätskurven sind als Mittelwert \pm Standardfehler des arithmetischen Mittels angegeben.

Wie in Abbildung 27 zu erkennen ist, kommt es mit zunehmender Stimulationsdauer zu einer schrittweisen Annäherung der beiden Zytotoxizitätskurven. Nach vier Tagen liegt zwischen den $CD8^+$ T-Zellen der jungen (schwarz, $n = 20$) und denen der alten Mäuse (rot, $n = 19$) zum Zeitpunkt 60 min immer noch eine Differenz in der mittleren prozentualen P815-Lyse von 21,72 % vor (Abbildung 27A). Diese Differenz nimmt am fünften Tag auf 5,96 % ab ($n_{\text{jung}} = 8$, $n_{\text{alt}} = 8$) (Abbildung 27B), fällt am sechsten Tag auf 1,27 % ($n_{\text{jung}} = 3$, $n_{\text{alt}} = 3$) (Abbildung 27C) und liegt am zehnten Tag bei 3,08 % ($n_{\text{jung}} = 3$, $n_{\text{alt}} = 3$) (Abbildung 27D). Auch die Endpunktlöse zum Zeitpunkt 240 min weist im Gegensatz zu den frisch isolierten und den drei Tage stimulierten $CD8^+$ T-Zellen an Tag vier bis zehn mit einer Differenz von 2,20 % bis 4,29 % keinen bedeutenden Unterschied mehr auf (Abbildung 27).

Abschließend lässt sich festhalten, dass die $CD8^+$ T-Zellen der alten im Vergleich zu denen der jungen Mäuse in den Zytotoxizitätsassays zielzellunabhängig über eine gesteigerte Kinetik verfügen. So kommt es vor allem bei den früheren Zeitpunkten zu einer höheren prozentualen Lyse der Zielzellen durch die $CD8^+$ T-Zellen der alten Mäuse. Bezüglich der Endpunktlöse der Zytotoxizitätsassays lässt sich keine einheitliche Aussage treffen. Für die P815- und EL4-Zielzellen liegt der Endpunkt bei den $CD8^+$ T-Zellen der jungen Mäuse höher,

für die E.G7-Zellen ist er gleich und bei den YAC-1-Zellen liegt er für die der alten Mäuse höher. Weiterhin wurde gezeigt, dass die CD8⁺ T-Zellen beider Altersgruppen sich bis zu zehn Tage lang *ex vivo* kultivieren lassen ohne ihre primäre Funktion zu verlieren. Allerdings gleichen sich mit zunehmender Kultivierungsdauer die anfänglich nachweisbaren altersbedingten Unterschiede in der zytotoxischen Funktion an, bis nahezu keine mehr feststellbar sind.

5.3.2. Altersbedingt gesteigerte Expression für die zytotoxische Funktion CD8⁺ T-Zellen relevanter Proteine

Um einen Hinweis auf die Ursache der gesteigerten Kinetik der Zytotoxizität von CD8⁺ T-Zellen aus alten Mäusen zu erlangen, wurden über Western Blots Proteine, welche maßgeblich an der zytotoxischen Funktion CD8⁺ T-Zellen beteiligt sind, und über qRT-PCRs deren mRNAs quantifiziert. Zu diesen Proteinen zählt der FasL, welcher über die Aktivierung des zugehörigen Rezeptors auf der Zielzelle letztlich zu einer Caspase-8-vermittelten Aktivierung des programmierten Zelltods, der Apoptose, führt (Varfolomeev et al., 1998) (Abbildung 2). Neben dem FasL/FasR-Weg spielt die Sekretion lytischer Granula eine zentrale Rolle bei der Zytotoxizität von CD8⁺ T-Zellen. Hierbei werden nach Zielzellkontakt mit Perforin und Granzymen gefüllte Vesikel in den Spalt der IS ausgeschüttet. Das Perforin bindet an die Membran der Zielzellen und bildet Poren. Durch diese Poren treten die Granzyme in die Zelle und aktivieren, wie auch beim FasL/FasR-Weg, Caspasen und leiten dadurch die Apoptose ein. Weiterhin können höhere Konzentrationen von Perforin zu einer Ruptur der Zielzellmembran führen, wodurch eine Nekrose der betroffenen Zelle verursacht wird (de Saint Basile et al., 2010; Trapani & Smyth, 2002) (Abbildung 2). Die Western Blots wurden mit Hilfe von Romy Steiner und die qRT-PCRs mit Hilfe von Gertrud Schwär durchgeführt.

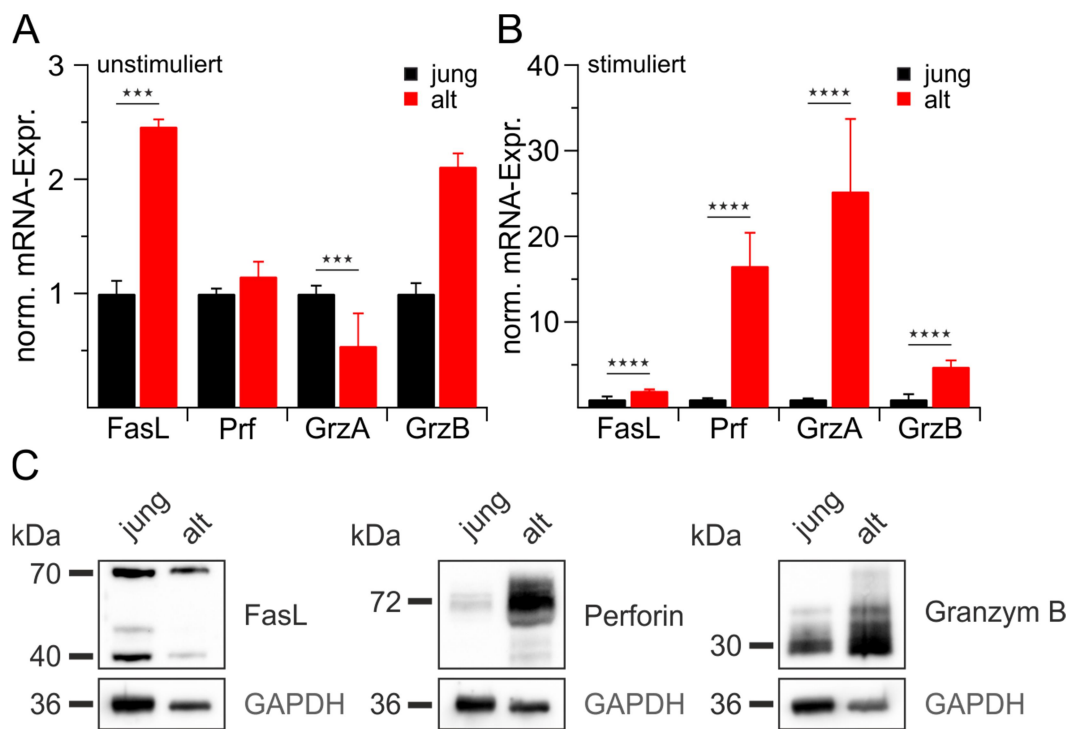


Abbildung 28: Altersbedingte Veränderungen der mRNA- und Proteinexpressionen wichtiger Proteine für die zytotoxische Funktion von CD8⁺ T-Zellen. Auf die Referenzgene Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase 1 und TATA-Box Binding Protein und anschließend auf die Werte der CD8⁺ T-Zellen der jungen Mäuse normierte mRNA-Expression des Fas-Liganden (FasL), von Perforin (Prf) und den Granzymen A (GrzA) und B (GrzB) von (A) unstimulierten und (B) stimulierten CD8⁺ T-Zellen junger (schwarz, n = 16) und alter (rot, n = 8 - 16) Mäuse. (C) Exemplarische Western Blots stimulierter CD8⁺ T-Zellen junger und alter Mäuse für die Proteine FasL, Perforin und Granzym B mit Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) als Referenzprotein. Die Balkendiagramme zeigen den Mittelwert aller untersuchter Mäuse \pm Standardfehler des arithmetischen Mittels. * p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001, **** p < 0,0001.

Die Quantifizierung der auf die unstimulierten CD8⁺ T-Zellen der jungen Mäuse normierten mRNA-Level für den FasL, Perforin sowie der beiden häufigsten Granzyme, A und B, sind in Abbildung 28A dargestellt. Die unstimulierten CD8⁺ T-Zellen alter Mäuse (rote Balken, n = 14 - 16) weisen eine signifikant um 146,37 % (p = 0,0003) gesteigerte Expression der FasL-mRNA und eine nicht signifikante Steigerung der Granzym B-mRNA-Level um 111,29 % im Vergleich mit denen der jungen Mäuse (schwarze Balken, n = 16) auf (Abbildung 28A). Die Perforin-mRNA-Level sind bei den unstimulierten CD8⁺ T-Zellen alter Mäuse um 15,10 % erhöht (Abbildung 28A). Für Granzym A weisen die Zellen der alten Maus signifikant um 45,69 % (p = 0,0005) verringerte mRNA-Level auf (Abbildung 28A). Nach der Stimulation liegt für die CD8⁺ T-Zellen alter Mäuse (rote Balken, n = 8) immer noch eine signifikante Erhöhung der FasL-mRNA um 97,58 % (p < 0,0001) im Vergleich zu den Zellen der jungen Mäuse (schwarze Balken, n = 16) vor (Abbildung 28B). Weiterhin sind die mRNA-Level der stimulierten CD8⁺ T-Zellen der alten Mäuse für Perforin, Granzym A und Granzym B drastisch um 1556,77 % (p < 0,0001), um 2427,30 % (p < 0,0001) und um 381,39 % (p < 0,0001) erhöht (Abbildung 28B). Die exemplarischen Western Blots für die stimulierten CD8⁺ T-Zellen zeigen eine entsprechende Erhöhung der für die zytotoxischen Eigenschaften

relevanten Proteine (Abbildung 28C). Diese fällt, korrelierend mit den Ergebnissen der qRT-PCRs für Perforin und Granzym B ausgeprägter aus als für den FasL (Abbildung 28B, C).

Die Quantifizierung der für die Zytotoxizität von CD8⁺ T-Zellen hauptverantwortlichen Proteine und deren mRNAs liefert eine Erklärung für die in Kapitel 5.3.1 beschriebene gesteigerte Kinetik der Zytotoxizität der CD8⁺ T-Zellen aus alten Mäusen. Die untersuchten Proteine und mRNAs zeigen bei den stimulierten Zellen alter Mäuse eine unverkennbare, signifikante Erhöhung. Auch der altersbedingte Unterschied in der schwachen Zytotoxizität unstimulierter CD8⁺ T-Zellen könnte sich über die erhöhten Levels an FasL, Perforin und Granzym B erklären lassen.

5.3.3. Schnellere Kinetik ist nicht exklusiv auf unterschiedliche Subtypenverteilung CD8⁺ T-Zellen zurückzuführen

Wie in Kapitel 5.1.3 beschrieben, weisen drei Tage stimulierte CD8⁺ T-Zellen alter Mäuse einen signifikant höheren Anteil an Effektor-Gedächtnis-T-Zellen auf als die junger Mäuse (Abbildung 7F). Da diese T_{EM} über höhere Expressionslevels von Perforin und eine stärkere zytotoxische Aktivität verfügen als die in jüngeren Mäusen nach drei Tagen Stimulation stärker vertretenen T_{CM} (Sallusto, Lenig, Förster, Lipp, & Lanzavecchia, 1999; Willinger et al., 2005), wurde überprüft, ob die schnellere Kinetik der Zytotoxizität und die höheren Expressionslevels der für die Zytotoxizität verantwortlichen Proteine bei CD8⁺ T-Zellen alter Mäuse auf den altersbedingten Unterschieden in der CD8⁺ T-Zellsubtypenverteilung beruht. Hierfür wurden CD8⁺ T-Zellen nach der Methode in Kapitel 4.2.5.2 in die Subtypen T_{CM} und T_{EM} gesortet und mit diesen Zellen kinetische Zytotoxizitätsassays und qRT-PCRs für Perforin, Granzym A und B und den FasL durchgeführt. Die qRT-PCRs sind unter Mitarbeit von Gertrud Schwär durchgeführt worden.

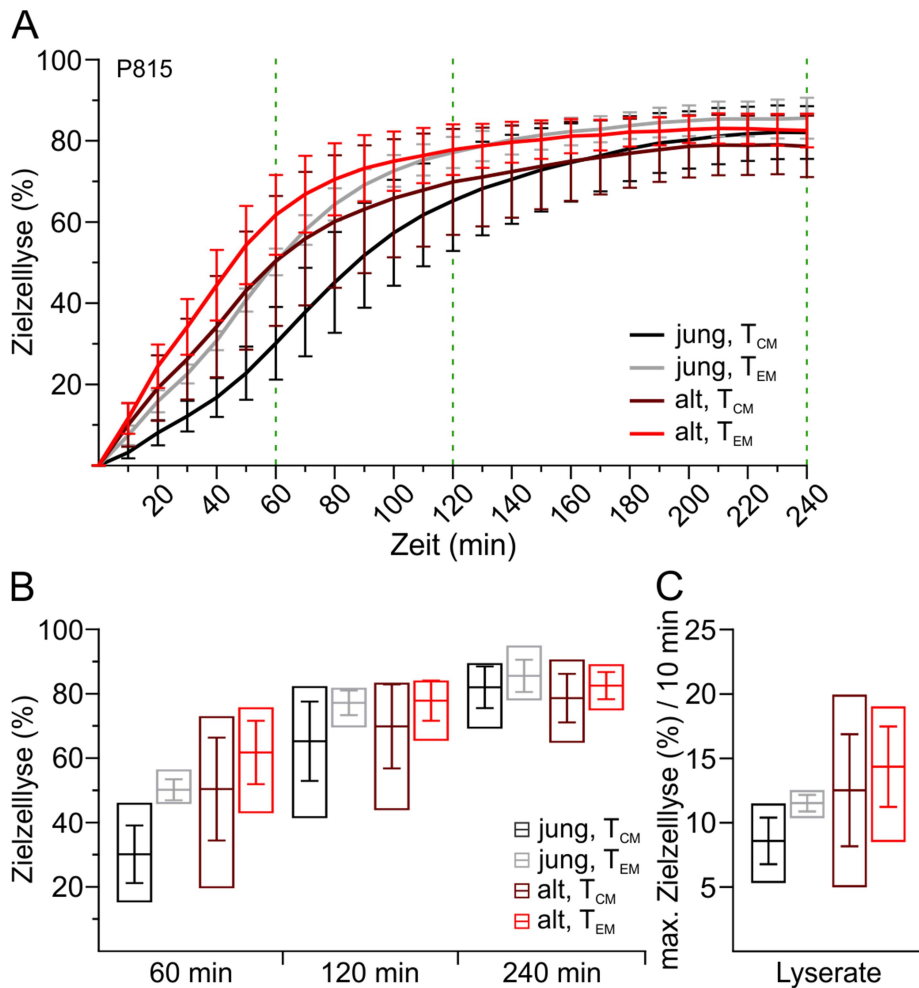


Abbildung 29: Die beiden prädominierenden Subtypen aktivierter $CD8^+$ T-Zellen, zentrale (T_{CM}) und Effektor-Gedächtnis-Zellen (T_{EM}), zeigen altersbedingte Steigerungen der Kinetik ihrer zytotoxischen Funktion. (A) Kinetische Zytotoxizitätsassays mit den gesorteten $CD8^+$ T-Zellsubtypen T_{CM} und T_{EM} junger (T_{CM} : schwarz, $n = 3$; T_{EM} : grau, $n = 3$) und alter (T_{CM} : dunkelrot, $n = 3$; T_{EM} : hellrot, $n = 3$) Mäuse als Effektor- und P815 als Zielzellen in einem Effektor-Zielzell-Verhältnis von 20:1. Das schwebende Balkendiagramm in (B) zeigt die zugehörigen prozentualen Zielzelllysen der Subtypen beider Altersgruppen zu den Zeitpunkten 60 min, 120 min und 240 min. Das schwebende Balkendiagramm in (C) repräsentiert die entsprechenden maximalen Zielzelllysen in einem 10-Minutenintervall als Maß der Kinetik. Die Zytotoxizitätskurven sind als Mittelwert \pm Standardfehler des arithmetischen Mittels angegeben. Die äußere Abgrenzung der schwebenden Balken zeigt die Probenverteilung von Minimum bis Maximum. Innerhalb der schwebenden Balken ist das arithmetische Mittel \pm Standardfehler des arithmetischen Mittels dargestellt. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, * $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$.**

Aus den Ergebnissen der Zytotoxizitätsassays geht hervor, dass die schnellere Kinetik im Vergleich mit den entsprechenden $CD8^+$ T-Zellsubtypen junger Mäuse sowohl bei den T_{EM} (hellrote Kurve, $n = 3$) als auch bei den T_{CM} (dunkelrote Kurve, $n = 3$) alter Mäuse auftritt (Abbildung 29A, C). Wie auch schon bei den pan-T-Zellen in Kapitel 5.3.1 liegt dafür bei den T_{EM} (hellgraue Kurve, $n = 3$) und den T_{CM} (dunkelgraue Kurve, $n = 3$) der jungen Mäuse der Endpunkt der kinetischen Zytotoxizitätsassays höher als bei den entsprechenden Subtypen der alten Mäuse (Abbildung 29A, B). Die Quantifizierung der Kinetik, als maximale Lyserate pro 10-Minutenintervall, zeigt für die T_{EM} alter Mäuse eine Steigerung um 24,57 % und für die T_{CM} um 45,92 % im Vergleich zu den entsprechenden Subtypen junger Mäuse (Abbildung 29C). Vergleicht man die Subtypen innerhalb der Altersgruppen so zeigen die T_{EM} der jungen Mäuse eine um 4,32 % höhere Endpunktllyse und eine um 34,27 % schnellere maximale

Lyserate als die T_{CM} (Abbildung 29A, B, C). Bei den T_{EM} der alten Mäuse liegt eine um 4,96 % höhere Endpunktlyse und eine um 14,62 % schnellere maximale Lyserate als bei den entsprechenden T_{CM} vor (Abbildung 29A, B, C).

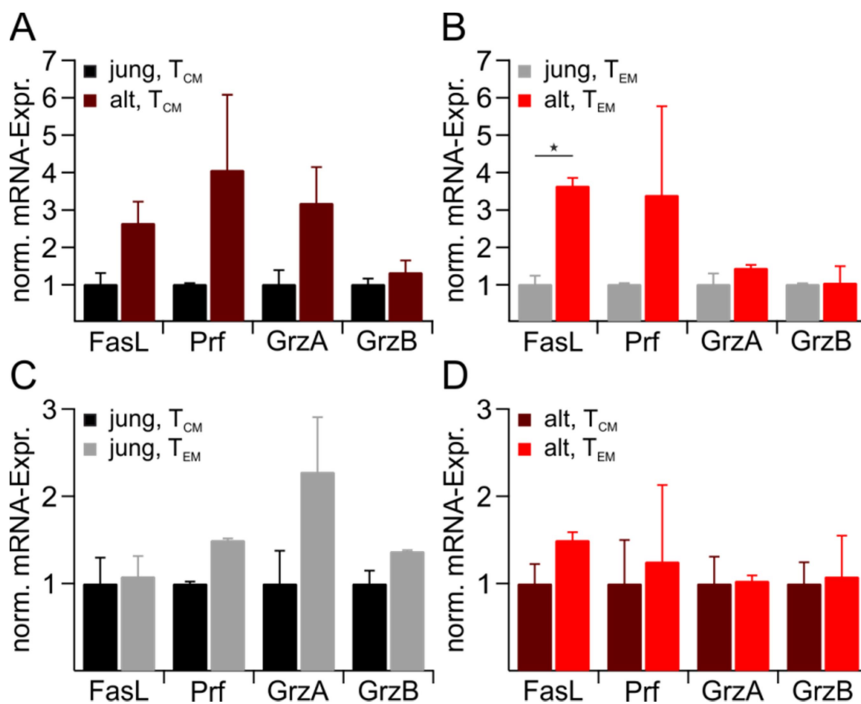


Abbildung 30: Die beiden prädominierenden Subtypen aktivierter CD8⁺ T-Zellen, zentrale und Effektor-Gedächtnis-T-Zellen, zeigen altersbedingte Steigerungen der mRNA-Expressionslevel zytotoxizitätsrelevanter Proteine. Auf die Referenzgene Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase 1 und TATA-Box Binding Protein und anschließend auf die Werte der CD8⁺ T-Zellsubtypen der jungen Mäuse normierte mRNA-Expressionen des Fas-Liganden (FasL), von Perforin (Prf) und den Granzymen A (GrzA) und B (GrzB) sind in (A) für die zentralen (T_{CM}) und in (B) für die Effektor-Gedächtnis-T-Zellen (T_{EM}) junger (T_{CM} : schwarz, n = 2; T_{EM} : grau, n = 2) und alter (T_{CM} : dunkelrot, n = 3; T_{EM} : hellrot, n = 2) Mäuse dargestellt. Die Balkendiagramme in (C) und (D) zeigen die Unterschiede in den mRNA-Levels besagter Proteine zwischen T_{CM} und T_{EM} der jungen respektive der alten Kohorte. Hierfür wurde jeweils auf die T_{CM} der gleichen Kohorte normiert. Die Balkendiagramme sind als Mittelwert + Standardfehler des arithmetischen Mittels angegeben. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$.

Die qRT-PCRs für den FasL, Perforin, Granzym A und Granzym B zeigen ähnliche Tendenzen. Bei der Untersuchung altersbedingter Unterschiede bei T_{CM} und T_{EM} ist zu erkennen, dass beide Subtypen bei CD8⁺ T-Zellen alter Mäuse über höhere mRNA-Levels verfügen als ihre jeweiligen Pendanten junger Mäuse (Abbildung 30A, B). Die CD8⁺ T_{CM} alter Mäuse weisen um 164,38 % höhere FasL-, um 307,22 % höhere Perforin-, um 218,30 % höhere Granzym A- und um 31,74 % höhere Granzym B-mRNA-Levels auf als die T_{CM} junger Mäuse (Abbildung 30A). Bei den T_{EM} liegen für die CD8⁺ T-Zellen alter Mäuse um 264,70 % höhere FasL-, um 239,88 % höhere Perforin-, um 218,30 % höhere Granzym A- und um 3,55 % höhere Granzym B-mRNA-Levels vor als bei dem gleichen Subtyp der jungen Mäuse (Abbildung 30B). Der Vergleich zwischen den beiden Subtypen zeigt, dass die T_{EM} junger Mäuse über 8,16 % höhere FasL-, 49,55 % höhere Perforin-, 128,03 % höhere Granzym A- und 37,01 % höhere Granzym B-mRNA-Levels verfügen als die T_{CM} junger Mäuse (Abbildung 30C). Bei den T_{EM} alter Mäuse belaufen sich die Erhöhungen der mRNA-Levels

für den FasL auf 49,61 %, für Perforin auf 24,95 %, für Granzyme A auf 2,96 % und für Granzyme B auf 7,82 % (Abbildung 30D).

Die Ergebnisse zeigen, dass die gesteigerte Kinetik der CD8⁺ T-Zellen scheinbar nicht auf den altersbedingten Unterschieden in der Subtypenverteilung von CD8⁺ T-Zellen zurückzuführen ist. Sowohl T_{CM} als auch T_{EM} alter Mäuse weisen eine schnellere Kinetik im Vergleich zu ihren aus jungen Mäusen stammenden Pendanten auf. Gleiches scheint für die mRNA-Expressionslevels der für die zytotoxische Funktion verantwortlichen Proteine zu gelten. Die beiden prädominierenden Subtypen stimulierter CD8⁺ T-Zellen aus alten Mäusen weisen jeweils deutlich höhere mRNA-Level auf, als die gleichen Subtypen junger Mäuse. Weiterhin bestätigen die Ergebnisse den Stand der Forschung für beide Altersgruppen. Sowohl für die Zellen der jungen als auch der alten Maus lässt sich eine stärkere zytotoxische Funktion und eine höhere mRNA-Expression dafür relevanter Proteine bei den T_{EM} im Vergleich zu den T_{CM} feststellen.

5.3.4. Höheres Alter wirkt sich protektiv auf Concanamycin A-vermittelte Reduktion der Zytotoxizität muriner CD8⁺ T-Zellen aus

Concanamycin A (CMA) ist ein spezifischer Inhibitor vakuolärer H⁺-ATPasen (Huss et al., 2002). Diese H⁺-ATPasen transportieren H⁺-Ionen durch Hydrolyse von ATP in Vesikel der Endo- und Exozytose, Lysosomen, Endosomen und Golgi-Vesikel und tragen durch diesen Protonengradienten zum sauren pH-Wert der Vesikel bei (Beyenbach & Wieczorek, 2006). Ein praktischer Effekt der Behandlung CD8⁺ T-Zellen und natürlicher Killerzellen mit niedrigen Konzentrationen CMA ist die Inhibierung der durch lytische Granula vermittelten Zytotoxizität, ohne in den FasL/FasR-Weg einzugreifen (Backes et al., 2018; Kataoka et al., 1996). Die Inhibierung verursacht einen Anstieg des pH-Werts in lytischen Granula, der wiederum zu einer Konformationsänderung der enthaltenen zytotoxischen Proteine, Perforin und den Granzymen, führt, wodurch diese ihre Funktionalität verlieren (Kataoka et al., 1996).

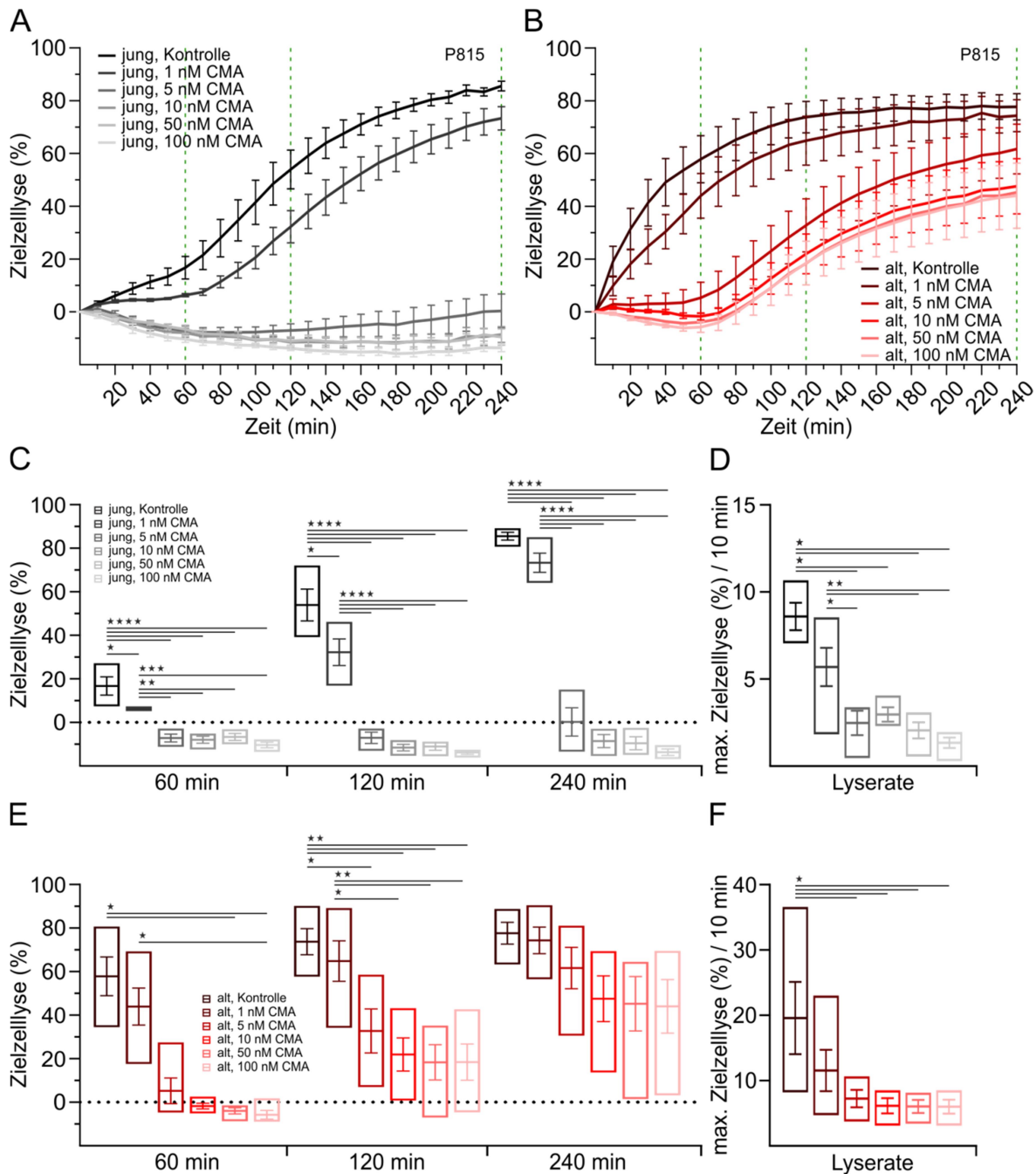


Abbildung 31: CD8⁺ T-Zellen alter Mäuse weisen eine geringere Beeinflussung ihrer zytotoxischen Funktion durch das den lytischen Granula-vermittelten Zytotoxizitätsmechanismus inhibierende Agens Concanamycin A auf. Kinetische Zytotoxizitätsassays mit drei Tage stimulierten, unbehandelten oder Concanamycin A-(CMA)-behandelten CD8⁺ T-Zellen (A) junger (schwarz/grau, n = 4) und (B) alter (dunkelrot/hellrot, n = 5) Mäuse als Effektor- und P815 als Zielzellen in einem Effektor-Zielzell-Verhältnis von 20:1. Die unbehandelten Kontrollen der jungen Mäuse sind in schwarz, die der alten Mäuse in dunkelrot dargestellt. Die Ergebnisse der mit 1 nM bis 100 nM CMA behandelten CD8⁺ T-Zellen sind in graduellen Abstufungen dieser Farben dargestellt. Die schwebenden Balkendiagramme in (C) und (E) zeigen die zugehörigen prozentualen Zielzelllysen der CD8⁺ T-Zellen beider Altersgruppen zu den Zeitpunkten 60 min, 120 min und 240 min. Die schwebenden Balken in (D) und (F) repräsentieren die entsprechenden maximalen Zielzelllysen in einem 10-Minutenintervall als Maß der Kinetik. Die Zytotoxizitätskurven sind als Mittelwert \pm Standardfehler des arithmetischen Mittels angegeben. Die äußere Abgrenzung der schwebenden Balken zeigt die Probenverteilung von Minimum bis Maximum. Innerhalb der Balken ist das arithmetische Mittel \pm Standardfehler des arithmetischen Mittels dargestellt. * p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001, **** p < 0,0001.

Dieser CMA-vermittelte Effekt wurde genutzt, um den Anteil der Perforin- und Granzym-basierten Zytotoxizität für CD8⁺ T-Zellen junger (schwarz bis hellgrau, n = 4) und alter Mäuse

(dunkelrot bis hellrot, $n = 5$) und potenzielle Unterschiede zwischen beiden in kinetischen Zytotoxizitätsassays zu ermitteln (Abbildung 31). Dafür wurden die Zellen zwei Stunden vor Assaybeginn mit 1 nM bis 100 nM CMA präinkubiert. Die niedrigste Konzentration von 1 nM verursacht bei $CD8^+$ T-Zellen beider Altersgruppen eine leichte Reduktion der Zytotoxizität im Vergleich zu ihren Kontrollen, die etwas deutlicher für die Zellen der jungen Maus ausfällt (Abbildung 31A, B). Bei höheren Konzentrationen von CMA, zwischen 5 und 100 nM, verlieren die $CD8^+$ T-Zellen der jungen Maus vollständig ihre zytotoxische Eigenschaft und kommen im Mittelwert zu keinem Zeitpunkt des kinetischen Zytotoxizitätsassays mehr auf positive Werte (Abbildung 31A, C). Die $CD8^+$ T-Zellen der alten Mäuse weisen eine zunehmende Reduktion der Zytotoxizität mit steigender CMA-Konzentration auf (Abbildung 31B, E). Ab einer Konzentration von 5 nM bis 100 nM wechselt der Verlauf der Kurven der T-Zellen der alten Mäuse von ihrem charakteristischen hyperbolischen zu einem, an die Kurven der Zellen der jungen Mäuse erinnernden, sigmoidalen Verlauf (Abbildung 31A, B). Hierbei ist in den ersten 60 min des Assays nahezu keine Zytotoxizität zu vermerken (Abbildung 31B). In den verbleibenden 180 min steigt die Zytotoxizität allerdings auf einen Maximalwert zwischen 61,70 % bei 5 nM und 44,00 % bei 100 nM CMA an (Abbildung 31B, E). Eine vollständige Reduktion der Zytotoxizität, wie sie bei den Zellen der jungen Mäuse ab einer CMA-Konzentration von 5 nM erfolgt, findet also bei den $CD8^+$ T-Zellen der alten Mäuse selbst für die höchste verwendete Konzentration von 100 nM nicht statt. Vergleicht man den Verlauf der Kurven und die Zielzellyse zu den Zeitpunkten 60 min, 120 min und 240 min der mit 10 nM, 50 nM und 100 nM behandelten $CD8^+$ T-Zellen der alten Mäuse, ist zu erkennen, dass sich die Reduktion der Zytotoxizität einer Sättigung zu nähern scheint (Abbildung 31B, E). Zwischen der Zytotoxizität der mit 10 nM und 50 nM behandelten $CD8^+$ T-Zellen ist nur noch eine geringfügig stärkere Reduktion bei der höheren CMA-Konzentration zu erkennen (Abbildung 31B, E). Die Zytotoxizität der mit 50 nM und 100 nM behandelten $CD8^+$ T-Zellen der alten Mäuse zeigen keine bedeutenden Unterschiede in der Stärke der CMA-vermittelten Reduktion (Abbildung 31B, E). Die maximale Lyserate sinkt für die $CD8^+$ T-Zellen der jungen Mäuse von 8,60 % / 10 min für die Kontrolle über 5,69 % / 10 min bei 1 nM CMA auf minimale Raten zwischen 2,98 % / 10 min und 1,34 % / 10 min bei 5 nM bis 100 nM CMA (Abbildung 31D). Für die $CD8^+$ T-Zellen der alten Maus sinkt die maximale Lyserate von 19,57 % / 10 min bei der Kontrolle über 11,54 % / 10 min bei 1 nM CMA auf 7,24 % / 10 min bei 5 nM CMA. Zwischen 10 nM und 100 nM CMA verändert sich die maximale Lyserate zwischen 6,16 % / 10 min und 6,03 % / 10 min kaum (Abbildung 31F).

Zusammenfassend lässt sich also ein stärkerer CMA-vermittelter Effekt auf die $CD8^+$ T-Zellen der jungen Maus feststellen. Die zweistündige Inkubation mit Konzentrationen über 1 nM CMA sorgen bei diesen Zellen für ein vollständiges Erliegen der Zytotoxizität. Im Gegensatz dazu scheint das Inhibieren der vakuolären H^+ -ATPasen zur funktionalen

Hemmung von Perforin und den Granzymen einen geringeren Effekt auf die CD8⁺ T-Zellen alter Mäuse zu haben. Zwar lässt sich über zweistündige Inkubation mit Konzentrationen über 1 nM CMA die Zytotoxizität für 60 min unterbinden, allerdings erfolgt daran anschließend eine deutliche Zunahme der mittleren prozentualen P815-Lyse bis zum Ende des Assays.

5.3.5. Stärkere Reduktion der Zytotoxizität von CD8⁺ T-Zellen junger Mäuse durch Blockieren des Fas-Ligand/Fas-Rezeptor-Signalwegs

Um den Anteil der auf der Interaktion zwischen FasL auf der CD8⁺ T-Zelle und FasR auf der Zielzelle beruhenden Zytotoxizität für CD8⁺ T-Zellen junger und alter Mäuse und potenzielle Unterschiede zwischen beiden zu ermitteln, wurde in kinetischen Zytotoxizitätsassays ein blockierender anti-FasL-Antikörper in einer Konzentration von 50 µg/ml zu den Zellen hinzugegeben, um diesen Zytotoxizitätsmechanismus zu unterbinden.

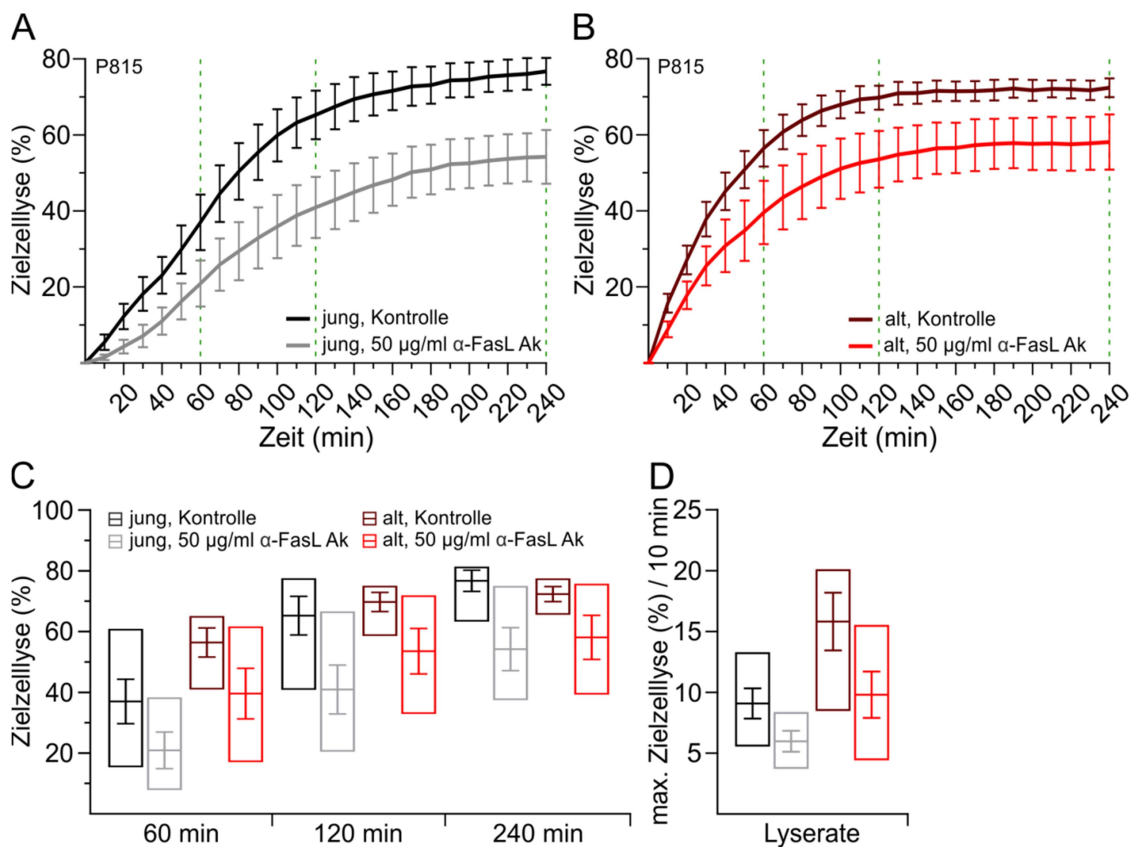


Abbildung 32: Die Lyse von P815-Zellen durch CD8⁺ T-Zellen alter Mäuse wird geringfügig weniger durch die Inhibition des Fas-Ligand-vermittelten Zytotoxizitätsmechanismus reduziert als die Lyse durch CD8⁺ T-Zellen junger Mäuse. Kinetische Zytotoxizitätsassays mit drei Tage stimulierten, unbehandelten oder mit 50 µg/ml eines Antikörpers gegen den Fas-Liganden (α-FasL Ak) behandelten CD8⁺ T-Zellen (A) junger (schwarz/grau, n = 5) und (B) alter (dunkelrot/hellrot, n = 5) Mäuse als Effektor- und P815 als Zielzellen in einem Effektor-Zielzell-Verhältnis von 20:1. Die unbehandelten Kontrollen der jungen Mäuse sind in schwarz, die der alten in dunkelrot dargestellt. Die anti-FasL-Antikörperbehandelten CD8⁺ T-Zellen sind in grau respektive hellrot abgebildet. Das schwebende Balkendiagramm in (C) zeigt die zugehörigen prozentualen Zielzelllysen der CD8⁺ T-Zellen beider Altersgruppen zu den Zeitpunkten 60 min, 120 min und 240 min. Die schwebenden Balken in (D) repräsentieren die entsprechenden maximalen Zielzelllysen in einem 10-Minutenintervall als Maß der Kinetik. Die Zytotoxizitätskurven sind als Mittelwert ± Standardfehler des arithmetischen Mittels angegeben. Die äußere Abgrenzung der schwebenden Balken zeigt die Probenverteilung von Minimum bis Maximum. Innerhalb der Balken ist das arithmetische Mittel ± Standardfehler des arithmetischen Mittels dargestellt.

Aus den Ergebnissen gehen sowohl für die CD8⁺ T-Zellen der jungen (schwarz/grau, n = 5) als auch der alten (dunkelrot/hellrot, n = 5) Mäuse eine Reduktion der Höhe der P815-Lyse und der Kinetik durch die Antikörperbehandlung hervor (Abbildung 32). Hierbei ist die Zielzellyse nach 60 min für die Zellen der jungen Mäuse anti-FasL-antikörperbedingt um 43,56 % reduziert und die der CD8⁺ T-Zellen der alten Mäuse um 29,88 % (Abbildung 32A, B, C). Nach 120 min sinkt diese Reduktion für die Zellen der jungen Mäuse auf 37,27 % und für die der alten Mäuse auf 23,26 % (Abbildung 32A, B, C). Zum Ende des Zytotoxizitätsassays zeigen die antikörperbehandelten CD8⁺ T-Zellen der jungen Mäuse eine Reduktion in der Zielzellyse von 29,29 % und die der alten Mäuse von 19,69 % (Abbildung 32A, B, C). Die Kinetik, quantifiziert als maximale Zielzellyse pro zehnminütigem Zeitintervall ist bei den CD8⁺ T-Zellen der jungen Mäuse durch die Antikörperbehandlung um 34,10 % und bei denen der alten Mäuse um 38,05 % reduziert (Abbildung 32D).

Somit ist der reduzierende Effekt des anti-FasL-Antikörpers auf die Zielzellyse bei den CD8⁺ T-Zellen der jungen Mäuse ausgeprägter und nimmt bei beiden Altersgruppen mit voranschreitendem Assay ab. Im Gegensatz zur Höhe der Zielzellyse ist die Kinetik allerdings bei den CD8⁺ T-Zellen der alten Mäuse etwas stärker reduziert.

Da P815-Zellen in der Literatur häufig als Zelllinie mit keiner bis geringer FasR-Expression beschrieben werden, wurden die kinetischen Zytotoxizitätsassays mit FasR-exprimierenden, von EL4- abgeleiteten E.G7-Zellen wiederholt (Nagarkatti & Davis, 2003; Saxena & Adler, 1999).

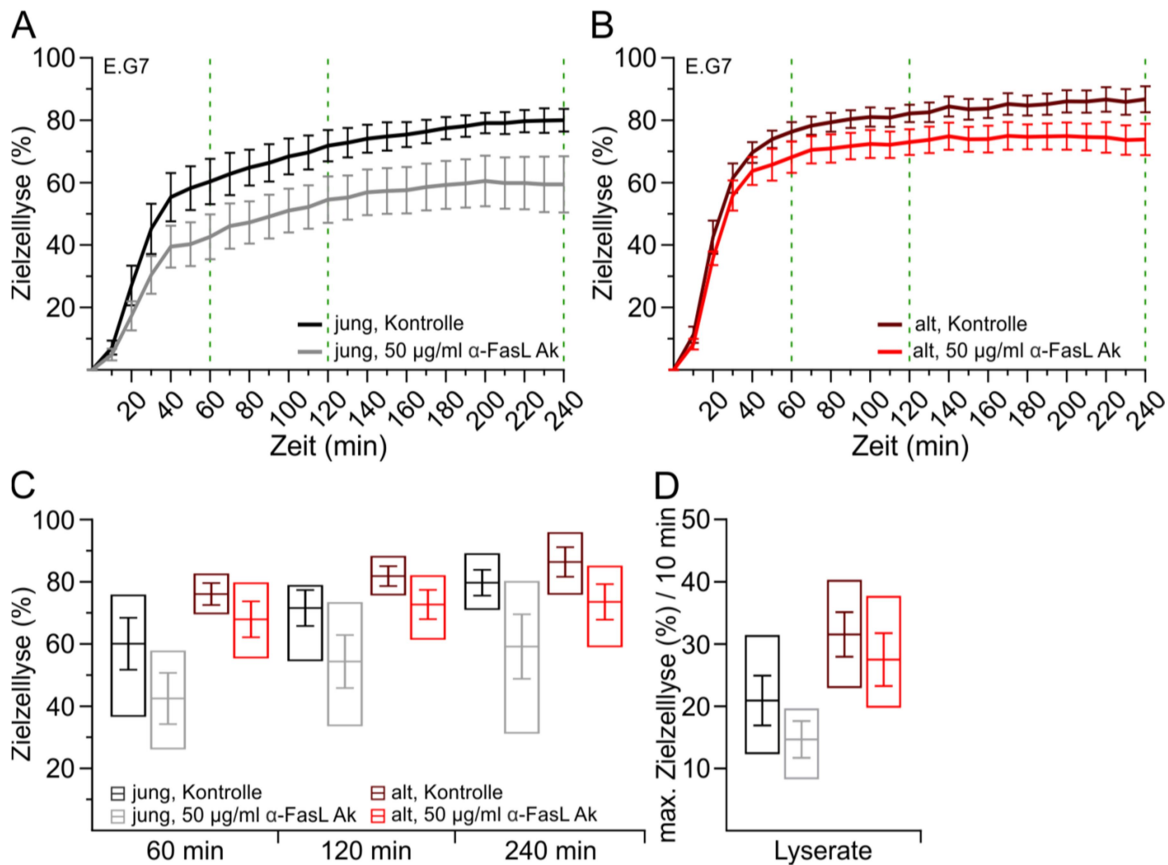


Abbildung 33: Die Lyse von E.G7-Zellen durch CD8⁺ T-Zellen alter Mäuse wird geringfügig weniger durch die Inhibition des Fas-Ligand-vermittelten Zytotoxizitätsmechanismus reduziert als die Lyse durch CD8⁺ T-Zellen junger Mäuse. Kinetische Zytotoxizitätsassays mit drei Tage stimulierten, unbehandelten oder mit 50 µg/ml eines Antikörpers gegen den Fas-Liganden (α-FasL Ak) behandelten CD8⁺ T-Zellen (A) junger (schwarz/grau, n = 4) und (B) alter (dunkelrot/hellrot, n = 4) Mäuse als Effektor- und E.G7 als Zielzellen in einem Effektor:-Zielzell-Verhältnis von 20:1. Die unbehandelten Kontrollen der jungen Mäuse sind in schwarz, die der alten in dunkelrot dargestellt. Die anti-FasL-antikörperbehandelten CD8⁺ T-Zellen sind in grau respektive hellrot abgebildet. Das schwebende Balkendiagramm in (C) zeigt die zugehörigen prozentualen Zielzelllysen der CD8⁺ T-Zellen beider Altersgruppen zu den Zeitpunkten 60 min, 120 min und 240 min. Die schwebenden Balken in (D) repräsentieren die entsprechenden maximalen Zielzelllysen in einem 10-Minutenintervall als Maß der Kinetik. Die Zytotoxizitätskurven sind als Mittelwert ± Standardfehler des arithmetischen Mittels angegeben. Die äußere Abgrenzung der schwebenden Balken zeigt die Probenverteilung von Minimum bis Maximum. Innerhalb der Balken ist das arithmetische Mittel ± Standardfehler des arithmetischen Mittels dargestellt.

Aus den Ergebnissen geht hervor, dass die zytotoxische Wirkung der CD8⁺ T-Zellen auf beide Zielzelllinien vergleichbar durch die Behandlung mit 50 µg/ml eines blockierenden anti-FasL-Antikörpers verringert wird (Abbildung 32, Abbildung 33). Hierbei beläuft sich die Reduktion nach 60 min für die Zellen der jungen Mäuse (schwarz/grau, n = 4) gegen die E.G7-Zellen auf 29,36 % und die der alten Mäuse (dunkelrot/hellrot, n = 4) auf 10,70 % (Abbildung 33A, B, C). Nach 120 min sinkt die Reduktion für die Zellen der jungen Mäuse leicht auf 24,07 %, während die der alten Mäuse mit einer Reduktion von 11,47 % geringfügig zunimmt (Abbildung 33A, B, C). Zum Ende des Zytotoxizitätsassays zeigen die antikörperbehandelten CD8⁺ T-Zellen der jungen Mäuse eine Reduktion in der E.G7-Lyse von 25,75 % und die der alten Mäuse von 14,86 % (Abbildung 33A, B, C). Die Kinetik der Zielzelllyse ist bei den CD8⁺ T-Zellen der jungen Mäuse durch die Behandlung um 29,76 % und bei denen der alten Mäuse um 12,69 % reduziert (Abbildung 33D).

Obwohl die EG.7-Zellen über eine höhere Expression des FasR als die P815-Zellen verfügen sollten erfolgt eine geringere anti-FasL-antikörpervermittelte Reduktion der Zytotoxizität der CD8⁺ T-Zellen. Neben der für die E.G7-Zellen vermindert ausfallenden Reduktion der Höhe der Zielzellyse (Abbildung 32A, B, C, Abbildung 33A, B, C) fällt auch die Reduktion der Kinetik schwächer aus (Abbildung 32D, Abbildung 33D). Wie auch schon bei den P815-Zielzellen ist die anti-FasL-antikörperbedingte Reduktion der zytotoxischen Funktion der CD8⁺ T-Zellen bei der jungen Kohorte stärker als bei der alten.

Der anti-FasL-Antikörper verursacht somit eine Reduktion der Zytotoxizität der CD8⁺ T-Zellen junger und alter Mäuse, die für die Zellen junger Mäuse insgesamt etwas stärker ausfällt. Diese Reduktion erfolgt interessanterweise bei den FasR kaum exprimierenden P815-Zellen in einer höheren Größenordnung als bei den FasR stärker exprimierenden, von EL4-abgeleiteten E.G7-Zellen.

5.3.6. Cyclosporin A-Behandlung vermindert die Zytotoxizität von CD8⁺ T-Zellen alter aber nicht junger Mäuse

Cyclosporin A (CsA) ist ein Immunsuppressivum, welches beim Menschen beispielsweise nach Transplantationen oder bei chronisch entzündlichen Erkrankungen, wie Colitis ulcerosa, verabreicht wird (Lichtiger et al., 1994; Starzl, Klintmalm, Porter, Iwatsuki, & Schröter, 1981). Seine Wirkung beruht darauf, dass es als Komplex mit endogenem Cyclophilin A an Calcineurin, eine Calmodulin-abhängige Phosphatase, bindet (Matsuda & Koyasu, 2000). Daraus folgt, dass die katalytische Untereinheit des Calcineurins nicht mehr imstande ist, den Transkriptionsfaktor NFAT zu dephosphorylieren, wodurch dessen Kernlokalisierungssequenz maskiert bleibt und die Expression NFAT-assoziiertes Gene, wie *IL-2* und *FasL* unterbunden wird (Matsuda & Koyasu, 2000). Stimulierte CD8⁺ T-Zellen alter Mäuse weisen, wie in Kapiteln 5.2.2 und 5.2.6 beschrieben, verminderte Ca²⁺-Signale und geringere Expressionslevels für STIMs und Orais auf und die Aktivierung von NFAT wird durch den Ca²⁺-Einstrom über STIM-aktivierte Orai-Kanäle reguliert (X. Liu et al., 2016). Daher wurde der Effekt des Calcineurin- respektive NFAT-Inhibitors CsA auf die zytotoxische Aktivität CD8⁺ T-Zellen und potenzielle Altersunterschiede untersucht.

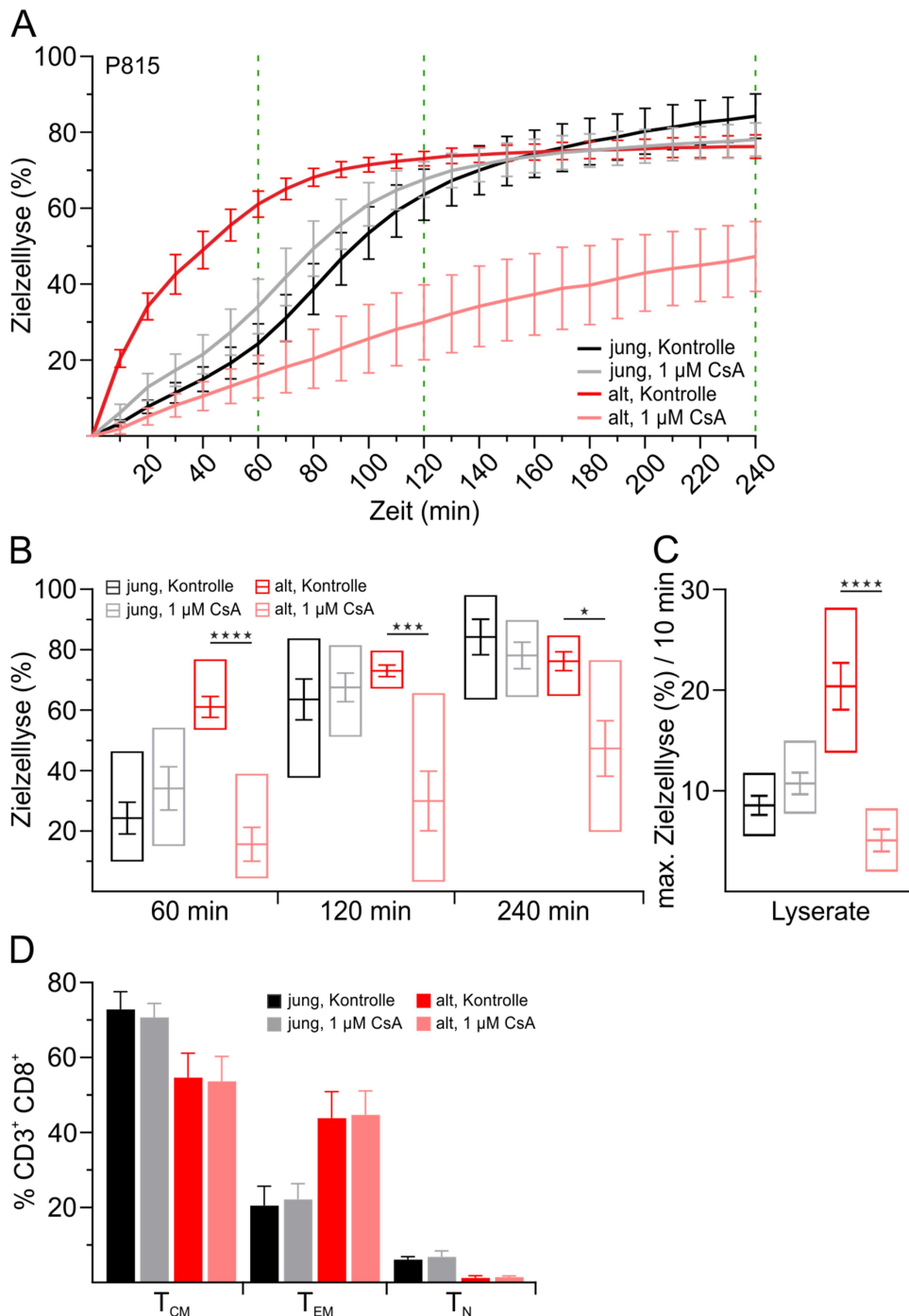


Abbildung 34: Das Immunsuppressivum Cyclosporin A reduziert die Zytotoxizität CD8⁺ T-Zellen alter, aber nicht junger Mäuse erheblich, ohne Einfluss auf die Differenzierung zu nehmen. (A) Kinetische Zytotoxizitätsassays mit drei Tage stimulierten, unbehandelten oder 1 μ M Cyclosporin A-(CsA)-behandelten CD8⁺ T-Zellen junger (schwarz/grau: n = 6) und alter (dunkelrot/hellrot: n = 6) Mäuse als Effektor- und P815 als Zielzellen in einem Effektor:-Zielzell-Verhältnis von 20:1. Die unbehandelten Kontrollen der jungen Mäuse sind in schwarz, die der alten in dunkelrot dargestellt. Die CsA-behandelten CD8⁺ T-Zellen sind in grau respektive hellrot abgebildet. Das schwebende Balkendiagramm in **(B)** zeigt die zugehörigen prozentualen Zielzelllysen der CD8⁺ T-Zellen beider Altersgruppen zu den Zeitpunkten 60 min, 120 min und 240 min. Die schwebenden Balken in **(C)** repräsentieren die entsprechenden maximalen Zielzelllysen in einem zehnminütigen Intervall als Maß der Kinetik. **(D)** zeigt die prozentualen Anteile an naiven (T_N), zentralen (T_{CM}) und Effektor-Gedächtnis-Zellen (T_{EM}) für die unbehandelten und CsA-behandelten CD8⁺ T-Zellen junger (Kontrolle: schwarzer Balken, n = 6; CsA-behandelt: graue Balken, n = 6) und alter (Kontrolle: dunkelrote Balken, n = 5; CsA-behandelt: hellrote Balken, n = 4) Mäuse. Die Zytotoxizitätskurven sind als Mittelwert \pm Standardfehler des arithmetischen Mittels angegeben. Die äußere Abgrenzung der schwebenden Balken in **(B)** und **(C)** zeigt die Probenverteilung von Minimum bis Maximum. Innerhalb der Balken ist das arithmetische Mittel \pm Standardfehler des arithmetischen Mittels dargestellt. Das Balkendiagramm in **(D)** zeigen das arithmetische Mittel + Standardfehler des arithmetischen Mittels. * p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001, **** p < 0,0001.

Hierfür wurden Zytotoxizitätsassays mit CD8⁺ T-Zellen alter und junger Mäuse durchgeführt, welche in Anwesenheit von 1 µM CsA stimuliert wurden (Abbildung 34). Die Ergebnisse dieser Zytotoxizitätsassays zeigen eine deutliche Reduktion der Zielzelllyse der CD8⁺ T-Zellen aus alten, aber nicht aus jungen Mäusen durch die Behandlung mit CsA (Abbildung 34A). Die quantitative Auswertung der Zytotoxizität zu den Zeitpunkten 60 min, 120 min und 240 min zeigt eine deutliche, signifikante CsA-vermittelte Reduktion um 74,42 % ($p < 0,0001$), 59,02 % ($p = 0,0007$) und 37,94 % ($p = 0,0152$) für die CD8⁺ T-Zellen alter Mäuse (Abbildung 34B). Für die stimulierten CD8⁺ T-Zellen junger Mäuse ergibt sich eine CsA-bedingte nicht signifikante Erhöhung der Zielzelllyse um 40,39 % bei 60 min, um 6,33 % bei 120 min und eine nicht signifikante Reduktion um 7,28 % bei 240 min (Abbildung 34B). Die maximale Zielzelllyse pro Zeitintervall von 10 min, als Maß für die Kinetik der Zytotoxizität, ist für die behandelten CD8⁺ T-Zellen alter Mäuse im Vergleich zu den unbehandelten signifikant um 75,10 % ($p < 0,0001$) reduziert (Abbildung 34C). Die Behandlung mit CsA sorgt bei den CD8⁺ T-Zellen junger Mäuse hingegen für eine tendenzielle Erhöhung der maximalen Zielzelllyse pro zehnmütigem Zeitintervall um 25,60 % (Abbildung 34C). Die durchflusszytometrische Analyse zeigt keine relevanten Veränderungen der Subtypenverteilung durch die Behandlung mit CsA (Abbildung 34D).

Die Behandlung mit dem Calcineurin- beziehungsweise NFAT-Inhibitor CsA führt somit zu einer stark verminderten Effizienz der Zytotoxizität CD8⁺ T-Zellen alter Mäuse. Im Gegensatz dazu ist der CsA-vermittelte Effekt auf CD8⁺ T-Zellen junger Mäuse marginal. Zu Beginn der Zytotoxizitätsassays kommt es bei den Zellen der jungen Mäuse sogar zu einer gesteigerten Kinetik.

5.3.7. Ca²⁺-Abhängigkeit der Zytotoxizität muriner CD8⁺ T-Zellen

Ca²⁺ ist als sekundärer Botenstoff neben zahlreichen anderen zellulären Funktionen auch an der Regulation der Zytotoxizität von CD8⁺ T-Zellen beteiligt (Gately & Martz, 1977; Golstein & Smith, 1976; Maul-Pavicic et al., 2011; Plaut, Bubbers, & Henney, 1976; Pores-Fernando & Zweifach, 2009; X. Zhou et al., 2018). Sobald eine T-Zelle auf ihr in einem MHC-Komplex präsentiertes Antigen trifft, erfolgt ein Ca²⁺-Einstrom, der hauptsächlich über STIM-aktivierte Orai-Kanäle vermittelt wird (Zweifach, 2000). Hierbei liegt die optimale [Ca²⁺]_{ext} für die Ausübung ihrer zytotoxischen Funktion bei humanen CD8⁺ T-Zellen bei 0,5 mM (X. Zhou et al., 2018). Da die Expression von STIMs und Orais sowie der SOCE, wie in Kapiteln 5.2.2 und 5.2.6 beschrieben, in stimulierten CD8⁺ T-Zellen alter Mäuse reduziert sind und um die optimale [Ca²⁺]_{ext} für die Zytotoxizität muriner CD8⁺ T-Zellen zu ermitteln, wurde der Einfluss verschiedener [Ca²⁺]_{ext} auf die Zytotoxizität von CD8⁺ T-Zellen junger und alter Mäuse untersucht. Hierfür wurden kinetische Zytotoxizitätsassays in mit CaCl₂- oder dem Ca²⁺-Chelator EGTA-versetztem AIM V durchgeführt.

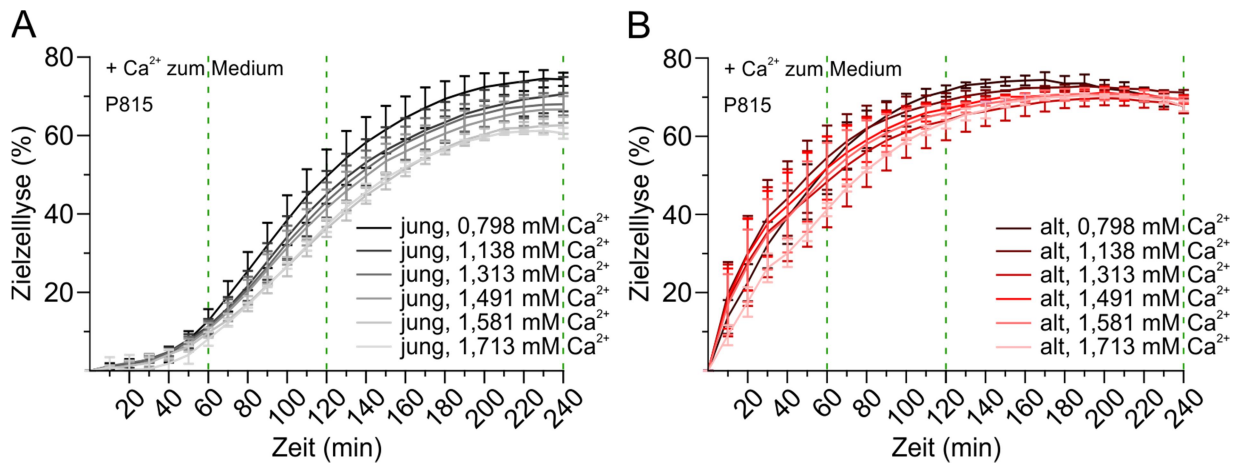


Abbildung 35: CD8⁺ T-Zellen alter Mäuse weisen eine marginal geringfügigere Beeinflussung ihrer zytotoxischen Funktion durch steigende externe Ca²⁺-Konzentrationen auf. Kinetische Zytotoxizitätsassays mit drei Tage stimulierten CD8⁺ T-Zellen (A) junger (schwarz/grau, n = 4) und (B) alter (dunkelrot/hellrot, n = 5) Mäuse als Effektor- und P815 als Zielzellen in einem Effektor-Zielzell-Verhältnis von 20:1. Die in AIM V-Medium vermessenen Zellen der jungen Mäuse sind in schwarz, die der alten Mäuse in dunkelrot dargestellt. Die Kurven der in zunehmender externer Ca²⁺-Konzentration vermessenen CD8⁺ T-Zellen sind in graduellen Abstufungen dieser Farben dargestellt. Die Zytotoxizitätskurven sind als Mittelwert ± Standardfehler des arithmetischen Mittels angegeben.

Die Zytotoxizitätsassays zeigen, dass eine effiziente Zytotoxizität altersunabhängig in einem weiten Bereich an $[Ca^{2+}]_{ext}$ gewährleistet ist. Die $[Ca^{2+}]$ des für die Assays verwendeten Mediums liegt bei 0,798 mM (Abbildung 35). Eine Erhöhung der Konzentration auf 1,138 mM, 1,313 mM, 1,491 mM, 1,581 mM und 1,713 mM sorgt bei den CD8⁺ T-Zellen junger Mäuse für eine dezente, stufenweise Abnahme der Kinetik und der Endpunktllyse (Abbildung 35A). Bei den CD8⁺ T-Zellen der alten Mäuse verursacht die Erhöhung der $[Ca^{2+}]_{ext}$, mit Ausnahme der höchsten Konzentration von 1,713 mM, zu Beginn der Assays eine schnellere Kinetik (Abbildung 35B). Im Gegensatz zu den Zellen der jungen Mäuse ist die Endpunktllyse bei den CD8⁺ T-Zellen der alten Mäuse für alle $[Ca^{2+}]_{ext}$ nahezu identisch (Abbildung 35B).

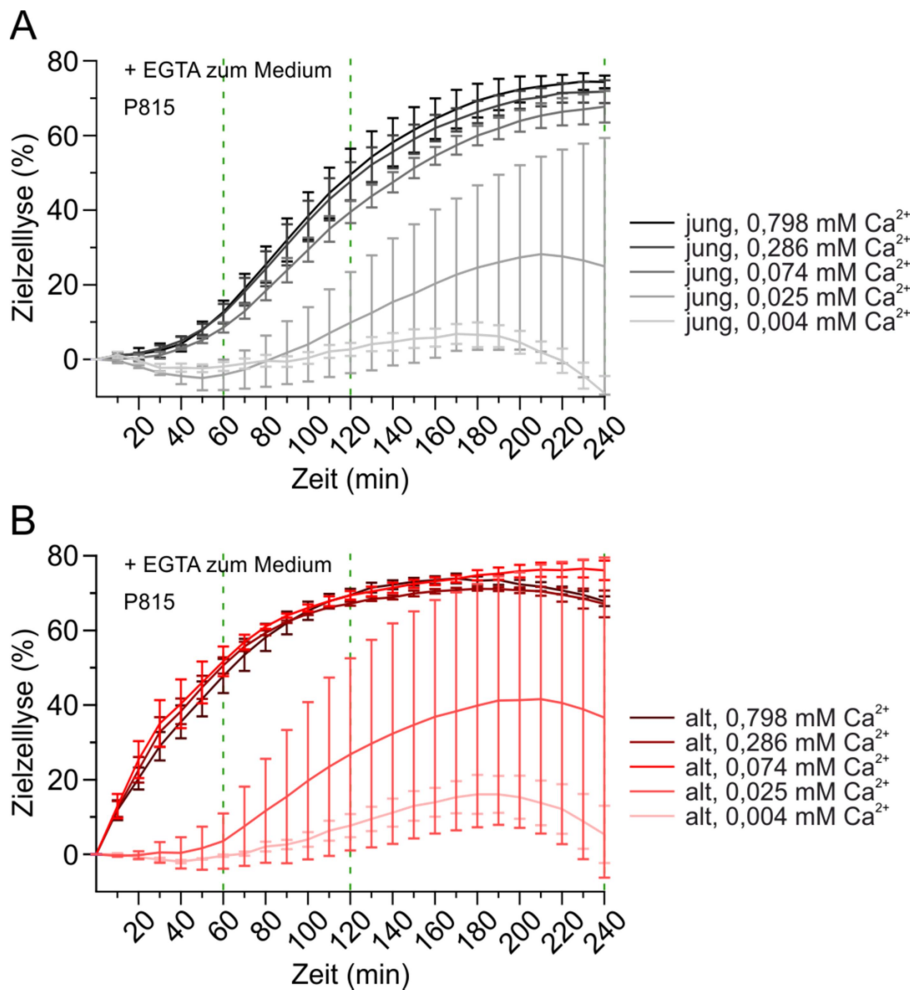


Abbildung 36: CD8⁺ T-Zellen alter Mäuse weisen eine marginal geringfügigere Beeinflussung ihrer zytotoxischen Funktion durch abnehmende externe Ca^{2+} -Konzentrationen auf. Kinetische Zytotoxizitätsassays mit drei Tage stimulierten CD8⁺ T-Zellen **(A)** junger (schwarz/grau, n = 2 - 3) und **(B)** alter (dunkelrot/hellrot, n = 2 - 3) Mäuse als Effektor- und P815 als Zielzellen in einem Effektor-Zielzell-Verhältnis von 20:1. Die in AIM V-Medium vermessenen Zellen der jungen Mäuse sind in schwarz, die der alten Mäuse in dunkelrot dargestellt. Die Kurven der in abnehmender externen Ca^{2+} -Konzentration vermessenen CD8⁺ T-Zellen sind in graduellen Abstufungen dieser Farben dargestellt. Die Zytotoxizitätskurven sind als Mittelwert ± Standardfehler des arithmetischen Mittels angegeben.

Das Absenken der $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ext}}$ durch Zugabe von EGTA (Abbildung 36) zeigt einen deutlicheren Phänotyp als das Erhöhen mittels CaCl_2 (Abbildung 35). Bei 0,286 mM und 0,074 mM erfolgt für die Zellen der jungen Mäuse, wie auch schon bei der Erhöhung der $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ext}}$ in Abbildung 35A, eine marginale Reduktion der Zytotoxizität (Abbildung 36A), wohingegen bei diesen Konzentrationen bei den CD8⁺ T-Zellen der alten Mäuse, wie zuvor bei den Erhöhungen der $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ext}}$ von 1,138 mM bis 1,581 mM in Abbildung 35B, eine leichte Erhöhung der Kinetik der Zielzelllyse zu vermerken ist (Abbildung 36B). Die niedrigere Konzentration von 0,074 mM verursacht sogar eine leichte Steigerung der Endpunktlyse bei den T-Zellen der alten Mäuse (Abbildung 36B). Ein weiteres Absenken der $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ext}}$ auf 0,025 mM verursacht bei beiden Altersgruppen einen drastischen Verlust der Zytotoxizität der CD8⁺ T-Zellen (Abbildung 36A, B). Hierbei deutet der sehr hoch ausfallende Standardfehler des arithmetischen Mittels darauf hin, dass in diesem Konzentrationsbereich die mindesterforderliche $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ext}}$ für

effiziente Zytotoxizität für murine CD8⁺ T-Zellen liegen könnte. Für beide Altersgruppen liegt eine Anzahl von zwei eigenstehenden Versuchen für diese Konzentration vor, von denen jeweils ein Versuch einen Verlauf vergleichbar zu den höheren $[Ca^{2+}]_{ext}$ zeigt und der andere Versuch einen in Höhe der niedrigsten $[Ca^{2+}]_{ext}$ (Abbildung 36). Bei der niedrigsten $[Ca^{2+}]_{ext}$ von 0,004 mM findet weder bei den CD8⁺ T-Zellen der alten noch bei denen der jungen Mäuse eine effiziente Zielzelllyse statt.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass Schwankungen in der $[Ca^{2+}]_{ext}$ nur einen geringfügigen Einfluss auf die Zytotoxizität muriner CD8⁺ T-Zellen zu haben scheinen. Hierbei haben Abweichungen von der $[Ca^{2+}]$ des für Immunzellen optimierten Mediums AIM V von 0,798 mM einen etwas stärkeren reduzierenden Effekt auf die Zytotoxizität der CD8⁺ T-Zellen junger Mäuse. Weiterhin haben die Versuche ergeben, dass eine $[Ca^{2+}]_{ext}$ von unter 0,025 mM altersunabhängig zu einem vollständigen Erliegen der zytotoxischen Funktion muriner CD8⁺ T-Zellen führt.

6. Diskussion

Der medizinische Fortschritt und hier allem voran die Entdeckung von Antibiotika und Impfstoffen sowie eine allgemeine Verbesserung der Hygiene haben über das letzte Jahrhundert zu einer immensen Steigerung der mittleren und maximalen Lebenserwartung des Menschen geführt (Oeppen & Vaupel, 2002; Tuljapurkar, Li, & Boe, 2000; Vaupel, 2010). Obwohl das natürlich erfreuliche Entwicklungen sind, bringt ein höheres Lebensalter auch einige gesundheitliche Komplikationen mit sich. Hierzu zählen beispielsweise die höhere Inzidenz von Krebserkrankungen oder die gesteigerte Anfälligkeit für virale Erkrankungen mit voranschreitendem Alter (Leng & Goldstein, 2010; White et al., 2014). Dies steht in kausalem Zusammenhang mit der Seneszenz des Immunsystems (Hodes, 1997; Roberts-Thomson, Whittingham, Youngchaiyud, & Mackay, 1974), im Zuge derer es zu Funktionalitätsverlusten bei Komponenten der angeborenen und der adaptiven Immunantwort kommt (Fulop et al., 2017). Hiervon sind als Teil des adaptiven Immunsystems auch $CD8^+$ T-Zellen betroffen (Nikolich-Žugich et al., 2012). Neben viel diskutierten Themen, wie der altersbedingten Einschränkung der Proliferation dieser Zellen (Jiang et al., 2007), dem Rückgang der naiven bei gleichzeitiger Zunahme an Gedächtnis-T-Zellsubtypen (Grossmann et al., 1991; Pinchuk & Filipov, 2008; Quinn et al., 2018) oder der verminderten Reaktionsfähigkeit auf Influenza-Viren (Deng, Jing, Campbell, & Gravenstein, 2004), wurde Ende der 1980er bis Anfang der 1990er Jahre der Einfluss des Alterns auf Ca^{2+} -Signale dieses Immunzelltyps untersucht (Grossmann et al., 1991; Philosophe & Miller, 1990; Proust et al., 1987). Hierbei wurde am Mausmodell eine altersbedingte Reduktion von Ca^{2+} -Signalen in $CD8^+$ T-Zellen festgestellt (Grossmann et al., 1991; Philosophe & Miller, 1990). Da zu dieser Zeit die Funktionen der Schlüsselproteine des Haupteintrittswegs von Ca^{2+} in diesen Zelltyp noch nicht entdeckt waren, liegen keine Untersuchungen zum Zusammenhang zwischen den Ca^{2+} -Signalreduktionen und dem STIM-Orai-vermittelten Ca^{2+} -Einstrom vor. Daher widmet sich der erste Teil dieser Arbeit der Erfassung dieses Zusammenhangs. Der zweite Teil der Arbeit beschäftigt sich mit der Hauptfunktion von $CD8^+$ T-Zellen, der T-zellvermittelten Zytotoxizität. Zwar existieren Publikationen zur Veränderung dieser Funktion im Alter, doch widersprechen sich die Ergebnisse je nach Versuchsaufbau und es mangelt generell an der Erfassung der Kinetik der Zytotoxizität (Brien et al., 2009; Messaoudi, LeMaout, Guevara-Patino, Metzner, & Nikolich-Žugich, 2004; Saxena & Adler, 1999; Smithey, Renkema, Rudd, & Nikolich-Žugich, 2011). Daher wurden für den zweiten Teil dieser Arbeit kinetische Zytotoxizitätsassays mit unstimulierten und *in vitro* stimulierten $CD8^+$ T-Zellen durchgeführt und die Expression der wichtigsten Proteine für diese Immunfunktion erfasst und zwischen jungen und alten Mäusen verglichen. Da es sich bei dieser Arbeit um Grundlagenforschung handelt wurden die altersbedingten Veränderungen der zytotoxischen Funktion nicht direkt in einem spezifischen Krankheitsmodell untersucht, sondern über eine unspezifische

Aktivierung des TZR-Signalwegs mittels eines anti-CD3-Antikörpers. Dieser wird von den Zielzellen mittels F_c -Rezeptoren gebunden, wodurch eine immunologische Synapse zwischen $CD8^+$ T-Zellen und den immortalisierten Krebszellen ausgebildet wird.

6.1. Zunahme an Gedächtnis- auf Kosten naiver $CD8^+$ T-Zellen

Wie in Abbildung 7 zu erkennen ist, findet im Einklang mit dem wissenschaftlichen Konsens bei den für diese Arbeit untersuchten C57BL6/J-Mäusen eine altersbedingte Abnahme der T_N und eine Anreicherung an T_{CM} und T_{EM} statt (Grossmann et al., 1991; Pinchuk & Filipov, 2008; Quinn et al., 2018). Eine der Hauptursachen für dieses Phänomen ist die Involution des Thymus, bei der sich das für die Umwandlung von Vorläufer- zu reifen T-Zellen zuständige Gewebe zurückbildet und durch Fettgewebe ausgetauscht wird (Palmer, 2013). Dieser Prozess startet im ersten Lebensjahr und läuft kontinuierlich bis zum Lebensende weiter (Steinmann, Klaus, & Müller-Hermelink, 1985). Dementsprechend verringert sich im Alter auch die Ausbeute an neugenerierten T_N , welche im Menschen hauptsächlich über klonale Expansion aufrechterhalten werden (Goronzy, Fang, Cavanagh, Qi, & Weyand, 2015; Qi, Zhang, Weyand, & Goronzy, 2014). Eine weitere altersbedingte Einschränkung des naiven T-Zellpools ist die vermutlich durch Proliferation in der Peripherie geförderte Entstehung virtueller Gedächtniszellen (T_{VM}) (Goldrath, Bogatzki, & Bevan, 2000; Renkema, Li, Wu, Smithey, & Nikolich-Žugich, 2014). Diese Zellen sind zwar, ähnlich den T_N , antigenunerfahren, reagieren allerdings schneller auf ihr spezifisches Antigen als T_N und weisen Oberflächenmarker von Gedächtnis-T-Zellen, wie CD44, auf (Akue, Lee, & Jameson, 2012). Wie auch im Körper durch spezifische TZR-Aktivierung verursacht die *in vitro*-Stimulation mittels anti-CD3-/anti-CD28-antikörpergekoppelter Beads bei beiden Altersgruppen einen Rückgang des T_N -Anteils bei gleichzeitiger Zunahme des T_{EM} -Anteils an der Gesamtpopulation (Abbildung 7). Diese Differenzierung von T_N zu T_{EM} konnte in dieser Arbeit über einen Zeitraum von zehn Tagen beobachtet werden und resultierte bei beiden Altersgruppen in nahezu ausschließlich aus T_{EM} bestehenden T-Zellpopulationen mit T_{EM} -Anteilen von 86,38 % bei den $CD8^+$ T-Zellen der jungen und von 90,43 % bei denen der alten Mäuse (Abbildung 7G, H).

6.2. Altersbedingt reduzierte Ca^{2+} -Signale muriner $CD8^+$ T-Zellen

Ca^{2+} ist ein ausgesprochen wichtiger sekundärer Botenstoff für die Funktionalität des Immunsystems (Feske et al., 2015; Vig & Kinet, 2009). Veränderungen der Ca^{2+} -Homöostase wurden bereits mit einer Vielzahl von altersbedingten neurodegenerativen (Bezprozvanny, 2010; Mattson, 2007; Pchitskaya, Popugaeva, & Bezprozvanny, 2018), autoimmunen und entzündlichen Erkrankungen assoziiert (Braun et al., 2009; Schuhmann et al., 2010; Shaw & Feske, 2012). Im Zuge der Immunoseneszenz findet eine allgemeine, kontinuierliche Abnahme der Effektivität des Immunsystems statt, wovon natürlich auch T-

Zellen betroffen sind (Nikolich-Žugich, 2014; Plowden et al., 2004; Quinn et al., 2018). Neben den in Kapiteln 6 und 6.1. diskutierten Unterschieden in der Verteilung der T-Zellsubpopulationen ist auch die Ca^{2+} -Homöostase altersbedingt verschieden. Hierzu wurden Ende der 1980er bis Anfang der 2000er Jahre Publikationen zu einer Verminderung der Ca^{2+} -Signale bei der gesamten T-Zellpopulation (Proust et al., 1987), isolierten CD4^+ T-Zellen (Grossmann et al., 1991; Philosophe & Miller, 1990; Tamura et al., 2000) und CD8^+ T-Zellen (Grossmann et al., 1991; Philosophe & Miller, 1990) alter Mäuse nach Mitogen- oder TZR-Stimulation veröffentlicht. Den Haupteintrittsweg von Ca^{2+} in CD8^+ T-Zellen stellt für diese Signale der über das ER-membranständige Ca^{2+} -Sensorprotein STIM und die in der Plasmamembran befindlichen Orai-Kanäle vermittelte SOCE dar (Feske et al., 2012; Schwarz et al., 2013; Trebak & Kinet, 2019). Somit war zur Zeit der Feststellung der altersbedingt verminderten Ca^{2+} -Signale in T-Zellen zwar das Prinzip des kapazitiven Ca^{2+} -Einstroms bekannt (Putney, 1986), die Funktionen der Komponenten STIM (Liou et al., 2005; Roos et al., 2005) und Orai (Feske et al., 2006; Parekh & Putney, 2005; Vig et al., 2006) wurden allerdings erst 2005 bis 2006 aufgedeckt. Daher wurde in dieser Arbeit zum ersten Mal eine detaillierte Analyse der Ca^{2+} -Signale von CD8^+ T-Zellen alter Mäuse mit Fokus auf den über STIM-Sensorproteine und Orai-Kanäle vermittelten Ca^{2+} -Einstrommechanismus durchgeführt. Hierbei konnten die altersbedingten Reduktionen in Ca^{2+} -Signalen reproduziert und erstmals mit veränderten Expressionen einiger Isoformen der Schlüsselproteine STIM und Orai sowie der PMCA verknüpft werden.

Die Fura2-AM-vermittelten Ca^{2+} -Signale sind in dieser Arbeit als Veränderung des Verhältnisses zwischen der nach Anregung mit Licht von 340 nm und 380 nm Wellenlänge aufgezeichneten Fluoreszenz dargestellt. Dieses F_{340}/F_{380} -Verhältnis wird vielfach mittels einer Kalibration auf eine $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{int}}$ umgerechnet (Grynkiewicz, Poenie, & Tsien, 1985). Die Kalibration erfolgt über das Maximum und Minimum des F_{340}/F_{380} -Verhältnis eines Zelltyps, die unter anderem mit Hilfe des Ionophors Ionomycin bestimmt werden. In dieser Arbeit wurde allerdings vorwiegend mit der gesamten CD8^+ T-Zellpopulation gearbeitet, die aus mehreren Subtypen und somit aus verschiedenen Zelltypen mit abweichenden F_{340}/F_{380} -Minima und Maxima besteht, wodurch durch eine Kalibration keine korrekten $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{int}}$ -Werte hätten kalibrieren können. Weiterhin bietet die Kalibration für die Fragestellung dieser Arbeit keinen nennenswerten Mehrwert, aber eine weitere Möglichkeit für eine Fehlerquelle.

Die mit TG als Stimulus für die Generierung von Ca^{2+} -Signalen durchgeführten Versuche wurden in zwei verschiedenen Applikationsprotokollen, dem kombinierten und dem Re-Additionsprotokoll, vermessen. Diese beiden Protokolle weisen unterschiedliche Stärken und Schwächen auf. Das Re-Additionsprotokoll bietet sich dadurch an, dass es den SOCE in die Aktivierung der STIMs durch die Entleerung der ER- Ca^{2+} -Speicher und den anschließend durch die dadurch aktivierten Orairs erfolgenden Ca^{2+} -Einstrom aufschlüsselt, weist allerdings

den Nachteil auf, dass die Zellen für einen langanhaltenden Zeitraum in einer unphysiologischen $0 \text{ mM } [\text{Ca}^{2+}]_{\text{ext}}$ verweilen. Das kombinierte Protokoll bietet keine Aufschlüsselung des SOCE in Speicherentleerung und Ca^{2+} -Einstrom, ist dafür allerdings physiologischer, da der Stimulus in Anwesenheit von $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ext}}$ appliziert wird. Hierdurch wird unter anderem eine präzisere Untersuchung des Ca^{2+} -Ausstroms im Anschluss an das Ca^{2+} -Signal ermöglicht. Die in Kapitel 5.2.4 aufgeführte Untersuchung des Ca^{2+} -Ausstroms beruht daher lediglich auf den Ergebnissen der kombinierten Protokolle.

Die erwähnten Reduktionen der Ca^{2+} -Signale wurden in dieser Arbeit sowohl für unstimulierte (Kapitel 5.2.1), als auch anti-CD3-/anti-CD28-antikörperstimulierte CD8^+ T-Zellen (Kapitel 5.2.2) nachgewiesen. Erstere wurden kurz nach der Entnahme aus der gesunden C57BL6/J-Maus verwendet und repräsentieren CD8^+ T-Zellen im Ruhezustand vor einer möglichen Infektion mit einem Virus oder der Mutation einer körpereigenen Zellen. Die im Zuge der Antikörperstimulation erfolgende Aktivierung des CD3-Rezeptors sowie des co-stimulatorischen CD28-Oberflächenproteins simuliert bei letzteren eine Virusinfektion respektive Krebserkrankung. Nach drei Tagen Stimulation repräsentieren sie somit aktivierte, für die Abwehr ihres spezifischen Krankheitserregers bereite CD8^+ T-Zellen. Vergleicht man die altersbedingte Reduktion der Ca^{2+} -Signale zwischen diesen beiden verschiedenen Aktivitätszuständen, fällt sie für die meisten Signalparameter bei den stimulierten CD8^+ T-Zellen marginal höher aus. So liegt beispielsweise die altersbedingte Reduktion der AUCs der Ca^{2+} -Signale bei den unstimulierten CD8^+ T-Zellen im kombinierten Protokoll bei 28,81 % (Abbildung 8) und im Re-Additionsprotokoll bei 29,64 % (Abbildung 9). Die Reduktionen dieses Parameters bei den stimulierten CD8^+ T-Zellen liegen für die erwähnten Protokolle bei 32,85 % (Abbildung 13) respektive 35,35 % (Abbildung 14).

Neben der altersbedingten Reduktion lässt sich zudem eine stimulationsbedingte Reduktion der Ca^{2+} -Signalhöhe feststellen. Die Ca^{2+} -Signalhöhe der stimulierten CD8^+ T-Zellen ist im Vergleich zu der der unstimulierten um 59,63 % bis 62,09 % reduziert. Diese Reduktion beruht wahrscheinlich auf der in Abbildung 24 dargestellten deutlichen, stimulationsbedingten Abnahme der mRNA-Expression für sämtliche untersuchten STIM- und Orai-Isoformen. Dies ist allem voran spannend, da Ca^{2+} -Signale von zentraler Bedeutung bei der Aktivierung und Differenzierung CD8^+ T-Zellen sind (Kim et al., 2014; Oh-Hora et al., 2008). Möglicherweise werden für die Initialisierung der Differenzierung naiver zu Effektor-T-Zellen höhere Ca^{2+} -Signale benötigt als für die Ausführung der Effektorfunktion der differenzierten CD8^+ T-Zellen. In einer Publikation der AG von Prof. Dr. Markus Hoth von 2018 wurde festgestellt, dass das Ca^{2+} -Optimum der zytotoxischen Funktion humaner CD8^+ T-Zellen tatsächlich in einem subphysiologischen Bereich der $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{ext}}$ zwischen $23 \text{ }\mu\text{M}$ und $625 \text{ }\mu\text{M}$ liegt und nur eine geringfügige Erhöhung der $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{int}}$ auf 122 nM bis 334 nM für eine optimale Zielzellyse ausreicht (X. Zhou et al., 2018). Die in Abbildung 24 dargestellte

stimulationsbedingte Reduktion aller STIM- und Orai-mRNA-Level steht im Gegensatz zu zwei unabhängig voneinander publizierten Beobachtungen stimulationsbedingter Erhöhungen von STIM1 und STIM2 in T-Zellen (Oh-Hora et al., 2008; Ritchie, Samakai, & Soboloff, 2012). Die von Oh-Hora et al. beschriebene, durch eine TZR-Aktivierung verursachte Erhöhung der STIM2-Proteinlevel bezieht sich allerdings lediglich auf CD4⁺ und nicht auf CD8⁺ T-Zellen und die von Ritchie et al. aufgeführte Erhöhung von STIM1 und STIM2 wurde lediglich an der immortalisierten T-Zellleukämiezelllinie Jurkat, welche ebenfalls einen CD4⁺-Hintergrund und keine CD8⁺-Expression aufweist, und nicht an primären T-Zellen nachgewiesen (Oh-Hora et al., 2008; Ritchie et al., 2012). Weiterhin beruhen die Erkenntnisse von Ritchie et al. auf einem Zeitraum von maximal sechs Stunden nach Stimulationsbeginn im Vergleich zu den in dieser Arbeit nach drei Tagen Stimulation erhobenen Daten (Ritchie et al., 2012). Demnach könnten die Differenzen zu den in dieser Arbeit aufgezeigten Ergebnissen auf einem prinzipiellen Unterschied zwischen CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen oder Unterschieden im Versuchsaufbau beruhen.

Um bereits kleine altersbedingte Veränderungen der Ca²⁺-Signale auflösen zu können, wurden die Versuche in einer Ringerlösung mit einer subphysiologischen Konzentration von 0,5 mM Ca²⁺ durchgeführt. Um zu überprüfen, ob die bei dieser niedrigen [Ca²⁺]_{ext} aufgetretenen altersbedingten Ca²⁺-Signalreduktionen auch noch bei einer physiologischeren extrazellulären Konzentration von 2 mM Ca²⁺ auftreten, wurden die Versuche mit 2 mM Ca²⁺-Ringerlösung wiederholt. Auch bei der höheren [Ca²⁺]_{ext} zeigen die unstimulierten CD8⁺ T-Zellen der alten Mäuse wie in Abbildung 11 und Abbildung 12 zu erkennen ist, eine deutliche Reduktion in ihren Ca²⁺-Signalparametern im Vergleich zu denen der jungen Mäuse. Gleiches gilt auch, wie in Abbildung 16 und Abbildung 17 zu erkennen ist, für die stimulierten CD8⁺ T-Zellen. Allerdings fallen diese Reduktionen im Vergleich zu den Ergebnissen mit 0,5 mM [Ca²⁺]_{ext} kleiner aus. Mit 0,5 mM Ca²⁺-Ringerlösung liegen beim Re-Additionsprotokoll beispielsweise die altersbedingten Reduktionen des Influx Peaks zu Signalbeginn bei den unstimulierten CD8⁺ T-Zellen bei 22,33 % (Abbildung 9) und bei den stimulierten bei 22,23 % (Abbildung 14). Mit 2 mM Ca²⁺-Ringerlösung verringert sich diese Reduktion bei den unstimulierten CD8⁺ T-Zellen auf 12,19 % (Abbildung 12) und bei den stimulierten auf 12,14 % (Abbildung 17). Der reduzierende Effekt des Alters auf Ca²⁺-Signale in CD8⁺ T-Zellen ist also bei physiologischerem im Vergleich zum geringeren elektrochemischen Gradienten für Ca²⁺ abgeschwächt, aber weiterhin vorhanden und in seiner Reduktion weitestgehend signifikant.

Da die in Kapitel 5.1.3 dargestellte Veränderung der Subtypenverteilung eine charakteristische Entwicklung bei T-Zellen im Alter ist, wurde für die stimulierten CD8⁺ T-Zellen überprüft, ob die altersbedingten Unterschiede in den Ca²⁺-Signalen möglicherweise anteilig auf die unterschiedlichen Distributionen von T_{EM} und T_{CM} zurückzuführen sind.

Hierfür wurden besagte Subtypen mit Hilfe eines FACS aus der Gesamtpopulation isoliert und anschließend Ca^{2+} -Imagingexperimente mit T_{EM} und T_{CM} durchgeführt. Die Ergebnisse zeigen in beiden Applikationsprotokollen eine signifikante Reduktion des Ca^{2+} -Influx Peaks zu Beginn des Signals, des endständigen Ca^{2+} -Plateaus sowie der AUC des gesamten Ca^{2+} -Signals. Dieser Unterschied fällt zwar wie in Abbildung 18 und Abbildung 19 zu erkennen ist in beiden Protokollen jeweils deutlicher für die T_{CM} als für die T_{EM} aus, doch da beide prädominierenden Subtypen eine substantielle altersbedingte Reduktion ihrer Ca^{2+} -Signalparameter aufweisen, erscheint die Subtypenverteilung keine grundlegende Ursache des Phänomens zu sein. Zudem weist die Gesamtpopulation der stimulierten CD8^+ T-Zellen aus alten Mäusen auch einen größeren Anteil der weniger stark in ihren Ca^{2+} -Signalen beeinträchtigten T_{EM} auf (Abbildung 7).

Da Ca^{2+} -Signale viele wichtige physiologische Prozesse in CD8^+ T-Zellen regulieren, könnte die altersbedingte Reduktion viele Konsequenzen mit sich führen. Beispielsweise bei der Regulation der Proliferation von Immun- sowie von Krebszellen sind Ca^{2+} -Signale von Bedeutung (Berridge, 1995; Hoth, 2016; Lu & Means, 1993; Shah et al., 1994). In T-Zellen wurde gezeigt, dass die TZR-vermittelte Expansion vom SOCE und von Calcineurin kontrolliert wird (Vaeth, Maus, et al., 2017). Dies erfolgt höchstwahrscheinlich über den Transkriptionsfaktor NFAT, für dessen Aktivierung ein Ca^{2+} -Einstrom und die Aktivierung von Calcineurin vorausgehen müssen (Matsuda & Koyasu, 2000). NFAT reguliert unter anderem die Expression des von T-Zellen für die Proliferation auto- und parakrin sezernierten IL-2 (Sommerer, Meuer, Zeier, & Giese, 2012). Geringere Ca^{2+} -Signale könnten somit zu einer schwächeren Aktivität von NFAT beitragen, darüber die sezernierte Menge IL-2 reduzieren und somit zu der in Abbildung 6I dargestellten geringeren Zellzahlzunahme nach drei Tagen Stimulation beitragen. Für diese Ergebnisse wurden allerdings lediglich die Zellzahlen verglichen. Ein weiterer Faktor der, der Proliferation entgegengesetzt, die Zellzahlen maßgeblich mitbestimmt, ist ihre Sterberate. Eine schlechtere *in vitro*-Zellviabilität der isolierten CD8^+ T-Zellen alter Mäuse könnte somit ebenfalls eine Erklärung für die reduzierte Zellzahlzunahme nach Stimulation liefern. Demnach wäre diesbezüglich die Durchführung von Proliferationsassays, beispielsweise mittels des fluoreszierenden Zellfarbstoffs Carboxyfluoresceinsuccinimidylester (CFSE), für eine definitivere Aussage nötig. Eine verminderte Proliferation muriner und humaner CD4^+ und CD8^+ T-Zellen alter Individuen wurde allerdings auch schon in anderen Publikationen beschrieben (Decman et al., 2010; Grossmann et al., 1991; Jiang et al., 2007; Nikolich-Žugich, 2014; Nikolich-Žugich et al., 2012). Ob dieses Phänomen allerdings auf die altersbedingt verminderten Ca^{2+} -Signale zurückzuführen ist bleibt fraglich, da für die Proliferation von T-Zellen wie auch für die zytotoxische Funktion von CD8^+ T-Zellen herausgefunden wurde, dass schon relativ niedrige Ca^{2+} -Signale genügen (Schwarz et al., 2007; X. Zhou et al., 2018).

Der programmierte Zelltod von T-Zellen ist ein wichtiger Bestandteil der Terminierung einer Immunantwort und dient der Kontrolle der Größen der verschiedenen T-Zellsubpopulationen (Zhan, Carrington, Zhang, Heinzl, & Lew, 2017). Am Ende einer Immunantwort kommt es zu einer Kontraktion der nicht weiter benötigten aktivierten CD8⁺ Effektor-T-Zellpopulation, von der nur ein kleiner Teil der Zellen der Apoptose entgeht, welcher anschließend zu Gedächtnis-T-Zellen differenziert, die bei einer Reinfektion schneller auf ihre spezifischen Antigene reagieren können als naive T-Zellen (Dunkle & He, 2011). Das Apoptoseverhalten von T-Zellen im Alter ist ein kontrovers diskutiertes Thema. Es existieren sowohl Publikationen die eine altersbedingte Zunahme der T-Zellapoptose verzeichnen als auch Publikationen die das Gegenteil oder keinen Effekt zeigen (Chrest, Buchholz, Kim, Kwon, & Nordin, 1995; Gupta, 2005; Sikora, 2015; Spaulding, Walford, & Effros, 1997; Zhou, Edwards, & Mountz, 1995). Neben der Proliferation ist auch die Apoptose ein durch Ca²⁺ regulierter Prozess (Berridge et al., 1998; Orrenius, Zhivotovsky, & Nicotera, 2003; Qu, Al-Ansary, Kummerow, Hoth, & Schwarz, 2011; Verkhatsky, 2007). Hierbei folgt die Apoptose auf hohe Ca²⁺-Signale und ein daran anschließendes Befüllen der Ca²⁺ puffernden Mitochondrien (Distelhorst & Bootman, 2011; Rasola & Bernardi, 2011). In T-Zellen wurde entdeckt, dass ein Gen-Knockout von Orai1 die Zellen vor Apoptose durch den aktivierungsinduzierten Zelltod nach Dauerstimulation mit aktivierendem anti-CD3- und anti-CD28-Antikörpern schützt (Kim et al., 2011). Kombiniert man dies mit den in Kapitel 5.2 beschriebenen altersbedingten Reduktionen der Ca²⁺-Signale von CD8⁺ T-Zellen, lässt sich spekulieren, dass die CD8⁺ T-Zellen alter Individuen hierdurch vor Apoptose geschützt werden könnten. Um genauere Aussagen zur Apoptose in CD8⁺ T-Zellen alter Mäuse treffen zu können, müssten nachfolgend Apoptoseassays, beispielsweise über fluorophorgekoppeltes Annexin V oder Messungen der Caspaseaktivität, durchgeführt werden.

Angelehnt an Proliferation und Apoptose ist die altersbedingte Reduktion der Ca²⁺-Signale auch interessant für die Autophagie. Bei der Autophagie handelt es sich um einen zellulären Prozess, im Zuge dessen es zum lysosomalen Abbau und Recycling beschädigter, überschüssiger oder ungewollter zellulärer Bestandteile kommt (Moulis & Vindis, 2018; Tsukada & Ohsumi, 1993). Hierunter fallen Proteine, Fette und sogar ganze Zellorganellen, wie Mitochondrien oder Peroxisome (Bootman, Chehab, Bultynck, Parys, & Rietdorf, 2018; Klionsky, 2007). Die Autophagie ist eine, das Überleben der Zelle begünstigende Funktion, die der Zelle hilft mit Zellschäden und -stress umzugehen und in Hungerperioden die Energiebilanz der Zelle aufrechterhält und somit anabole Abläufe weiterhin ermöglicht (Bootman et al., 2018; Lum et al., 2005). Von bedeutender Wichtigkeit für das Immunsystem ist die Autophagie auch beim Abbau intrazellulärer Viren, Bakterien und Fremdproteine, welche anschließend in Form kurzer Polypeptide auf MHC-1 und MHC-2 präsentiert werden

(Münz, 2016). Im Alter nimmt die autophagische Funktion zellübergreifend ab, was vermutlich zur allgemeinen Akkumulation beschädigter Makromoleküle und Organellen beiträgt (Barbosa, Grosso, & Fader, 2018). Auch CD8⁺ T-Zellen weisen eine altersbedingt abgeschwächte Autophagie auf, was vermutlich zur Ansammlung von DNA-Schäden führt und einen negativen Einfluss auf den Energiehaushalt der Zellen haben könnte (Cuervo & Macian, 2014; Phadwal et al., 2012). Ebenso sind DCs im Alter von einer defizienten Autophagie betroffen, wodurch sie in ihrer zentralen Funktion, dem Präsentieren von Antigenen, beeinträchtigt werden und dadurch CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen nicht mehr effizient aktivieren können (Cannizzo et al., 2012; Cuervo & Macian, 2014). Wie genau Ca²⁺-Signale zur Steuerung der Autophagie beitragen wird kontrovers diskutiert. Ein aktivierender Effekt von Ca²⁺ auf den Autophagieprozess wurde beispielsweise im Zusammenhang mit der Ca²⁺-/Calmodulinabhängigen Proteinkinase 2 (CAMKK2) beschrieben, die Ca²⁺-abhängig die adenosinmonophosphataktivierte Kinase (AMPK) aktiviert. Dies führt wiederum durch eine Inhibition des mechanistic Target of Rapamycin complex 1 (mTORC1) zu Autophagie (Ghislat, Patron, Rizzuto, & Knecht, 2012; Hawley et al., 2005; Høyer-Hansen et al., 2007). Ein weiteres Indiz, dass Ca²⁺-Signale ein wichtiger Bestandteil von Autophagieprozessen sind, ergibt sich aus Versuchen mit dem Ca²⁺-Chelator BAPTA, dessen zytosolische Applikation zu einer Inhibition der Autophagie führt (Decuypere et al., 2013; Gao, Ding, Stolz, & Yin, 2008; Luyten et al., 2017). Die in dieser Arbeit dargestellten altersbedingten Reduktionen der Ca²⁺-Signale in CD8⁺ T-Zellen könnten also auch zu der im Alter abgeschwächten Autophagie beisteuern. Hieraus ließe sich ein Folgeprojekt entwickeln in dem man den Zusammenhang zwischen dem in T-Zellen gut etablierten STIM-Orai-vermittelten Ca²⁺-Einstrom und der Aktivität autophagischer Prozesse im Alter untersucht.

Um zu untersuchen, ob die altersbedingte Reduktion der Ca²⁺-Signale auf eine Veränderung der Expression oder der Stöchiometrie der am Haupteintrittsweg von Ca²⁺ in T-Zellen beteiligten Proteine zurückzuführen ist, wurden qRT-PCRs und Western Blots für STIMs und Orais durchgeführt (Kapitel 5.2.6). Auch der Hauptaustrittsweg von Ca²⁺ aus T-Zellen über PMCAs wurde mittels qRT-PCRs der mRNAs der ubiquitär vertretenen PMCA1 und PMCA4 abgedeckt (Kapitel 5.2.4). Da das Altern mit einer generellen Verschlechterung zellulärer Prozesse assoziiert wird, war die erste Hypothese eine allgemeine Reduktion der Expressionslevels aller Schlüsselproteine der Ca²⁺-Homöostase (Taylor & Dillin, 2011; Toyama & Hetzer, 2013). Allerdings zeigen die in Abbildung 21 und Abbildung 23 dargestellten Ergebnisse ein komplexeres Bild. So kommt es bei den mRNA-Levels der PMCA4 bei den unstimulierten sowie den stimulierten CD8⁺ T-Zellen zu einer deutlichen, altersbedingten Steigerung der Expression (Abbildung 21). Auch bei den Orais und STIMs liegt keine einheitliche Reduktion der mRNA- und Proteinexpression aller Isoformen vor (Abbildung 23). So zeigen beispielsweise sowohl unstimulierte als auch stimulierte CD8⁺ T-

Zellen keinen altersbedingten Unterschied in den mRNA-Levels von Orai3 (Abbildung 23A, C). Auf mRNA-Ebene kommt es allerdings stimulationsunabhängig zu altersbedingten Reduktionen für Orai2 und STIM1 sowie einer Reduktion von Orai1 bei den unstimulierten und von STIM2 bei den stimulierten CD8⁺ T-Zellen (Abbildung 23A, C). Auf Proteinebene konnte durch Western Blots die altersbedingte Reduktion von STIM1 für beide untersuchten Aktivierungszustände nachgewiesen werden (Abbildung 23B, D). Auch die Reduktion der STIM2-mRNA bei den stimulierten CD8⁺ T-Zellen alter Mäuse deckt sich mit einer signifikanten Reduktion auf Proteinebene. Die altersbedingte Reduktion der Orai1-mRNA-Levels bei den unstimulierten CD8⁺ T-Zellen ließ sich auf Proteinebene nicht nachweisen. Hier ist Orai1 in den Zellen alter Mäuse sogar tendenziell erhöht (Abbildung 23B). Zudem kommt es bei den unstimulierten CD8⁺ T-Zellen zu einer deutlichen altersbedingten Reduktion der STIM2-Proteinlevels, die auf mRNA-Ebene nicht vorliegt (Abbildung 23B). Als Ursache für die Diskrepanzen zwischen den Ergebnissen der qRT-PCRs und der Western Blots kommen mehrere Möglichkeiten in Frage. Beispielsweise unterscheiden sich Proteine in ihren Halbwertszeiten und der Rate ihrer Neusynthese, sie haben also verschiedene Umschlaggeschwindigkeiten (Hinkson & Elias, 2011). Demnach könnten bei den unstimulierten CD8⁺ T-Zellen alter Mäuse eine gesteigerte Halbwertszeit der Orai1- und eine verminderte der STIM2-Proteine vorliegen. Eine potenzielle Ursache hierfür könnten altersbedingt veränderte posttranslationale Modifikationen, wie eine gesteigerte oder verminderte Ubiquitylierung der Proteine sein. In Neuronen wurde beispielsweise für die Distribution von STIM1 in der Zelle eine direkte Abhängigkeit von der Aktivität des Ubiquitin-Proteasom-Systems nachgewiesen (Keil, Shen, Briggs, & Patrick, 2010).

Die bei qRT-PCR und Western Blot konstanten altersbedingten Reduktionen der STIM1- und STIM2-mRNA- und Proteinexpression sowie die Erhöhung der mRNA-Levels von PMCA4 liefern eine potenzielle Ursache für die Reduktionen der Ca²⁺-Signale in unstimulierten und stimulierten CD8⁺ T-Zellen alter Mäuse. Dass Reduktionen von STIM1 einen verminderten SOCE verursachen, ist ein gut etablierter wissenschaftlicher Konsens (Jousset, Frieden, & Demaurex, 2007; Liou et al., 2005; Roos et al., 2005). In CD4⁺ T-Zellen mit STIM1-Knockout wurde zudem eine verminderte IL-2-Produktion festgestellt (Oh-Hora et al., 2008). Möglicherweise trägt die altersbedingte Reduktion der STIM1-Proteinexpression über die dadurch verursachten Ca²⁺-Signalreduktionen zu der im Alter beobachteten verminderten NFAT-Aktivität und IL-2-Expression in T-Zellen bei (Beattie et al., 1990; Pahlavani, Harris, & Richardson, 1995; Whisler, Beiqing, & Chen, 1996). STIM2 verfügt über zwei funktionell verschiedene Spleißvarianten, STIM2.1 und STIM2.2, von denen eine Reduktion der Ersteren wegen ihrer SOCE-inhibierenden Funktion zu höheren Ca²⁺-Signalen führt (Miederer et al., 2015; Rana et al., 2015). Eine Reduktion der in den meisten Zelltypen in größerer Abundanz exprimierten letzteren Spleißvariante führt hingegen zu einer Reduktion

des SOCE (Miederer et al., 2015; Rana et al., 2015). Eine initiale Überprüfung des STIM2.2 zu STIM2.1 Verhältnisses auf mRNA-Ebene für die in dieser Arbeit verwendeten CD8⁺ T-Zellen junger und alter Mäuse ergab, dass der STIM2.1-Anteil für beide Altersgruppen um ein etwa 25-faches niedriger ist als der STIM2.2-Anteil. Weiterhin wiesen die CD8⁺ T-Zellen der jungen Mäuse, obwohl sie höhere Ca²⁺-Signale als die der alten Mäuse aufzeigen, geringfügig höhere STIM2.1-mRNA-Levels auf. Deshalb lässt sich die Beteiligung von STIM2.1 auf die altersbedingt reduzierten Ca²⁺-Signale weitestgehend vernachlässigen und wurde in dieser Arbeit nicht weiter untersucht. Die Reduktion der STIM2-mRNA- und -Proteinlevels deckt sich somit ebenfalls mit den altersbedingten Reduktionen der Ca²⁺-Signale. Für stimulierte CD4⁺ T-Zellen mit STIM2-Knockout wurde ebenfalls eine verminderte IL-2-Produktion festgestellt und publiziert (Oh-Hora et al., 2008). Somit könnten die altersbedingt reduzierten STIM2-Levels ebenfalls zu der im Alter beobachteten verminderten IL-2-Expression in T-Zellen beitragen (Beattie et al., 1990; Pahlavani et al., 1995; Whisler et al., 1996). Auch die altersbedingt gesteigerten PMCA4-mRNA-Levels (Abbildung 21) und die damit assoziierte Steigerung der Geschwindigkeitskonstante des Ca²⁺-Ausstroms (Abbildung 20) werden wahrscheinlich zu den reduzierten Ca²⁺-Signalen CD8⁺ T-Zellen alter Mäuse beitragen. Überexpressionen der PMCA4 haben beispielsweise in CHO-Zellen die Ca²⁺-Signalhöhe nach einer, an eine passive ER-Ca²⁺-Speicherentleerung mittels EGTA anschließenden Ca²⁺-Re-Addition signifikant reduziert (Brini, 2000). Weiterhin konnten Brini et al. feststellen, dass die PMCA4-Überexpression zu einer Reduktion der [Ca²⁺]_{ER} führt, was die Zellen vermutlich in einem gewissen Maße vor Apoptose schützt (Brini, 2000). Die altersbedingt gesteigerten PMCA4-mRNA-Levels könnten also auch ein Indiz für eine zelluläre Schutzmaßnahme vor Apoptose darstellen. Da für die PMCA4 lediglich qRT-PCRs für die Erfassung der mRNA-Levels durchgeführt wurden, wäre es ratsam Western Blots für die Proteinlevels dieser PMCA-Isoform zur weiteren Absicherung der Ergebnisse nachfolgen zu lassen. Die Bewertung der altersbedingten Reduktionen der Orai2-mRNA-Levels in Bezug auf die reduzierten Ca²⁺-Signale gestaltet sich etwas schwieriger. Für Reduktionen der Orai2-mRNA-Levels wurden in verschiedenen Zelltypen unterschiedliche Effekte auf Ca²⁺-Signale berichtet. In der Promyelozytenzelllinie HL60 wurde gezeigt, dass ein Knockdown von Orai2 zu einer Reduktion des SOCE führt, was zu den reduzierten Ca²⁺-Signalen der CD8⁺ T-Zellen alter Mäuse passen würde (Diez-Bello, Jardin, Salido, & Rosado, 2017). Dem entgegenstehend wurde allerdings für Fibroblasten, Chondrozyten und die T-Zellleukämiezelllinie Jurkat ein steigender Effekt eines Orai2-Knockdowns auf Ca²⁺-Signale berichtet (Alansary, Bogeski, & Niemeyer, 2015; Inayama et al., 2015; Vaeth, Yang, et al., 2017). Die Herleitung für diesen Ca²⁺-Signale erhöhenden Effekt beruht darauf, dass weniger Orai2- und dadurch mehr Orai1-Proteine in die heteromer zusammengesetzten Orai-Kanäle inkorporiert werden, wodurch ein stärkerer Ca²⁺-Einstrom in die jeweiligen Zellen gewährleistet wird (Vaeth, Yang, et al., 2017). Möglicherweise sind allerdings schon die

reduzierten STIM1- und STIM2-Levels ein limitierender Faktor für die Aktivierung der Orai-Kanäle, wodurch deren Komposition weniger Bedeutung hätte. Eine weitere Theorie wäre, dass die Reduktion der mRNA-Levels von Orai2 eine Anpassung an die Ca^{2+} -Signalreduktionen durch die altersbedingt verringerten STIM- und gesteigerten PMCA4-Expressionen darstellt, damit die Zellen weiterhin befähigt sind Calcineurin-abhängig NFAT zu aktivieren, IL-2 zu exprimieren und zu proliferieren.

Da der STIM-Orai-vermittelte Ca^{2+} -Einstrom den zentralen Eintritts- und der PMCA4-vermittelte Ca^{2+} -Ausstrom den prominentesten Austrittsweg von Ca^{2+} in respektive aus T-Zellen darstellt, sind die aufgezeigten altersbedingten Rückgänge der Expressionslevels von STIM1, STIM2 und die Erhöhung der PMCA4-Levels als eine der Ursachen für die deutlichen Reduktionen der Ca^{2+} -Signale sowohl bei den unstimulierten als auch bei den stimulierten CD8^+ T-Zellen anzusehen. Da Ca^{2+} -Signale zahlreiche Funktionen der CD8^+ T-Zellen regulieren wäre es durchaus wahrscheinlich, dass diese im Alter durch Veränderungen der STIM/Orai-Stöchiometrie und der PMCA-Expression beeinträchtigten Ca^{2+} -Signale zu den Immunoseneszenzerscheinungen dieses Zelltyps beitragen. Da der STIM-Orai-vermittelte Ca^{2+} -Einstrom allerdings komplex durch weitere membranständige, ER-ständige oder mitochondriale Kanäle, Ionentauscher und Pumpen sowie durch diverse Interaktionspartner der Orais und STIMs und Veränderungen des elektrochemischen Gradienten für Ca^{2+} reguliert wird, ist nicht auszuschließen, dass weitere Defekte in diesen Regulationsmechanismen vorliegen können, die sich ebenfalls reduzierend oder, wie eine verminderte Orai2-Expression, erhöhend auf die Ca^{2+} -Signale auswirken.

6.3. Altersbedingte Steigerung der Zytotoxizitätskinetik CD8^+ T-Zellen

Die Funktionalität des Immunsystems nimmt im Alter merklich ab (Fulop et al., 2017; Hodes, 1997; Roberts-Thomson et al., 1974). Hiervon sind auch CD8^+ T-Zellen betroffen (Nikolich-Žugich, 2014; Nikolich-Žugich et al., 2012). Die Hauptfunktion dieses Zelltyps besteht in der Abtötung virusinfizierter oder entarteter Zellen (Contor & Boyse, 1975; Kisielow et al., 1975; Shiku et al., 1975). Da die Publikationen zur Veränderung der zytotoxischen Funktion von CD8^+ T-Zellen im Alter je nach Versuchsaufbau zu unterschiedlichen Ergebnissen kommen und es an Untersuchungen der Zytotoxizitätskinetik mangelt, wurden kinetische Zytotoxizitätsassays mit unstimulierten und stimulierten CD8^+ T-Zellen junger und alter Mäuse durchgeführt (Brien et al., 2009; Messaoudi et al., 2004; Saxena & Adler, 1999; Smithey et al., 2011). Weiterhin wurden qRT-PCRs durchgeführt, um altersbedingte Unterschiede in den Expressionslevels für die zytotoxische Funktion wichtiger Proteine zu erfassen.

Die kinetischen Echtzeitzytotoxizitätsassays mit unstimulierten CD8⁺ T-Zellen beider Altersgruppen als Effektor- und P815-Zellen als Zielzellen zeigen nur sehr geringe CD8⁺ T-zellvermittelte Zielzellyse (Abbildung 25). Hierbei kommt es bei den CD8⁺ T-Zellen alter Mäuse zu einer maximalen Zielzellyse, die mit 12,77 % zwar generell niedrig ausfällt, aber immer noch doppelt so hoch ist wie die der jungen Mäuse mit 6,10 %. Demnach weisen die murinen CD8⁺ T-Zellen ohne vorausgegangene Stimulation kaum zytotoxische Funktion auf. Die Unterschiede zwischen den beiden Altersgruppen könnten auf den altersbedingt höheren T_{CM}⁺ und T_{EM}⁺-Anteilen in der CD8⁺ T-Zellsubtypenverteilung beruhen (Abbildung 7).

Vergleicht man die Ergebnisse der Zytotoxizitätsassays der unstimulierten CD8⁺ T-Zellen (Abbildung 25) mit denen der stimulierten (Abbildung 26), fällt eine deutliche stimulationsbedingte Zunahme der zytotoxischen Funktion gegen P815-Zielzellen auf. Die Stimulation mittels anti-CD3-/anti-CD28-antikörpergekoppelter Beads vermittelt eine TZR-Aktivierung, die eine Differenzierung der naiven CD8⁺ T-Zellen zu T_{EM}⁺-Zellen (Abbildung 7) und eine Expansion der aktivierten CD8⁺ T-Zellen auslöst (Abbildung 6I). Die hieraus hervorgehenden CD8⁺ Effektor-T-Zellen weisen gegen P815-, EL-4-, E.G7- und, zumindest die CD8⁺ T-Zellen der alten Mäuse, auch gegen YAC-1-Zielzellen eine prominente Zytotoxizität auf (Abbildung 26). Hierbei fällt allem voran die gegen alle Zielzellen deutlich gesteigerte Kinetik der CD8⁺ T-Zellen alter Mäuse auf. Innerhalb der ersten beiden Stunden des Assays fällt die Zielzellyse der Zellen der alten Mäuse zu jedem gemessenen Zeitpunkt bei jeder untersuchten Zielzelllinie höher aus als die der jungen Mäuse (Abbildung 26). Dabei ist der erwähnte altersbedingte Unterschied nach 60 min jeweils signifikant (Abbildung 26). Die Ergebnisse der Endpunktyse nach 240 min sind je nach Zielzelltyp diverser. Die CD8⁺ T-Zellen der jungen Mäuse zeigen eine signifikant höhere Endpunktyse bei den P815-, eine tendenziell höhere bei den EL-4-, keinen Unterschied bei den E.G7- und eine signifikant niedrigere bei den YAC-1-Zellen (Abbildung 26). Hieraus ergibt sich eine Problematik bei der Untersuchung der Funktionalität der CD8⁺ T-Zellen im Alter. Schon die Beschaffenheiten der verwendeten Zielzellen verursachen Unterschiede im Versuchsausgang. Dies könnte auch die Ursache für die verschiedenen Aussagen wissenschaftlicher Publikationen zur Zytotoxizität CD8⁺ T-Zellen im Alter sein (Brien et al., 2009; Messaoudi et al., 2004; Saxena & Adler, 1999; Smithey et al., 2011). Hierbei berichten die Publikationen aus der AG von Prof. Dr. Janko Nikolich-Žugich einen altersbedingten Rückgang der zytotoxischen Funktion von CD8⁺ T-Zellen bei Mäusen, die mit dem Herpes-simplex-Virus 1 (Messaoudi et al., 2004), West-Nil-Virus (Brien et al., 2009) respektive dem Bakterium *Listeria monocytogenes* (Smithey et al., 2011) infiziert wurden. Allerdings ist es schwierig eine allgemeingültige Aussage zum Effekt des Alterns auf die Zytotoxizität von CD8⁺ T-Zellen mittels eines spezifischen Krankheitsmodells zu treffen. Beispielsweise ist die schwächere Aktivierung von T-Zellen durch professionelle antigenpräsentierende Zellen, wie DCs, im Alter gut etabliert

(Plowden et al., 2004). Daher wird die Funktionalität der CD8⁺ T-Zellen vermutlich schon durch eine abgeschwächte TZR-Aktivierung beeinträchtigt. Weiterhin wurde in den aufgeführten Publikationen ein Zytotoxizitätsassay, der auf der Freisetzung von radioaktivem ⁵¹Chrom beruht, gewählt. Hierbei handelt es sich um einen Assay, der lediglich den Endpunkt, aber nicht den Verlauf der Zielzellyse untersucht, wodurch kinetische Unterschiede, wie sie in dieser Arbeit aufgezeigt wurden, nicht analysierbar sind. Einen grundlegenden Vorteil des kinetischen Echtzeitzytotoxizitätsassays zeigen die Ergebnisse der stimulierten CD8⁺ T-Zellen gegen P815-Zellen. Hätte man den Endpunkt des Assays nach zwei Stunden festgelegt würde man eine altersbedingte Steigerung der Zytotoxizität verzeichnen, wohingegen eine Assaydauer von vier Stunden eine signifikante altersbedingte Reduktion der Zytotoxizität zum Endpunkt aufzeigt (Abbildung 26). In Anbetracht der in dieser Arbeit demonstrierten schnelleren Zytotoxizitätskinetik der CD8⁺ T-Zellen alter Mäuse lässt sich vermutlich auch erklären, warum Saxena und Adler 1999, den Publikationen der Arbeitsgruppe Prof. Dr. Janko Nikolich-Žugichs entgegengesetzt, eine gesteigerte zytolytische Aktivität bei aus alten Mäusen gewonnenen, mitogen- und damit unspezifisch stimulierten Splenozyten in ⁵¹Chromfreisetzungsassays verzeichnen konnten (Saxena & Adler, 1999). Wären die in dieser Publikation durchgeführten Zytotoxizitätsassays nicht nach vier, sondern nach fünf oder sechs Stunden gestoppt und die ⁵¹Chromfreisetzung analysiert worden, scheint es vor dem Hintergrund der in Abbildung 26 dargestellten Versuche durchaus möglich, dass es wie bei den letzten Zeitpunkten mit P815- und EL4-Zielzellen zu einer höheren Zytotoxizität bei den Zellen der jungen Mäuse kommt. Die einzige Zielzelllinie, gegen die die CD8⁺ T-Zellen der alten Mäuse nach den maximalen 240 min eine deutlich höhere Zytolyse aufweisen als die der jungen Mäuse, sind die YAC-1-Zellen (Abbildung 26J). Hierbei handelt es sich um eine Zielzelllinie, die zur Untersuchung der zytotoxischen Funktion von NK-Zellen verwendet wird und, wie man es bei den CD8⁺ T-Zellen der jungen Mäuse erkennen kann, üblicherweise nicht hinreichend T-zellvermittelt getötet wird (Li et al., 2019). Der vergleichsweise hohen Endpunktyse gegen die YAC-1-Zellen von 60,77 % durch die CD8⁺ T-Zellen der alten Mäuse könnte eine altersbedingte Zunahme an CD8⁺ NK-T-Zellen in der Gesamtpopulation der isolierten CD8⁺ Zellen zugrunde liegen. Im Zuge der Immunoseneszenz kommt es zu einer Anhäufung dieser CD8⁺ T-Zellen, die für NK-Zellen typische Oberflächenmoleküle exprimieren und in der Lage sind die NK-sensitiven YAC-1-Zielzellen effektiv zu lysieren (Lemster et al., 2008; Li et al., 2019; Y. Liu et al., 2009; Vallejo et al., 2011). Um den Einfluss von CD8⁺ NK-T-Zellen auf die gesteigerte Zytotoxizitätskinetik zu untersuchen, wäre es interessant, diesen T-Zellsubtyp mittels FACS-Technik zu isolieren und in kinetischen Zytotoxizitätsassays mit der Zytotoxizität der NK-T-zellnegativen CD8⁺ T-Zellpopulation gegen YAC-1 und die weiteren in Abbildung 26 verwendeten Zielzelllinien zu vergleichen.

Die Ergebnisse der Zytotoxizitätsassays mit über einen Zeitraum von zehn Tagen stimulierten CD8⁺ T-Zellen in Abbildung 27 zeigen eine schrittweise Relativierung der in Abbildung 26 aufgezeigten altersbedingten Steigerung der Zytotoxizitätskinetik. Die Ursache hierfür könnte die für die Differenzierung zu funktionalen Effektor-T-Zellen benötigte Dauer sein. Möglicherweise benötigen die CD8⁺ T-Zellen junger Mäuse im Vergleich zu denen der älteren Mäuse ein längeres Zeitintervall, um die Expression von Effektorproteinen, wie Perforin oder den Granzymen, hochzuregulieren.

Die beiden Hauptmechanismen der zytotoxischen Funktion von CD8⁺ T-Zellen sind die Exozytose lytischer Granula sowie das Aktivieren auf der Membran der Zielzelle befindlicher Todesrezeptoren (Chávez-Galán et al., 2009). Bei ersterem werden an der IS von CD8⁺ T-Zellen Perforin und Granzyme sezerniert, die die Zielzelle entweder über Apoptose oder Nekrose töten (Abbildung 2) (de Saint Basile et al., 2010; Trapani & Smyth, 2002). Neben den Tumornekrosefaktorrezeptoren stellt der FasR den prominentesten Vertreter der todesrezeptorvermittelten Zytotoxizität von CD8⁺ T-Zellen dar (Andersen et al., 2006). Wird er nach der Erkennung als Zielzelle mittels, von der CD8⁺ T-Zelle an der Oberfläche präsentem, FasL aktiviert, wird wie auch durch die Granzyme, die Apoptose der Zielzelle über die Aktivierung von Caspasen eingeleitet (Abbildung 2) (Varfolomeev et al., 1998). Bei den in Abbildung 28 dargestellten Ergebnissen der mRNA- und Proteinexpressionslevels von FasL, Perforin, Granzym A und B fällt allem voran der bemerkenswerte Unterschied zwischen den mRNA-Levels stimulierter CD8⁺ T-Zellen junger und alter Mäuse auf. Mit einer altersbedingten Steigerung um immer noch nahezu 100 % weisen die FasL-mRNA-Levels die geringste Zunahme auf. Die Granzym B-mRNA-Levels sind altersbedingt um fast 400 %, die von Perforin um über 1500 % und die von Granzyme A um fast 2500 % gesteigert (Abbildung 28B). Dieser drastische Unterschied zwischen den stimulierten CD8⁺ T-Zellen junger und alter Mäuse konnte auf Proteinebene mittels Western Blots verifiziert werden (Abbildung 28C). Bislang wurde lediglich in einer Studie zum Effekt des Alterns auf unstimulierte CD8⁺ T-Zellen aus Rindern eine Steigerung des Anteils an perforinexprimierenden CD8⁺ T-Zellen in älteren Rindern verzeichnet (Hogg et al., 2011). Hierfür wurde allerdings nur der prozentuale Anteil an der Gesamtpopulation und nicht die jeweiligen Perforin-mRNA- oder -proteinlevels der Zellen erfasst. Bei unstimulierten humanen CD8⁺ T-Zellen wurde dem entgegengesetzt eine Abnahme des perforinexprimierenden Anteils an CD8⁺ T-Zellen im Alter berichtet (Rukavina et al., 1998). Allerdings wurde auch in dieser Studie leider keine Quantifizierung der mRNA- oder Proteinlevels von Perforin durchgeführt. Die in dieser Arbeit erstmals aufgezeigte, altersbedingt signifikant gesteigerte Expression des FasL, von Perforin und den Granzymen A und B könnte einen Anpassungsmechanismus an die im Alter abgeschwächte TZR-Stimulation durch professionelle antigenpräsentierende Zellen, die verminderte Proliferation

oder eine andere Immunoseneszenzerscheinung, um das Immunsystem weitestgehend Abwehrbereit zu halten, darstellen (Grossmann et al., 1991; Jiang et al., 2007; Moretto, Lawlor, & Khan, 2008; Nikolich-Zugich et al., 2012). Hieran anschließend wäre es interessant zu charakterisieren, ob die CD8⁺ T-Zellen aus alten Mäusen über eine stärkere Befüllung bei gleicher Anzahl der lytischen Granula, eine vergleichbare Befüllung bei höherer Anzahl aufweisen oder gleich beide Parameter altersbedingt gesteigert sind. Hierfür könnte man beispielsweise Perforin oder ein Granzym mit einem Fluoreszenzfarbstoff markieren und mittels interner Totalreflexionsfluoreszenzmikroskopie die Anzahl der lytischen Granula zwischen junger und alter Kohorte abgleichen (Ming, Schirra, Becherer, Stevens, & Rettig, 2015).

Wie auch schon für die altersbedingte Reduktion der Ca²⁺-Signale wurde untersucht, welchen Einfluss die zwischen jungen und alten Mäusen verschiedenen CD8⁺ T-Zellsubtypenverteilungen (Abbildung 7) auf die altersbedingt gesteigerte Zytotoxizitätskinetik haben. Da T_{EM} generell eine stärkere zytotoxische Funktion zugeschrieben wird als T_{CM} wäre es durchaus denkbar, dass die beobachtete schnellere Kinetik auf dem altersbedingt gesteigerten T_{EM}-Anteil an der Gesamtpopulation beruht (Sallusto et al., 1999). Diese Hypothese wird allerdings von den in Abbildung 29 dargestellten Ergebnissen weitestgehend entkräftet. Sowohl bei den T_{CM} als auch bei den T_{EM} der alten Mäuse liegt eine schnellere Zytotoxizitätskinetik vor als bei dem jeweiligen Pendant der jungen Mäuse. Weiterhin weisen die generell eine schwächere zytotoxische Funktion aufweisenden T_{CM} der alten Mäuse eine immer noch marginal schnellere Kinetik auf als die generell über eine stärkere zytotoxische Funktion verfügenden T_{EM} der jungen Mäuse (Sallusto et al., 1999). Die CD8⁺ T-Zellen der alten Mäuse reagieren somit subtypenunabhängig schneller als die der jungen Mäuse. Vorstellbar wäre allerdings, dass die signifikante altersbedingte Steigerung des T_{EM}-Anteils um 658,15 % die schnellere Kinetik unterstützt, da die T_{EM} altersunabhängig eine stärkere Zytotoxizität aufweisen als die T_{CM}.

Um den Anteil des auf der Sekretion lytischer Granula basierten Zytotoxizitätsmechanismus an der gesamten Zielzellyse zu überprüfen, wurden Echtzeitzytotoxizitätsassays mit CMA-behandelten CD8⁺ T-Zellen beider Altersgruppen durchgeführt. Dieser spezifische Inhibitor vakuolärer H⁺-ATPasen hemmt den Transport von H⁺-Ionen unter anderem an der Membran lytischer Granula und verursacht so einen Anstieg des pH-Werts in diesen Vesikeln (Kataoka et al., 1996). Hierdurch kommt es zu einer Konformationsänderung der enthaltenen zytotoxischen Proteine, Perforin und den Granzymen, die deren Funktionalität aufhebt (Kataoka et al., 1996). Aus den Ergebnissen geht ein deutlicher altersbedingter Unterschied des Effekts der CMA-Behandlung auf die Zytotoxizität der CD8⁺ T-Zellen hervor (Abbildung 31). Schon ab einer Konzentration von 5 nM CMA kommt es bei den Zellen der jungen Maus zu einem Ausbleiben der zytolytischen Funktion gegen P815 Zellen. Bei den CD8⁺ T-Zellen

der alten Mäuse findet hingegen selbst bei der höchsten Konzentration von 100 nM noch eine deutliche Zytotoxizität statt. Demnach scheint die bei den Kontrollzellen der jungen Mäuse aufgezeigte Zielzellyse vorwiegend über Perforin abzulaufen. Bei den CMA-behandelten Zellen der alten Mäuse könnte die, ab der zweiten Stunde des Assays beginnende, Zielzellyse auf die in Kapitel 5.3.2 beschriebene altersbedingte Steigerung der FasL-Expression zurückzuführen sein. Der sigmoidale Verlauf der entsprechenden Zytotoxizitätskurven ist charakteristisch für eine einzig über FasL-/FasR-vermittelte Zielzellyse (Hassin, Garber, Meiraz, Schiffenbauer, & Berke, 2011). Eine weitere mögliche Ursache könnte die drastische altersbedingte Erhöhung der Expressionslevels von Perforin und den Granzymen A und B darstellen (Abbildung 28). Wenn diese Erhöhung auf einer gesteigerten Quantität lytischer Granula beruht, wäre es möglich, dass es bei der Applikation von CMA im nanomolaren Bereich zu einer Sättigung in den CD8⁺ T-Zellen der alten Mäuse kommt und einige lytische Granula dadurch noch funktionsfähiges Perforin und Granzym an der immunologischen Synapse sezernieren könnten. Der sigmoidale Verlauf der Zytotoxizitätskurven der mit 5 nM bis 100 nM CMA behandelten CD8⁺ T-Zellen alter Mäuse könnte allerdings auch ein Indiz für eine Steigerung der Umschlagsgeschwindigkeiten von Perforin und den Granzymen A und B darstellen. In der ersten Stunde des Assays weisen die Zellen der alten Mäuse ab einer Konzentration von 5 nM keine Zytotoxizität gegen P815-Zellen auf (Abbildung 31). Da die CD8⁺ T-Zellen mit CMA präinkubiert wurden, sich aber während des Assays in CMA-freien Medium befanden, könnte die daran anschließende Zunahme der Zielzellyse auch auf neusynthetisiertes Perforin, Granzym A und B zurückzuführen sein. Um diese These zu überprüfen müssten spezifische Umschlaggeschwindigkeitsexperimente nachfolgen. Hierfür könnte man die CD8⁺ T-Zellen nach CMA-Behandlung zunächst in ein Medium mit isotopmarkierten Aminosäuren transferieren, einen Zytotoxizitätsassay anschließen und zu verschiedenen Zeitpunkten Überstände und Zellsuspensionen entnehmen. Im Anschluss könnte man die Proben mittels Flüssigchromatographie auftrennen und massenspektrometrisch auf altersbedingte Unterschiede in der Inkorporation isotopmarkierter Aminosäuren in Perforin oder die Granzyme A und B untersuchen (Claydon & Beynon, 2012).

Um den Anteil des auf der Aktivierung des FasR auf der Zielzelle durch den FasL der CD8⁺ T-Zellen basierten Zytotoxizitätsmechanismus an der gesamten Zielzellyse zu überprüfen, wurden Echtzeitzytotoxizitätsassays mit, mit einem inhibierenden anti-FasL-Antikörper behandelten, CD8⁺ T-Zellen beider Altersgruppen durchgeführt. Wie auch schon bei der CMA-Behandlung verursacht die Applikation des anti-FasL-Antikörpers eine stärkere Reduktion der Zytotoxizität CD8⁺ T-Zellen aus jungen Mäusen (Abbildung 32, Abbildung 33). Allerdings fällt der altersbedingte Unterschied des reduzierenden Effekts weniger stark aus als bei der Behandlung mit CMA. Demnach scheint der FasL-/FasR-

Zytotoxizitätsmechanismus einen größeren Anteil an der Zielzellyse von CD8⁺ T-Zellen junger Mäuse zu haben als bei denen der alten Mäuse. Dass der Effekt des anti-FasL-Antikörpers direkt einsetzt erscheint zunächst verwunderlich, da der zur Induktion der Apoptose führende Signalweg üblicherweise im Gegensatz zu dem durch lytische Granula vermittelten eine längere Dauer benötigt, bevor es zur Lyse der Zielzellen kommt (Hassin et al., 2011). In ihrer Publikation zu den zeitlichen Verläufen der beiden Zytotoxizitätsmechanismen konnten Hassin et al. allerdings auch einen unterstützenden Effekt des FasL-/FasR- auf den über lytische Granula vermittelten Signalweg feststellen, der dieses schnelle Einsetzen des Effekts der Antikörperbehandlung begründen könnte (Hassin et al., 2011). Weiterhin könnte auf diesem Effekt auch die Reduktion der Zytotoxizität gegen P815-Zellen, welche in der Literatur als FasR-negativ bis schwach exprimierend beschrieben werden, durch den inhibierenden anti-FasL-Antikörper beruhen (Saxena & Adler, 1999). Die Ursache für diesen unterstützenden Effekt ist bislang unbekannt.

NFAT zählt zu den bedeutendsten Transkriptionsfaktoren für die Funktionalität von T-Zellen und steuert die Genexpression nach Aktivierung dieses Zelltyps und während der Differenzierung (Crabtree & Olson, 2002; Hogan, Chen, Nardone, & Rao, 2003; Mognol, Carneiro, Robbs, Faget, & Viola, 2016). Zu den NFAT-regulierten Genen zählen unter anderem das IL-2-, das TNF α - und das FasL-kodierende Gen (Hogan et al., 2003; Mognol et al., 2016). Da die calcineurinabhängige Aktivierung von NFAT durch den Ca²⁺-Einstrom über STIM-aktivierte Orai-Kanäle reguliert wird (X. Liu et al., 2016) und stimulierte CD8⁺ T-Zellen alter Mäuse, wie in Kapiteln 5.2.2 und 5.2.3 beschrieben, verminderte Ca²⁺-Signale und geringere Expressionslevels für STIMs und Oraais aufweisen, wurde der Effekt des Calcineurin- respektive NFAT-Inhibitors CsA auf die Zytotoxizität von CD8⁺ T-Zellen und auf potenzielle Altersunterschiede untersucht. Aus den Ergebnissen der Zytotoxizitätsassays geht ein fundamentaler Altersunterschied bei dem Effekt von CsA auf den Ergebnisausgang hervor. Während die Behandlung mit 1 μ M CsA eine geringe Steigerung der Zytotoxizitätskinetik der CD8⁺ T-Zellen der jungen Mäuse verursacht, wird die Zytotoxizität der Zellen der alten Mäuse vehement reduziert (Abbildung 34). Eine Ursache für diesen Unterschied könnte in der ohnehin altersbedingt beeinträchtigten Aktivität von NFAT liegen (Pahlavani et al., 1995; Whisler et al., 1996). In Kombination mit den in dieser Arbeit beschriebenen, verminderten Ca²⁺-Signalen wäre es denkbar, dass die CsA-Behandlung die verbleibende niedrige Aktivität des Transkriptionsfaktors und seine Zellkerntranslokation in CD8⁺ T-Zellen vollständig zum Erliegen bringt, wohingegen sie bei den CD8⁺ T-Zellen junger Mäuse ohne Ca²⁺-Signalreduktionen die reguläre NFAT-Aktivität nicht merklich beeinträchtigt. Der hemmende Einfluss von CsA auf die Zytotoxizität der CD8⁺ T-Zellen aus alten Mäusen könnte beispielsweise indirekt auf einer unvollständigen Differenzierung durch eine verminderte IL-2-Expression oder direkt auf einer verminderten FasL-Expression

beruhen. Ersteres scheint allerdings vor dem Hintergrund der durchflusszytometrischen Kontrolle der Subtypenverteilung nach dreitägiger Stimulation in An- oder Abwesenheit von CsA unwahrscheinlich, da kein bedeutender Unterschied bei den T_{CM} - und T_{EM} -Anteilen der Gesamtpopulation beider Altersgruppen durch die CsA-Behandlung vorliegt (Abbildung 34D). Die Ergebnisse dieser Versuche sind vor allem vor dem Hintergrund von Organtransplantationen interessant. FK506 und CsA sind zwei prominente Calcineurininhibitoren, die als Immunsuppressiva gegen die Abstoßungsreaktion des Körpers auf Spenderorgane verabreicht werden können (Cohen et al., 1984; Fruman, Klee, Bierer, & Burakoff, 1992; Ochiai et al., 1987). Angesichts der deutlichen Unterschiede in der Wirksamkeit von CsA auf die Zytotoxizitäten zwischen den beiden untersuchten Kohorten lässt sich spekulieren, dass bei älteren Individuen eine geringere Dosis nach Organtransplantation zur Suppression der durch das Immunsystem vermittelten Abstoßungsreaktion ausreichen würde als bei jüngeren. Tatsächlich werden bei jüngeren Menschen höhere Dosen CsA appliziert als bei älteren (McDiarmid, 2015). Die Ursache hierfür ist allerdings nicht der altersbedingte Unterschied in der hemmenden Wirkung auf die Funktionalität von T-Zellen, sondern ein Unterschied in der Serumkonzentration bei gleicher verabreichter CsA-Dosis (McDiarmid, 2015).

Für die Lyse von Zielzellen benötigen $CD8^+$ T-Zellen eine Abfolge programmierter Schritte, wie die Bindung an Zielzellen, die Ausbildung einer IS und die durch Todesrezeptoren oder lytische Granula vermittelte Induktion der Apoptose oder Nekrose der infizierten oder entarteten Zielzellen (Halle, Halle, & Förster, 2017). Einige dieser Schritte der zytotoxischen Funktion benötigen für ihre Ausführung Ca^{2+} -Signale oder werden durch Ca^{2+} reguliert (Schwarz et al., 2013). Daher wäre es vorstellbar, dass Fluktuationen der $[Ca^{2+}]_{ext}$ einen Einfluss auf das Abtöten von infizierten oder entarteten Zellen haben. Da ihre K_D für die Ca^{2+} -Permeation zwischen 0,84 mM und 1,17 mM und damit nahe der physiologischen Serumkonzentration von Ca^{2+} liegen, wären die CRAC-Kanäle denkbar gut geeignet diese zytotoxische Funktion zu modulieren (Fierro & Parekh, 2000; Hoth & Penner, 1993). In einer Publikation der AG von Prof. Dr. Markus Hoth von 2018 konnte aufgezeigt werden, dass bei humanen $CD8^+$ T-Zellen der Bereich der optimalen $[Ca^{2+}]_{ext}$ mit 23 μ M bis 625 μ M relativ niedrig ausfällt (X. Zhou et al., 2018). Um den optimalen Bereich der $[Ca^{2+}]_{ext}$ für die zytolytische Funktion muriner $CD8^+$ T-Zellen zu bestimmen und auf altersbedingte Unterschiede zu untersuchen, wurden Echtzeitzytotoxizitätsassays mit Zugabe von $CaCl_2$ (Abbildung 35) oder dem Ca^{2+} -Chelator EGTA (Abbildung 36) zum Medium durchgeführt. Die murinen $CD8^+$ T-Zellen zeigen nur geringfügige Beeinflussungen ihrer Zytotoxizität durch variierende $[Ca^{2+}]_{ext}$ im Bereich 74 μ M bis 1718 μ M. Hierbei weisen die $CD8^+$ T-Zellen der jungen Mäuse eine etwas stärkere Reduktion der Zielzellyse bei Abweichungen von der $[Ca^{2+}]$ des für T-Zellen optimierten Mediums AIM V von 798 μ M auf als die der alten Mäuse.

Bei einer $[Ca^{2+}]_{ext}$ von 25 μM kommt es altersunabhängig zu einer starken Beeinträchtigung der Zytotoxizität, die bei 4 μM vollständig zum Erliegen kommt (Abbildung 36). Die mindestnotwendige $[Ca^{2+}]_{ext}$ muriner $CD8^+$ T-Zellen für eine optimale Effektorfunktion liegt somit bei ungefähr 74 μM . Die geringfügig gesteigerte Resistenz der $CD8^+$ T-Zellen alter Mäuse gegenüber Schwankungen der $[Ca^{2+}]_{ext}$ könnte einen Vorteil für die generell durch Immunoseneszenzerscheinungen beeinträchtigten Zellen bedeuten (Jiang et al., 2007; Moretto et al., 2008; Nikolich-Žugich et al., 2012). Hierdurch wären sie beispielsweise bei Krebserkrankungen besser an das durch konstante Veränderungen seiner Umgebung charakterisierte Tumormikromilieu angepasst (Frisch et al., 2019).

Murine $CD8^+$ T-Zellen weisen somit im Alter prinzipiell eine solide, in einigen Aspekten, wie der Zytotoxizitätskinetik, der Expression von Effektorproteinen oder der Resistenz gegenüber Schwankungen der $[Ca^{2+}]_{ext}$, sogar gesteigerte zytolytische Funktion auf. Der in anderen Studien dargestellte Defekt in der Zytotoxizität dieses Zelltyps könnte auf der Untersuchung dieser Funktion in spezifischen Krankheitsmodellen beruhen (Brien et al., 2009; Messaoudi et al., 2004; Smithey et al., 2011). Hierdurch werden grundlegende Alterserscheinungen von $CD8^+$ T-Zellen durch externe Faktoren, wie beispielsweise durch die im Alter beeinträchtigte Stimulation mittels professioneller antigenpräsentierender Zellen, die Zunahme von Entzündungsmediatoren oder die reduzierte IL-2-Expression $CD4^+$ T-Zellen maskiert (Beattie et al., 1990; Moretto et al., 2008; Nikolich-Žugich et al., 2012).

Anschließend an diese Arbeit könnte man die Versuche mit $CD8^+$ T-Zellen aus OT-1 Mäusen wiederholen, um zu überprüfen, ob die beschriebenen Effekte auch bei spezifischer TZR-Aktivierung auftreten. Diese Mauslinie verfügt über $CD8^+$ T-Zellen, die über einen TZR verfügen, welcher eine Peptidsequenz des Ovalbumins erkennt. Diese Peptidsequenz würde dann die unspezifische Aktivierung des TZR über anti-CD3-/anti-CD28-antikörpergekoppelten Beads bei der Stimulation oder den anti-CD3-Antikörper beim Ca^{2+} -Imaging und in den Zytotoxizitätsassays ersetzen. Weiterhin wäre es interessant, die Funktionalität von $CD8^+$ T-Zellen im Alter auf Einzelzellbasis zu untersuchen. Hierfür könnte man anstelle des plattenleserbasierten einen fluoreszenzmikroskopbasierten Zytotoxizitätsassay verwenden. Ein solches Verfahren wurde in der AG von Prof. Dr. Markus Hoth bereits für Untersuchungen der Zytotoxizität humaner $CD8^+$ T- und NK-Zellen gegen mit pCasper-GR transfizierte Zielzellen etabliert, welches man auf die murinen Zellen übertragen könnte (Backes et al., 2018). pCasper-GR besteht aus einem grünfluoreszierenden Protein (GFP), das über eine Caspaseschnittstelle mit einem rotfluoreszierenden Protein (RFP) verbunden ist. Regt man bei unapoptotischen Zielzellen die Fluoreszenz des GFP an, wird das RFP über Förster-Resonanzenergietransfer (FRET) angeregt und es kommt zu einer Mischform beider Fluoreszenzen (Backes et al., 2018; Förster, 1948). Wenn $CD8^+$ T-Zellen die Apoptose dieser transfizierten Zielzellen initiieren, trennen endogene Caspasen die

beiden fluoreszierenden Proteine voneinander, wodurch die Zielzellen wegen ausbleibenden FRETs grün fluoreszieren. Wird die Membranintegrität der Zielzellen durch Nekrosen oder auf die Apoptose folgende Sekundärnekrosen aufgehoben kommt es zum Fluoreszenzverlust (Backes et al., 2018). Durch diese Methode ließe sich also quantifizieren, ob es altersbedingte Unterschiede bei der Art des T-zellvermittelten Zelltods gibt. Ein weiterer Vorteil dieses fluoreszenzbasierten Zytotoxizitätsassays wäre die Möglichkeit einer parallelen Färbung der CD8⁺ T-Zellen mit einem Ca²⁺-Indikator, um während der Zielzelllyse Ca²⁺-Signale auslesen zu können, wodurch beide Hauptteile dieser Arbeit direkt miteinander kombiniert werden könnten.

7. Referenzen

- Akue, A. D., Lee, J.-Y., & Jameson, S. C. (2012). Derivation and Maintenance of Virtual Memory CD8 T Cells. *The Journal of Immunology*, *188*(6), 2516–2523. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1102213>
- Alansary, D., Bogeski, I., & Niemeyer, B. A. (2015). Facilitation of Orai3 targeting and store-operated function by Orai1. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, *1853*(7), 1541–1550. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2015.03.007>
- Andersen, M. H., Schrama, D., Thor Straten, P., & Becker, J. C. (2006). Cytotoxic T Cells. *Journal of Investigative Dermatology*, *126*(1), 32–41. <https://doi.org/10.1038/sj.jid.5700001>
- Angenendt, A., Steiner, R., Knörck, A., Schwär, G., Konrad, M., Krause, E., & Lis, A. (2020). Orai, STIM, and PMCA contribute to reduced calcium signal generation in CD8⁺ T cells of elderly mice. *Aging*, *12*. <https://doi.org/10.18632/aging.102809>
- Antonio Moro-Garcia, M., Alonso-Arias, R., & Lopez-Larrea, C. (2012). Molecular Mechanisms Involved in the Aging of the T-cell Immune Response. *Current Genomics*, *13*(8), 589–602. <https://doi.org/10.2174/138920212803759749>
- Backes, C. S., Friedmann, K. S., Mang, S., Knörck, A., Hoth, M., & Kummerow, C. (2018). Natural killer cells induce distinct modes of cancer cell death: Discrimination, quantification, and modulation of apoptosis, necrosis, and mixed forms. *Journal of Biological Chemistry*, *293*(42), 16348–16363. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA118.004549>
- Barbosa, M. C., Grosso, R. A., & Fader, C. M. (2018). Hallmarks of Aging: An Autophagic Perspective. *Frontiers in Endocrinology*, *9*, 790. <https://doi.org/10.3389/fendo.2018.00790>
- Bautista, D. M., Hoth, M., & Lewis, R. S. (2002). Enhancement of calcium signalling dynamics and stability by delayed modulation of the plasma-membrane calcium-ATPase in human T cells. *The Journal of Physiology*, *541*(Pt 3), 877–894. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2001.016154>
- Beattie, B. L., Devine, R., Grynoch, R., Toth, E. L., & Bleackley, R. C. (1990). Age-Related Decline in Interleukin 2 Production in Response to Influenza Vaccine. *Journal of the American Geriatrics Society*, *38*(6), 652–658. <https://doi.org/10.1111/j.1532-5415.1990.tb01424.x>
- Berridge, M. J. (1995). Calcium signalling and cell proliferation. *BioEssays*, Vol. 17, pp. 491–500. <https://doi.org/10.1002/bies.950170605>
- Berridge, M. J., Bootman, M. D., & Lipp, P. (1998, October 15). Calcium - A life and death signal. *Nature*, Vol. 395, pp. 645–648. <https://doi.org/10.1038/27094>
- Berridge, M. J., Lipp, P., & Bootman, M. D. (2000). The versatility and universality of calcium signalling. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, *1*(1), 11–21. <https://doi.org/10.1038/35036035>
- Beyenbach, K. W., & Wieczorek, H. (2006). The V-type H⁺ ATPase: molecular structure and function, physiological roles and regulation. *Journal of Experimental Biology*, *209*(4), 577–589. <https://doi.org/10.1242/jeb.02014>
- Bezprozvanny, I. B. (2010). Calcium signaling and neurodegeneration. *Acta Naturae*, *2*(1), 72–82. <https://doi.org/10.32607/20758251-2010-2-1-72-80>

- Binder, H. H. (1999). *Lexikon der chemischen Elemente: das Periodensystem in Fakten, Zahlen u. Daten* (Auflage: 1). Hirzel Verlag Stuttgart.
- Bogeski, I., Kummerow, C., Al-Ansary, D., Schwarz, E. C., Koehler, R., Kozai, D., ... Niemeyer, B. A. (2010). Differential redox regulation of ORAI ion channels: A mechanism to tune cellular Calcium signaling. *Science Signaling*, 3(115), ra24. <https://doi.org/10.1126/scisignal.2000672>
- Bootman, M. D., Chehab, T., Bultynck, G., Parys, J. B., & Rietdorf, K. (2018, March 1). The regulation of autophagy by calcium signals: Do we have a consensus? *Cell Calcium*, Vol. 70, pp. 32–46. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2017.08.005>
- Brandes, R., Lang, F., & Schmidt, R. F. (2019). *Physiologie des Menschen* (32. Auflag). Springer Verlag.
- Brandman, O., Liou, J., Park, W. S., & Meyer, T. (2007). STIM2 is a feedback regulator that stabilizes basal cytosolic and endoplasmic reticulum Ca²⁺ levels. *Cell*, 131(7), 1327–1339. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.11.039>
- Braun, A., Gessner, J. E., Varga-Szabo, D., Syed, S. N., Konrad, S., Stegner, D., ... Nieswandt, B. (2009). STIM1 is essential for Fcγ receptor activation and autoimmune inflammation. *Blood*, 113(5), 1097–1104. <https://doi.org/10.1182/blood-2008-05-158477>
- Brien, J. D., Uhrlaub, J. L., Hirsch, A., Wiley, C. A., & Nikolich-Zugich, J. (2009). Key role of T cell defects in age-related vulnerability to West Nile virus. *Journal of Experimental Medicine*, 206(12), 2735–2745. <https://doi.org/10.1084/jem.20090222>
- Brini, M. (2000). Effects of PMCA and SERCA pump overexpression on the kinetics of cell Ca²⁺ signalling. *The EMBO Journal*, 19(18), 4926–4935. <https://doi.org/10.1093/emboj/19.18.4926>
- Bruce, J. I. E. (2018, January 1). Metabolic regulation of the PMCA: Role in cell death and survival. *Cell Calcium*, Vol. 69, pp. 28–36. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2017.06.001>
- Brusnahan, S. K., McGuire, T. R., Jackson, J. D., Lane, J. T., Garvin, K. L., O’Kane, B. J., ... Sharp, J. G. (2010). Human blood and marrow side population stem cell and Stro-1 positive bone marrow stromal cell numbers decline with age, with an increase in quality of surviving stem cells: Correlation with cytokines. *Mechanisms of Ageing and Development*, 131(11–12), 718–722. <https://doi.org/10.1016/j.mad.2010.10.002>
- Cahalan, M. D. (2009). STIMulating store-operated Ca(2+) entry. *Nature Cell Biology*, 11(6), 669–677. <https://doi.org/10.1038/ncb0609-669>
- Cannizzo, E. S., Clement, C. C., Morozova, K., Valdor, R., Kaushik, S., Almeida, L. N., ... Santambrogio, L. (2012). Age-related oxidative stress compromises endosomal proteostasis. *Cell Reports*, 2(1), 136–149. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2012.06.005>
- Caride, A. J., Filoteo, A. G., Penheiter, A. R., Pászty, K., Enyedi, Á., & Penniston, J. T. (2001). Delayed activation of the plasma membrane calcium pump by a sudden increase in Ca²⁺: fast pumps reside in fast cells. *Cell Calcium*, 30(1), 49–57. <https://doi.org/10.1054/ceca.2001.0212>
- Carrasco, S., & Meyer, T. (2011). STIM Proteins and the Endoplasmic Reticulum-Plasma Membrane Junctions. *Annual Review of Biochemistry*, 80(1), 973–1000. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-061609-165311>
- Chávez-Galán, L., Arenas-Del Angel, M. C., Zenteno, E., Chávez, R., & Lascurain, R. (2009). Cell death mechanisms induced by cytotoxic lymphocytes. *Cellular & Molecular Immunology*, 6(1), 15–25. <https://doi.org/10.1038/cmi.2009.3>

- Chrest, F. J., Buchholz, M. A., Kim, Y. H., Kwon, T. K., & Nordin, A. A. (1995). Anti-CD3-induced apoptosis in T-cells from young and old mice. *Cytometry*, *20*(1), 33–42. <https://doi.org/10.1002/cyto.990200107>
- Cikes, M., Friberg, S., & Klein, G. (1973). Progressive loss of H-2 antigens with concomitant increase of cell-surface antigen(s) determined by Moloney leukemia virus in cultured murine lymphomas. *Journal of the National Cancer Institute*, *50*(2), 347–362. <https://doi.org/10.1093/jnci/50.2.347>
- Clapham, D. E. (2007, December 14). Calcium Signaling. *Cell*, Vol. 131, pp. 1047–1058. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.11.028>
- Claydon, A. J., & Beynon, R. (2012, December). Proteome dynamics: Revisiting turnover with a global perspective. *Molecular and Cellular Proteomics*, Vol. 11, pp. 1551–1565. <https://doi.org/10.1074/mcp.O112.022186>
- Cohen, D. J., Loertscher, R., Rubin, M. F., Tilney, N. L., Carpenter, C. B., & Strom, T. B. (1984, November). Cyclosporine: A new immunosuppressive agent for organ transplantation. *Annals of Internal Medicine*, Vol. 101, pp. 667–682. <https://doi.org/10.7326/0003-4819-101-5-667>
- Contor, H., & Boyse, E. A. (1975). Functional subclasses of T lymphocytes bearing different Ly antigens. I. The generation of functionally distinct T cell subclasses is a differentiative process independent of antigen. *Journal of Experimental Medicine*, *141*(6), 1376–1389. <https://doi.org/10.1084/jem.141.6.1376>
- Crabtree, G. R., & Olson, E. N. (2002). NFAT signaling: Choreographing the social lives of cells. *Cell*, Vol. 109. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(02\)00699-2](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(02)00699-2)
- Cuervo, A. M., & Macian, F. (2014). Autophagy and the immune function in aging. *Current Opinion in Immunology*, Vol. 29, pp. 97–104. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2014.05.006>
- Darbellay, B., Arnaudeau, S., Bader, C. R., Konig, S., & Bernheim, L. (2011). STIM1L is a new actin-binding splice variant involved in fast repetitive Ca²⁺ release. *Journal of Cell Biology*, *194*(2), 335–346. <https://doi.org/10.1083/jcb.201012157>
- de Saint Basile, G., Ménasché, G., & Fischer, A. (2010). Molecular mechanisms of biogenesis and exocytosis of cytotoxic granules. *Nature Reviews Immunology*, *10*(8), 568–579. <https://doi.org/10.1038/nri2803>
- Decman, V., Laidlaw, B. J., DiMenna, L. J., Abdulla, S., Mozdzanowska, K., Erikson, J., ... Wherry, E. J. (2010). Cell-Intrinsic Defects in the Proliferative Response of Antiviral Memory CD8 T Cells in Aged Mice upon Secondary Infection. *The Journal of Immunology*, *184*(9), 5151–5159. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0902063>
- Decuypere, J.-P., Kindt, D., Luyten, T., Welkenhuyzen, K., Missiaen, L., De Smedt, H., ... Parys, J. B. (2013). mTOR-Controlled Autophagy Requires Intracellular Ca²⁺ Signaling. *PLoS One*, *8*(4), e61020. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061020>
- Deng, Y., Jing, Y., Campbell, A. E., & Gravenstein, S. (2004). Age-Related Impaired Type 1 T Cell Responses to Influenza: Reduced Activation Ex Vivo, Decreased Expansion in CTL Culture In Vitro, and Blunted Response to Influenza Vaccination In Vivo in the Elderly. *The Journal of Immunology*, *172*(6), 3437–3446. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.172.6.3437>
- Diez-Bello, R., Jardin, I., Salido, G. M., & Rosado, J. A. (2017). Orai1 and Orai2 mediate store-operated calcium entry that regulates HL60 cell migration and FAK phosphorylation. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, *1864*(6), 1064–1070. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2016.11.014>

- Distelhorst, C. W., & Bootman, M. D. (2011). Bcl-2 interaction with the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor: role in Ca²⁺ signaling and disease. *Cell Calcium*, 50(3), 234–241. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2011.05.011>
- Dolmetsch, R. E., Lewis, R. S., Goodnow, C. C., & Healy, J. I. (1997). Differential activation of transcription factors induced by Ca²⁺ response amplitude and duration. *Nature*, 386(6627), 855–858. <https://doi.org/10.1038/386855a0>
- Donnadieu, E., Bismuth, G., & Trautmann, A. (1992). Calcium fluxes in T lymphocytes. *The Journal of Biological Chemistry*, 267(36), 25864–25872.
- Dunham, E. T., & Glynn, I. M. (1961). Adenosinetriphosphatase activity and the active movements of alkali metal ions. *The Journal of Physiology*, 156(2), 274–293. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1961.sp006675>
- Dunkle, A., & He, Y. W. (2011, April). Apoptosis and autophagy in the regulation of T lymphocyte function. *Immunologic Research*, Vol. 49, pp. 70–86. <https://doi.org/10.1007/s12026-010-8195-5>
- Dustin, M. L., & Long, E. O. (2010). Cytotoxic immunological synapses. *Immunological Reviews*, 235(1), 24–34. <https://doi.org/10.1111/j.0105-2896.2010.00904.x>
- Feske, S., Gwack, Y., Prakriya, M., Srikanth, S., Puppel, S.-H., Tanasa, B., ... Rao, A. (2006). A mutation in Orai1 causes immune deficiency by abrogating CRAC channel function. *Nature*, 441(7090), 179–185. <https://doi.org/10.1038/nature04702>
- Feske, S., Picard, C., & Fischer, A. (2010, May). Immunodeficiency due to mutations in ORAI1 and STIM1. *Clinical Immunology*, Vol. 135, pp. 169–182. <https://doi.org/10.1016/j.clim.2010.01.011>
- Feske, S., Prakriya, M., Rao, A., & Lewis, R. S. (2005). A severe defect in CRAC Ca²⁺ channel activation and altered K⁺ channel gating in T cells from immunodeficient patients. *The Journal of Experimental Medicine*, 202(5), 651–662. <https://doi.org/10.1084/jem.20050687>
- Feske, S., Skolnik, E. Y., & Prakriya, M. (2012). Ion channels and transporters in lymphocyte function and immunity. *Nature Reviews. Immunology*, 12(7), 532–547. <https://doi.org/10.1038/nri3233>
- Feske, S., Wulff, H., & Skolnik, E. Y. (2015). Ion Channels in Innate and Adaptive Immunity. *Annual Review of Immunology*, 33(1), 291–353. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-032414-112212>
- Fierro, L., & Parekh, A. B. (2000). Substantial depletion of the intracellular Ca²⁺ stores is required for macroscopic activation of the Ca²⁺ release-activated Ca²⁺ current in rat basophilic leukaemia cells. *Journal of Physiology*, 522(2), 247–257. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7793.2000.t01-1-00247.x>
- Förster, T. (1948). Zwischenmolekulare Energiewanderung und Fluoreszenz. *Annalen Der Physik*, 437(1–2), 55–75. <https://doi.org/10.1002/andp.19484370105>
- Frisch, J., Angenendt, A., Hoth, M., Prates Roma, L., & Lis, A. (2019, April 1). STIM-Orai channels and reactive oxygen species in the tumor microenvironment. *Cancers*, Vol. 11. <https://doi.org/10.3390/cancers11040457>
- Fruman, D. A., Klee, C. B., Bierer, B. E., & Burakoff, S. J. (1992). Calcineurin phosphatase activity in T lymphocytes is inhibited by FK 506 and cyclosporin A. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89(9), 3686–3690. <https://doi.org/10.1073/pnas.89.9.3686>

- Fulop, T., Larbi, A., Dupuis, G., Le Page, A., Frost, E. H., Cohen, A. A., ... Franceschi, C. (2017). Immunosenescence and Inflamm-Aging As Two Sides of the Same Coin: Friends or Foes? *Frontiers in Immunology*, 8, 1960. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01960>
- Gajewski, T. F., Markiewicz, M. A., & Uyttenhove, C. (2001). The P815 Mastocytoma Tumor Model. *Current Protocols in Immunology*, 43(1), Unit 20.4. <https://doi.org/10.1002/0471142735.im2004s43>
- Gao, W., Ding, W.-X., Stolz, D. B., & Yin, X.-M. (2008). Induction of macroautophagy by exogenously introduced calcium. *Autophagy*, 4(6), 754–761. <https://doi.org/10.4161/auto.6360>
- Gately, M. K., & Martz, E. (1977). Comparative studies on the mechanisms of nonspecific, Con A-dependent cytolysis and specific T cell-mediated cytolysis. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 119(5), 1711–1722. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/303251>
- Geginat, J., Lanzavecchia, A., & Sallusto, F. (2003). Proliferation and differentiation potential of human CD8+ memory T-cell subsets in response to antigen or homeostatic cytokines. *Blood*, 101(11), 4260–4266. <https://doi.org/10.1182/blood-2002-11-3577>
- Ghislat, G., Patron, M., Rizzuto, R., & Knecht, E. (2012). Withdrawal of essential amino acids increases autophagy by a pathway involving Ca²⁺/calmodulin-dependent kinase kinase- β (CaMKK- β). *The Journal of Biological Chemistry*, 287(46), 38625–38636. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.365767>
- Goldrath, A. W., Bogatzki, L. Y., & Bevan, M. J. (2000). Naive T cells transiently acquire a memory-like phenotype during homeostasis-driven proliferation. *Journal of Experimental Medicine*, 192(4), 557–564. <https://doi.org/10.1084/jem.192.4.557>
- Golstein, P., & Smith, E. T. (1976). The lethal hit stage of mouse T and non-T cell-mediated cytolysis: differences in cation requirements and characterization of an analytical "cation pulse" method. *European Journal of Immunology*, 6(1), 31–37. <https://doi.org/10.1002/eji.1830060108>
- Gomperts, B. D., Kramer, I. M., & Tatham, P. E. R. (2015). *Signal transduction* (2. Auflage). Elsevier/Academic Press.
- Goronzy, J. J., Fang, F., Cavanagh, M. M., Qi, Q., & Weyand, C. M. (2015). Naive T Cell Maintenance and Function in Human Aging. *The Journal of Immunology*, 194(9), 4073–4080. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1500046>
- Grossmann, A., Maggio-Price, L., Jinneman, J. C., & Rabinovitch, P. S. (1991). Influence of aging on intracellular free calcium and proliferation of mouse T-cell subsets from various lymphoid organs. *Cellular Immunology*, 135(1), 118–131. [https://doi.org/10.1016/0008-8749\(91\)90259-E](https://doi.org/10.1016/0008-8749(91)90259-E)
- Grynkiewicz, G., Poenie, M., & Tsien, R. Y. (1985). A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties. *Journal of Biological Chemistry*, Vol. 260, pp. 3440–3450.
- Gupta, S. (2005, June). Molecular mechanisms of apoptosis in the cells of the immune system in human aging. *Immunological Reviews*, Vol. 205, pp. 114–129. <https://doi.org/10.1111/j.0105-2896.2005.00261.x>
- Halle, S., Halle, O., & Förster, R. (2017). Mechanisms and Dynamics of T Cell-Mediated Cytotoxicity In Vivo. *Trends in Immunology*, 38(6), 432–443. <https://doi.org/10.1016/j.it.2017.04.002>

- Hassin, D., Garber, O. G., Meiraz, A., Schiffenbauer, Y. S., & Berke, G. (2011). Cytotoxic T lymphocyte perforin and Fas ligand working in concert even when Fas ligand lytic action is still not detectable. *Immunology*, *133*(2), 190–196. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2011.03426.x>
- Hawley, S. A., Pan, D. A., Mustard, K. J., Ross, L., Bain, J., Edelman, A. M., ... Hardie, D. G. (2005). Calmodulin-dependent protein kinase kinase- β is an alternative upstream kinase for AMP-activated protein kinase. *Cell Metabolism*, *2*(1), 9–19. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2005.05.009>
- Hinkson, I. V., & Elias, J. E. (2011, May). The dynamic state of protein turnover: It's about time. *Trends in Cell Biology*, Vol. 21, pp. 293–303. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2011.02.002>
- Hodes, R. J. (1997). Aging and the immune system. *Immunological Reviews*, *160*, 5–8. <https://doi.org/10.1111/j.1600-065x.1997.tb01022.x>
- Hogan, P. G., Chen, L., Nardone, J., & Rao, A. (2003). Transcriptional regulation by calcium, calcineurin and NFAT. *Genes Dev.*, *17*(18), 2205–2232. <https://doi.org/10.1101/gad.1102703.GENES>
- Hogg, A. E., Parsons, K., Taylor, G., Worth, A., Beverley, P., Howard, C. J., & Villarreal-Ramos, B. (2011). Characterization of age-related changes in bovine CD8 + T-cells. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, *140*(1–2), 47–54. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2010.11.012>
- Hogquist, K. A., Jameson, S. C., Heath, W. R., Howard, J. L., Bevan, M. J., & Carbone, F. R. (1994). T cell receptor antagonist peptides induce positive selection. *Cell*, *76*(1), 17–27. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(94\)90169-4](https://doi.org/10.1016/0092-8674(94)90169-4)
- Hoth, M. (2016). CRAC channels, calcium, and cancer in light of the driver and passenger concept. *Biochimica et Biophysica Acta*, *1863*(6 Pt B), 1408–1417. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2015.12.009>
- Hoth, M., & Penner, R. (1993). Calcium release-activated calcium current in rat mast cells. *The Journal of Physiology*, 359–386. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1993.sp019681>
- Høyer-Hansen, M., Bastholm, L., Szyniarowski, P., Campanella, M., Szabadkai, G., Farkas, T., ... Jäättelä, M. (2007). Control of Macroautophagy by Calcium, Calmodulin-Dependent Kinase Kinase- β , and Bcl-2. *Molecular Cell*, *25*(2), 193–205. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2006.12.009>
- Huss, M., Ingenhorst, G., König, S., Gaßel, M., Dröse, S., Zeeck, A., ... Wiczorek, H. (2002). Concanamycin A, the Specific Inhibitor of V-ATPases, Binds to the V_o Subunit c. *Journal of Biological Chemistry*, *277*(43), 40544–40548. <https://doi.org/10.1074/jbc.M207345200>
- Inayama, M., Suzuki, Y., Yamada, S., Kurita, T., Yamamura, H., Ohya, S., ... Imaizumi, Y. (2015). Orai1-Orai2 complex is involved in store-operated calcium entry in chondrocyte cell lines. *Cell Calcium*, *57*(5–6), 337–347. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2015.02.005>
- Jayanthi, S., Deng, X., Ladenheim, B., McCoy, M. T., Cluster, A., Cai, N. S., & Cadet, J. L. (2005). Calcineurin/NFAT-induced up-regulation of the Fas ligand/Fas death pathway is involved in methamphetamine-induced neuronal apoptosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *102*(3), 868–873. <https://doi.org/10.1073/pnas.0404990102>
- Jessel, R., Haertel, S., Socaciu, C., Tykhonova, S., & Diehl, H. A. (2002). Kinetics of apoptotic markers in exogenously induced apoptosis of EL4 cells. *Journal of Cellular*

- and Molecular Medicine*, 6(1), 82–92. <https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2002.tb00313.x>
- Jiang, J., Gross, D., Elbaum, P., & Murasko, D. M. (2007). Aging affects initiation and continuation of T cell proliferation. *Mechanisms of Ageing and Development*, 128(4), 332–339. <https://doi.org/10.1016/j.mad.2007.02.002>
- Johnson, M. (2012). Laboratory Mice and Rats. *Materials and Methods*, 2. <https://doi.org/10.13070/mm.en.2.113>
- Jousset, H., Frieden, M., & Demaurex, N. (2007). STIM1 knockdown reveals that store-operated Ca²⁺ channels located close to sarco/endoplasmic Ca²⁺ ATPases (SERCA) pumps silently refill the endoplasmic reticulum. *Journal of Biological Chemistry*, 282(15), 11456–11464. <https://doi.org/10.1074/jbc.M609551200>
- Kaku, K., Fiedorek, F. T., Province, M., & Permutt, M. A. (1988). Genetic analysis of glucose tolerance in inbred mouse strains. Evidence for polygenic control. *Diabetes*, 37(6), 707–713. <https://doi.org/10.2337/diab.37.6.707>
- Kataoka, T., Shinohara, N., Takayama, H., Takaku, K., Kondo, S., Yonehara, S., & Nagai, K. (1996). Concanamycin A, a powerful tool for characterization and estimation of contribution of perforin- and Fas-based lytic pathways in cell-mediated cytotoxicity. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 156(10), 3678–3686. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8621902>
- Keil, J. M., Shen, Z., Briggs, S. P., & Patrick, G. N. (2010). Regulation of STIM1 and SOCE by the ubiquitin-proteasome system (UPS). *PLoS ONE*, 5(10). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0013465>
- Kelly, J. M., Sterry, S. J., Cose, S., Turner, S. J., Fecondo, J., Rodda, S., ... Carbone, F. R. (1993). Identification of conserved T cell receptor CDR3 residues contacting known exposed peptide side chains from a major histocompatibility complex class I-bound determinant. *European Journal of Immunology*, 23(12), 3318–3326. <https://doi.org/10.1002/eji.1830231239>
- Kim, K.-D., Srikanth, S., Tan, Y.-V., Yee, M.-K., Jew, M., Damoiseaux, R., ... Gwack, Y. (2014). Calcium Signaling via Orai1 Is Essential for Induction of the Nuclear Orphan Receptor Pathway To Drive Th17 Differentiation. *The Journal of Immunology*, 192(1), 110–122. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1302586>
- Kim, K.-D., Srikanth, S., Yee, M.-K. W., Mock, D. C., Lawson, G. W., & Gwack, Y. (2011). ORAI1 deficiency impairs activated T cell death and enhances T cell survival. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 187(7), 3620–3630. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1100847>
- Kisielow, P., Hirst, J. A., Shiku, H., Beverley, P. C. L., Hoffmann, M. K., Boyse, E. A., & Oettgen, H. F. (1975). Ly antigens as markers for functionally distinct subpopulations of thymus-derived lymphocytes of the mouse. *Nature*, 253(5488), 219–220. <https://doi.org/10.1038/253219a0>
- Klein, S. L., & Flanagan, K. L. (2016). Sex differences in immune responses. *Nature Reviews Immunology*, 16(10), 626–638. <https://doi.org/10.1038/nri.2016.90>
- Klionsky, D. J. (2007, November). Autophagy: From phenomenology to molecular understanding in less than a decade. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, Vol. 8, pp. 931–937. <https://doi.org/10.1038/nrm2245>
- Kuklina, E. M. (2013). Molecular mechanisms of T-cell anergy. *Biochemistry. Biokhimiia*, 78(2), 144–156. <https://doi.org/10.1134/S000629791302003X>

- Kummerow, C., Schwarz, E. C., Bufe, B., Zufall, F., Hoth, M., & Qu, B. (2014). A simple, economic, time-resolved killing assay. *European Journal of Immunology*, *44*(6), 1870–1872. <https://doi.org/10.1002/eji.201444518>
- Lang, S., Erdmann, F., Jung, M., Wagner, R., Cavalié, A., & Zimmermann, R. (2011). Sec61 complexes form ubiquitous ER Ca²⁺ leak channels. *Channels*, *5*(3). <https://doi.org/10.4161/chan.5.3.15314>
- Latinis, K. M., Norian, L. A., Eliason, S. L., & Koretzky, G. A. (1997). Two NFAT transcription factor binding sites participate in the regulation of CD95 (Fas) ligand expression in activated human T cells. *Journal of Biological Chemistry*, *272*(50), 31427–31434. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.50.31427>
- Lemster, B. H., Michel, J. J., Montag, D. T., Paat, J. J., Studenski, S. A., Newman, A. B., & Vallejo, A. N. (2008). Induction of CD56 and TCR-Independent Activation of T Cells with Aging. *The Journal of Immunology*, *180*(3), 1979–1990. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.180.3.1979>
- Leng, J., & Goldstein, D. R. (2010). Impact of aging on viral infections. *Microbes and Infection*, *12*(14–15), 1120–1124. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2010.08.009>
- Lewis, R. S. (2001). Calcium signaling mechanisms in T lymphocytes. *Annual Review of Immunology*, *19*(1), 497–521. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.19.1.497>
- Li, Z., Wu, Y., Wang, C., & Zhang, M. (2019). Mouse CD8+NKT-like cells exert dual cytotoxicity against mouse tumor cells and myeloid-derived suppressor cells. *Cancer Immunology, Immunotherapy: CII*, *68*(8), 1303–1315. <https://doi.org/10.1007/s00262-019-02363-3>
- Lichtiger, S., Present, D. H., Kornbluth, A., Gelernt, I., Bauer, J., Galler, G., ... Hanauer, S. (1994). Cyclosporine in Severe Ulcerative Colitis Refractory to Steroid Therapy. *New England Journal of Medicine*, *330*(26), 1841–1845. <https://doi.org/10.1056/NEJM199406303302601>
- Liou, J., Kim, M. L., Do Heo, W., Jones, J. T., Myers, J. W., Ferrell, J. E., & Meyer, T. (2005). STIM1 is a Ca²⁺ Sensor Essential for Ca²⁺-Store-Depletion-Triggered Ca²⁺ Influx. *Current Biology*, *15*(13), 1235–1241. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2005.05.055>
- Lis, A., Peinelt, C., Beck, A., Parvez, S., Monteilh-Zoller, M., Fleig, A., & Penner, R. (2007). CRACM1, CRACM2, and CRACM3 are store-operated Ca²⁺ channels with distinct functional properties. *Current Biology: CB*, *17*(9), 794–800. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2007.03.065>
- Liu, X., Berry, C. T., Ruthel, G., Madara, J. J., MacGillivray, K., Gray, C. M., ... Freedman, B. D. (2016). T Cell Receptor-induced Nuclear Factor κ B (NF- κ B) Signaling and Transcriptional Activation Are Regulated by STIM1- and Orai1-mediated Calcium Entry. *The Journal of Biological Chemistry*, *291*(16), 8440–8452. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.713008>
- Liu, Y., Sanoff, H. K., Cho, H., Burd, C. E., Torrice, C., Ibrahim, J. G., ... Sharpless, N. E. (2009). Expression of p16INK4a in peripheral blood T-cells is a biomarker of human aging. *Aging Cell*, *8*(4), 439–448. <https://doi.org/10.1111/j.1474-9726.2009.00489.x>
- Lu, K. P., & Means, A. R. (1993). Regulation of the cell cycle by calcium and calmodulin. *Endocrine Reviews*, *14*(1), 40–58. <https://doi.org/10.1210/edrv-14-1-40>
- Lum, J. J., Bauer, D. E., Kong, M., Harris, M. H., Li, C., Lindsten, T., & Thompson, C. B. (2005). Growth factor regulation of autophagy and cell survival in the absence of apoptosis. *Cell*, *120*(2), 237–248. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2004.11.046>

- Luyten, T., Welkenhuyzen, K., Roest, G., Kania, E., Wang, L., Bittremieux, M., ... Bultynck, G. (2017). Resveratrol-induced autophagy is dependent on IP3Rs and on cytosolic Ca²⁺. *Biochimica et Biophysica Acta. Molecular Cell Research*, 1864(6), 947–956. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2017.02.013>
- Lythe, G., Callard, R. E., Hoare, R. L., & Molina-París, C. (2016). How many TCR clonotypes does a body maintain? *Journal of Theoretical Biology*, 389, 214–224. <https://doi.org/10.1016/j.jtbi.2015.10.016>
- Lyubchenko, T. A., Wurth, G. A., & Zweifach, A. (2001). Role of calcium influx in cytotoxic T lymphocyte lytic granule exocytosis during target cell killing. *Immunity*, 15(5), 847–859. [https://doi.org/10.1016/s1074-7613\(01\)00233-3](https://doi.org/10.1016/s1074-7613(01)00233-3)
- Mahnke, Y. D., Brodie, T. M., Sallusto, F., Roederer, M., & Lugli, E. (2013). The who's who of T-cell differentiation: Human memory T-cell subsets. *European Journal of Immunology*, 43(11), 2797–2809. <https://doi.org/10.1002/eji.201343751>
- Matsuda, S., & Koyasu, S. (2000). Mechanisms of action of cyclosporine. *Immunopharmacology*, 47(2–3), 119–125. [https://doi.org/10.1016/s0162-3109\(00\)00192-2](https://doi.org/10.1016/s0162-3109(00)00192-2)
- Mattson, M. P. (2007). Calcium and neurodegeneration. *Aging Cell*, 6(3), 337–350. <https://doi.org/10.1111/j.1474-9726.2007.00275.x>
- Maul-Pavicic, A., Chiang, S. C. C., Rensing-Ehl, A., Jessen, B., Fauriat, C., Wood, S. M., ... Ehl, S. (2011). ORA1-mediated calcium influx is required for human cytotoxic lymphocyte degranulation and target cell lysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(8), 3324–3329. <https://doi.org/10.1073/pnas.1013285108>
- McDiarmid, S. V. (2015). Special Considerations for Immunosuppression in Children. In *Transplantation of the Liver: Third Edition* (pp. 1289–1316). <https://doi.org/10.1016/B978-1-4557-0268-8.00092-0>
- Messaoudi, I., LeMaoult, J., Guevara-Patino, J. A., Metzner, B. M., & Nikolich-Zugich, J. (2004). Age-related CD8 T cell clonal expansions constrict CD8 T cell repertoire and have the potential to impair immune defense. *Journal of Experimental Medicine*, 200(10), 1347–1358. <https://doi.org/10.1084/jem.20040437>
- Miederer, A. M., Alansary, D., Schwär, G., Lee, P. H., Jung, M., Helms, V., & Niemeyer, B. A. (2015). A STIM2 splice variant negatively regulates store-operated calcium entry. *Nature Communications*, 6. <https://doi.org/10.1038/ncomms7899>
- Ming, M., Schirra, C., Becherer, U., Stevens, D. R., & Rettig, J. (2015). Behavior and properties of mature lytic granules at the immunological synapse of human cytotoxic T lymphocytes. *PLoS ONE*, 10(8), e0135994. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0135994>
- Mognol, G. P., Carneiro, F. R. G., Robbs, B. K., Faget, D. V., & Viola, J. P. B. (2016). Cell cycle and apoptosis regulation by NFAT transcription factors: new roles for an old player. *Cell Death & Disease*, 7(4), e2199. <https://doi.org/10.1038/cddis.2016.97>
- Monteiro, M., Evaristo, C., Legrand, A., Nicoletti, A., & Rocha, B. (2007). Cartography of gene expression in CD8 single cells: Novel CCR7- subsets suggest differentiation independent of CD45RA expression. *Blood*, 109(7), 2863–2870. <https://doi.org/10.1182/blood-2006-06-027060>
- Moore, M. W., Carbone, F. R., & Bevan, M. J. (1988). Introduction of soluble protein into the class I pathway of antigen processing and presentation. *Cell*, 54(6), 777–785. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(88\)91043-4](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(88)91043-4)

- Moretto, M. M., Lawlor, E. M., & Khan, I. A. (2008). Aging Mice Exhibit a Functional Defect in Mucosal Dendritic Cell Response against an Intracellular Pathogen. *The Journal of Immunology*, 181(11), 7977–7984. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.181.11.7977>
- Moulis, M., & Vindis, C. (2018). Autophagy in Metabolic Age-Related Human Diseases. *Cells*, 7(10), 149. <https://doi.org/10.3390/cells7100149>
- Mullins, F. M., Chan, Y. P., Dolmetsch, R. E., & Lewis, R. S. (2009). STIM1 and calmodulin interact with Orai1 to induce Ca²⁺- dependent inactivation of CRAC channels. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(36), 15495–15500. <https://doi.org/10.1073/pnas.0906781106>
- Münz, C. (2016, November 1). Autophagy Beyond Intracellular MHC Class II Antigen Presentation. *Trends in Immunology*, Vol. 37, pp. 755–763. <https://doi.org/10.1016/j.it.2016.08.017>
- Murphy, K., & Weaver, C. (2018). Janeway Immunologie. In *Janeway Immunologie* (9. Auflage). <https://doi.org/10.1007/978-3-662-56004-4>
- Nagarkatti, N., & Davis, B. A. (2003). Tamoxifen induces apoptosis in Fas⁺ tumor cells by upregulating the expression of Fas ligand. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 51(4), 284–290. <https://doi.org/10.1007/s00280-003-0581-4>
- Nikolich-Žugich, J. (2014). Aging of the T Cell Compartment in Mice and Humans: From No Naive Expectations to Foggy Memories. *The Journal of Immunology*, 193(6), 2622–2629. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1401174>
- Nikolich-Zugich, J., Knox, K. S., Rios, C. T., Natt, B., Bhattacharya, D., & Fain, M. J. (2020). SARS-CoV-2 and COVID-19 in older adults: what we may expect regarding pathogenesis, immune responses, and outcomes. *GeroScience*, 1. <https://doi.org/10.1007/s11357-020-00186-0>
- Nikolich-Žugich, J., Li, G., Uhrlaub, J. L., Renkema, K. R., & Smithey, M. J. (2012). Age-related changes in CD8 T cell homeostasis and immunity to infection. *Seminars in Immunology*, 24(5), 356–364. <https://doi.org/10.1016/j.smim.2012.04.009>
- Nikolich-Žugich, J., Slifka, M. K., & Messaoudi, I. (2004, February). The many important facets of T-cell repertoire diversity. *Nature Reviews Immunology*, Vol. 4, pp. 123–132. <https://doi.org/10.1038/nri1292>
- Ochiai, T., Nakajima, K., Nagata, M., Suzuki, T., Asano, T., Uematsu, T., ... Nakagoori, T. (1987). Effect of a new immunosuppressive agent, FK 506, on heterotopic cardiac allotransplantation in the rat. *Transplantation Proceedings*, 19(1 Pt 2), 1284–1286. [https://doi.org/10.1016/0014-4835\(90\)90087-B](https://doi.org/10.1016/0014-4835(90)90087-B)
- Oeppen, J., & Vaupel, J. W. (2002). Demography. Broken Limits to Life Expectancy. *Science*, 296(5570), 1029–1031. <https://doi.org/10.1126/science.1069675>
- Oh-Hora, M. (2009). Calcium signaling in the development and function of T-lineage cells. *Immunological Reviews*, 231(1), 210–224. <https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2009.00819.x>
- Oh-Hora, M., & Rao, A. (2008). Calcium signaling in lymphocytes. *Current Opinion in Immunology*, 20(3), 250–258. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2008.04.004>
- Oh-Hora, M., Yamashita, M., Hogan, P. G., Sharma, S., Lamperti, E., Chung, W., ... Rao, A. (2008). Dual functions for the endoplasmic reticulum calcium sensors STIM1 and STIM2 in T cell activation and tolerance. *Nature Immunology*, 9(4), 432–443. <https://doi.org/10.1038/ni1574>

- Orrenius, S., Zhivotovsky, B., & Nicotera, P. (2003, July 1). Regulation of cell death: The calcium-apoptosis link. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, Vol. 4, pp. 552–565. <https://doi.org/10.1038/nrm1150>
- Pahlavani, M. A., Harris, M. D., & Richardson, A. (1995). The age-related decline in the induction of IL-2 transcription is correlated to changes in the transcription factor NFAT. *Cellular Immunology*, 165(1), 84–91. <https://doi.org/10.1006/cimm.1995.1190>
- Palmer, D. B. (2013). The effect of age on thymic function. *Frontiers in Immunology*, 4, 316. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2013.00316>
- Parekh, A. B. (2011). Decoding cytosolic Ca²⁺ oscillations. *Trends in Biochemical Sciences*, 36(2), 78–87. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2010.07.013>
- Parekh, A. B., & Putney, J. W. (2005). Store-Operated Calcium Channels. *Physiological Reviews*, 85(2), 757–810. <https://doi.org/10.1152/physrev.00057.2003>
- Park, C. Y., Hoover, P. J., Mullins, F. M., Bachhawat, P., Covington, E. D., Raunser, S., ... Lewis, R. S. (2009). STIM1 Clusters and Activates CRAC Channels via Direct Binding of a Cytosolic Domain to Orai1. *Cell*, 136(5), 876–890. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.02.014>
- Pchitskaya, E., Popugaeva, E., & Bezprozvanny, I. (2018). Calcium signaling and molecular mechanisms underlying neurodegenerative diseases. *Cell Calcium*, 70, 87–94. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2017.06.008>
- Pettan-Brewer, C., & Treuting, P. M. (2011). Practical pathology of aging mice. *Pathobiology of Aging & Age Related Diseases*, 1(1), 7202. <https://doi.org/10.3402/pba.v1i0.7202>
- Phadwal, K., Alegre-Abarrategui, J., Watson, A. S., Pike, L., Anbalagan, S., Hammond, E. M., ... Simon, A. K. (2012). A novel method for autophagy detection in primary cells: Impaired levels of macroautophagy in immunosenescent T cells. *Autophagy*, 8(4), 677–689. <https://doi.org/10.4161/auto.18935>
- Philosophe, B., & Miller, R. A. (1990). Diminished calcium signal generation in subsets of T lymphocytes that predominate in old mice. *Journal of Gerontology*, 45(3), B87-93. <https://doi.org/10.1093/geronj/45.3.b87>
- Pinchuk, L. M., & Filipov, N. M. (2008). Differential effects of age on circulating and splenic leukocyte populations in C57BL/6 and BALB/c male mice. *Immunity & Ageing*, 5(1), 1. <https://doi.org/10.1186/1742-4933-5-1>
- Plaut, M., Bubbers, J. E., & Henney, C. S. (1976). Studies of the mechanism of lymphocyte-mediated cytotoxicity. VII. Two stages in the T cell-mediated lytic cycle with distinct cation requirements. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 116(1), 150–155. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/812913>
- Plowden, J., Renshaw-Hoelscher, M., Gangappa, S., Engleman, C., Katz, J. M., & Sambhara, S. (2004). Impaired antigen-induced CD8 + T cell clonal expansion in aging is due to defects in antigen presenting cell function. *Cellular Immunology*, 229(2), 86–92. <https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2004.07.001>
- Pores-Fernando, A. T., & Zweifach, A. (2009). Calcium influx and signaling in cytotoxic T-lymphocyte lytic granule exocytosis. *Immunological Reviews*, 231(1), 160–173. <https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2009.00809.x>
- Prakriya, M., Feske, S., Gwack, Y., Srikanth, S., Rao, A., & Hogan, P. G. (2006). Orai1 is an essential pore subunit of the CRAC channel. *Nature*, 443(7108), 230–233. <https://doi.org/10.1038/nature05122>

- Prakriya, M., & Lewis, R. S. (2015). Store-operated calcium channels. *Physiological Reviews*, *95*(4), 1383–1436. <https://doi.org/10.1152/physrev.00020.2014>
- Proust, J. J., Filburn, C. R., Harrison, S. A., Buchholz, M. A., & Nordin, A. A. (1987). Age-related defect in signal transduction during lectin activation of murine T lymphocytes. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, *139*(5), 1472–1478. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3114367>
- Putney, J. W. (1986). A model for receptor-regulated calcium entry. *Cell Calcium*, *7*(1), 1–12. [https://doi.org/10.1016/0143-4160\(86\)90026-6](https://doi.org/10.1016/0143-4160(86)90026-6)
- Putney, J. W., & Tomita, T. (2012). Phospholipase C signaling and calcium influx. *Advances in Biological Regulation*, Vol. 52, pp. 152–164. <https://doi.org/10.1016/j.advenzreg.2011.09.005>
- Qi, Q., Zhang, D. W., Weyand, C. M., & Goronzy, J. J. (2014). Mechanisms shaping the naïve T cell repertoire in the elderly - Thymic involution or peripheral homeostatic proliferation? *Experimental Gerontology*, *54*, 71–74. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2014.01.005>
- Qu, B., Al-Ansary, D., Kummerow, C., Hoth, M., & Schwarz, E. C. (2011). ORAI-mediated calcium influx in T cell proliferation, apoptosis and tolerance. *Cell Calcium*, Vol. 50, pp. 261–269. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2011.05.015>
- Quinn, K. M., Fox, A., Harland, K. L., Russ, B. E., Li, J., Nguyen, T. H. O., ... La Gruta, N. L. (2018). Age-Related Decline in Primary CD8+ T Cell Responses Is Associated with the Development of Senescence in Virtual Memory CD8+ T Cells. *Cell Reports*, *23*(12), 3512–3524. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.05.057>
- Rana, A., Yen, M., Sadaghiani, A. M., Malmersjö, S., Park, C. Y., Dolmetsch, R. E., & Lewis, R. S. (2015). Alternative splicing converts STIM2 from an activator to an inhibitor of store-operated calcium channels. *Journal of Cell Biology*, *209*(5), 653–670. <https://doi.org/10.1083/jcb.201412060>
- Rasola, A., & Bernardi, P. (2011). Mitochondrial permeability transition in Ca(2+)-dependent apoptosis and necrosis. *Cell Calcium*, *50*(3), 222–233. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2011.04.007>
- Renkema, K. R., Li, G., Wu, A., Smithey, M. J., & Nikolich-Zugich, J. (2014). Two Separate Defects Affecting True Naive or Virtual Memory T Cell Precursors Combine To Reduce Naive T Cell Responses with Aging. *The Journal of Immunology*, *192*(1), 151–159. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1301453>
- Ritchie, M. F., Samakai, E., & Soboloff, J. (2012). STIM1 is required for attenuation of PMCA-mediated Ca²⁺ clearance during T-cell activation. *EMBO Journal*, *31*(5), 1123–1133. <https://doi.org/10.1038/emboj.2011.495>
- Roberts-Thomson, I. C., Whittingham, S., Youngchaiyud, U., & Mackay, I. R. (1974). Ageing, immune response, and mortality. *Lancet (London, England)*, *2*(7877), 368–370. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(74\)91755-3](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(74)91755-3)
- Roos, J., DiGregorio, P. J., Yeromin, A. V., Ohlsen, K., Lioudyno, M., Zhang, S., ... Stauderman, K. A. (2005). STIM1, an essential and conserved component of store-operated Ca²⁺ channel function. *The Journal of Cell Biology*, *169*(3), 435–445. <https://doi.org/10.1083/jcb.200502019>
- Rose, M. R. (1991). *Evolutionary biology of aging* (1. Auflage). Oxford University Press.
- Rossi, D. J., Bryder, D., Zahn, J. M., Ahlenius, H., Sonu, R., Wagers, A. J., & Weissman, I. L. (2005). Cell intrinsic alterations underlie hematopoietic stem cell aging. *Proceedings of*

- the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(26), 9194–9199. <https://doi.org/10.1073/pnas.0503280102>
- Rukavina, D., Laskarin, G., Rubesa, G., Strbo, N., Bedenicki, I., Manestar, D., ... Podack, E. R. (1998). Age-related decline of perforin expression in human cytotoxic T lymphocytes and natural killer cells. *Blood*, 92(7), 2410–2420. https://doi.org/10.1182/blood.v92.7.2410.2410_2410_2420
- Saleh, A. M., Vijayasathy, C., Masoud, L., Kumar, L., Shahin, A., & Kambal, A. (2003). Paraoxon induces apoptosis in EL4 cells via activation of mitochondrial pathways. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 190(1), 47–57. [https://doi.org/10.1016/s0041-008x\(03\)00126-1](https://doi.org/10.1016/s0041-008x(03)00126-1)
- Sallusto, F., Lenig, D., Förster, R., Lipp, M., & Lanzavecchia, A. (1999). Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. *Nature*, 401(6754), 708–712. <https://doi.org/10.1038/44385>
- Sarkadi, B., Tordai, A., Homolya, L., Scharff, O., & Gárdos, G. (1991). Calcium influx and intracellular calcium release in anti-CD3 antibody-stimulated and thapsigargin-treated human T lymphoblasts. *The Journal of Membrane Biology*, 123(1), 9–21. <https://doi.org/10.1007/BF01993958>
- Saxena, R. K., & Adler, W. H. (1999). Cytolytic activity of mitogen activated old and young mouse spleen cells against tumor target cells expressing high or low levels of Fas antigen. *Experimental & Molecular Medicine*, 31(3), 137–141. <https://doi.org/10.1038/emm.1999.23>
- Schatzmann, H. J. (1966). ATP-dependent Ca⁺⁺-extrusion from human red cells. *Experientia*, 22(6), 364–365. <https://doi.org/10.1007/bf01901136>
- Schuhmann, M. K., Stegner, D., Berna-Erro, A., Bittner, S., Braun, A., Kleinschnitz, C., ... Nieswandt, B. (2010). Stromal interaction molecules 1 and 2 are key regulators of autoreactive T cell activation in murine autoimmune central nervous system inflammation. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 184(3), 1536–1542. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0902161>
- Schwarz, E. C., Kummerow, C., Wenning, A. S., Wagner, K., Sappok, A., Wagershauser, K., ... Hoth, M. (2007). Calcium dependence of T cell proliferation following focal stimulation. *European Journal of Immunology*, 37(10), 2723–2733. <https://doi.org/10.1002/eji.200737039>
- Schwarz, E. C., Qu, B., & Hoth, M. (2013). Calcium, cancer and killing: The role of calcium in killing cancer cells by cytotoxic T lymphocytes and natural killer cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1833(7), 1603–1611. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2012.11.016>
- Shah, G. V., Rayford, W., Noble, M. J., Austenfeld, M., Weigel, J., Vamos, S., & Mebust, W. K. (1994). Calcitonin stimulates growth of human prostate cancer cells through receptor-mediated increase in cyclic adenosine 3',5'-monophosphates and cytoplasmic Ca²⁺ transients. *Endocrinology*, 134(2), 596–602. <https://doi.org/10.1210/endo.134.2.8299557>
- Shaw, P. J., & Feske, S. (2012). Regulation of lymphocyte function by ORAI and STIM proteins in infection and autoimmunity. *The Journal of Physiology*, 590(17), 4157–4167. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2012.233221>
- Shiku, H., Kisielow, P., Bean, M. A., Takahashi, T., Boyse, E. A., Oettgen, H. F., & Old, L. J. (1975). Expression of T cell differentiation antigens on effector cells in cell mediated cytotoxicity in vitro. Evidence for functional heterogeneity related to the surface

- phenotype of T cells. *Journal of Experimental Medicine*, 141(1), 227–241.
<https://doi.org/10.1084/jem.141.1.227>
- Sikora, E. (2015). Activation-induced and damage-induced cell death in aging human T cells. *Mechanisms of Ageing and Development*, 151, 85–92.
<https://doi.org/10.1016/j.mad.2015.03.011>
- Smithey, M. J., Renkema, K. R., Rudd, B. D., & Nikolich-Žugich, J. (2011). Increased apoptosis, curtailed expansion and incomplete differentiation of CD8+ T cells combine to decrease clearance of L. monocytogenes in old mice. *European Journal of Immunology*, 41(5), 1352–1364. <https://doi.org/10.1002/eji.201041141>
- Soboloff, J., Rothberg, B. S., Madesh, M., & Gill, D. L. (2012). STIM proteins: dynamic calcium signal transducers. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 13(9), 549–565.
<https://doi.org/10.1038/nrm3414>
- Solana, R., Pawelec, G., & Tarazona, R. (2006). Aging and Innate Immunity. *Immunity*, 24(5), 491–494. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2006.05.003>
- Sommerer, C., Meuer, S., Zeier, M., & Giese, T. (2012, September 8). Calcineurin inhibitors and NFAT-regulated gene expression. *Clinica Chimica Acta*, Vol. 413, pp. 1379–1386.
<https://doi.org/10.1016/j.cca.2011.09.041>
- Song, H. K., & Hwang, D. Y. (2017). Use of C57BL/6N mice on the variety of immunological researches. *Laboratory Animal Research*, 33(2), 119–123.
<https://doi.org/10.5625/lar.2017.33.2.119>
- Spaulding, C. C., Walford, R. L., & Effros, R. B. (1997). The accumulation of non-replicative, non-functional, senescent T cells with age is avoided in calorically restricted mice by an enhancement of T cell apoptosis. *Mechanisms of Ageing and Development*, 93(1–3), 25–33. [https://doi.org/10.1016/s0047-6374\(96\)01808-8](https://doi.org/10.1016/s0047-6374(96)01808-8)
- Srinivasan, M., & Frauwirth, K. A. (2009). Peripheral tolerance in CD8+ T cells. *Cytokine*, 46(2), 147–159. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2009.01.010>
- Starzl, T. E., Klintmalm, G. B., Porter, K. A., Iwatsuki, S., & Schröter, G. P. (1981). Liver transplantation with use of cyclosporin a and prednisone. *The New England Journal of Medicine*, 305(5), 266–269. <https://doi.org/10.1056/NEJM198107303050507>
- Steinmann, G. G., Klaus, B., & Müller-Hermelink, H.-K. (1985). The Involution of the Ageing Human Thymic Epithelium is Independent of Puberty. *Scandinavian Journal of Immunology*, 22(5), 563–575. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3083.1985.tb01916.x>
- Strehler, E. E., Caride, A. J., Filoteo, A. G., Xiong, Y., Penniston, J. T., & Enyedi, A. (2007). Plasma membrane Ca²⁺ ATPases as dynamic regulators of cellular calcium handling. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1099, 226–236.
<https://doi.org/10.1196/annals.1387.023>
- Strehler, E. E., & Zacharias, D. A. (2001). Role of alternative splicing in generating isoform diversity among plasma membrane calcium pumps. *Physiological Reviews*, Vol. 81, pp. 21–50. <https://doi.org/10.1152/physrev.2001.81.1.21>
- Surwit, R. S., Kuhn, C. M., Cochrane, C., McCubbin, J. A., & Feinglos, M. N. (1988). Diet-induced type II diabetes in C57BL/6J mice. *Diabetes*, 37(9), 1163–1167.
<https://doi.org/10.2337/diab.37.9.1163>
- Tamura, T., Kunimatsu, T., Yee, S.-T., Igarashi, O., Utsuyama, M., Tanaka, S., ... Nariuchi, H. (2000). Molecular mechanism of the impairment in activation signal transduction in CD4(+) T cells from old mice. *International Immunology*, 12(8), 1205–1215.
<https://doi.org/10.1093/intimm/12.8.1205>

- Taylor, R. C., & Dillin, A. (2011). Aging as an event of proteostasis collapse. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 3(5), 1–17. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a004440>
- Thiel, M., Lis, A., & Penner, R. (2013). STIM2 drives Ca²⁺ oscillations through store-operated Ca²⁺ entry caused by mild store depletion. *The Journal of Physiology*, 591(Pt 6), 1433–1445. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2012.245399>
- To, K. K.-W., Tsang, O. T.-Y., Leung, W.-S., Tam, A. R., Wu, T.-C., Lung, D. C., ... Yuen, K.-Y. (2020). Temporal profiles of viral load in posterior oropharyngeal saliva samples and serum antibody responses during infection by SARS-CoV-2: an observational cohort study. *The Lancet Infectious Diseases*, 0(0). [https://doi.org/10.1016/s1473-3099\(20\)30196-1](https://doi.org/10.1016/s1473-3099(20)30196-1)
- Toyama, B. H., & Hetzer, M. W. (2013, January). Protein homeostasis: Live long, won't prosper. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, Vol. 14, pp. 55–61. <https://doi.org/10.1038/nrm3496>
- Trapani, J. A., & Smyth, M. J. (2002). Functional significance of the perforin/granzyme cell death pathway. *Nature Reviews Immunology*, 2(10), 735–747. <https://doi.org/10.1038/nri911>
- Trebak, M., & Kinet, J.-P. (2019). Calcium signalling in T cells. *Nature Reviews Immunology*, 19(3), 154–169. <https://doi.org/10.1038/s41577-018-0110-7>
- Tsukada, M., & Ohsumi, Y. (1993). Isolation and characterization of autophagy-defective mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Letters*, 333(1–2), 169–174. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(93\)80398-E](https://doi.org/10.1016/0014-5793(93)80398-E)
- Tuljapurkar, S., Li, N., & Boe, C. (2000). A universal pattern of mortality decline in the G7 countries. *Nature*, 405(6788), 789–792. <https://doi.org/10.1038/35015561>
- Vaeth, M., Maus, M., Klein-Hessling, S., Freinkman, E., Yang, J., Eckstein, M., ... Feske, S. (2017). Store-Operated Ca²⁺ Entry Controls Clonal Expansion of T Cells through Metabolic Reprogramming. *Immunity*, 47(4), 664–679.e6. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2017.09.003>
- Vaeth, M., Yang, J., Yamashita, M., Zee, I., Eckstein, M., Knosp, C., ... Feske, S. (2017). ORAI2 modulates store-operated calcium entry and T cell-mediated immunity. *Nature Communications*, 8, 14714. <https://doi.org/10.1038/ncomms14714>
- Vallejo, A. N., Mueller, R. G., Hamel, D. L., Way, A., Dvergsten, J. A., Griffin, P., & Newman, A. B. (2011, July). Expansions of NK-like $\alpha\beta$ T cells with chronologic aging: Novel lymphocyte effectors that compensate for functional deficits of conventional NK cells and T cells. *Ageing Research Reviews*, Vol. 10, pp. 354–361. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2010.09.006>
- Varfolomeev, E. E., Schuchmann, M., Luria, V., Chiannikulchai, N., Beckmann, J. S., Mett, I. L., ... Wallach, D. (1998). Targeted disruption of the mouse Caspase 8 gene ablates cell death induction by the TNF receptors, Fas/Apo1, and DR3 and is lethal prenatally. *Immunity*, 9(2), 267–276. [https://doi.org/10.1016/s1074-7613\(00\)80609-3](https://doi.org/10.1016/s1074-7613(00)80609-3)
- Vaupel, J. W. (2010). Biodemography of human ageing. *Nature*, 464(7288), 536–542. <https://doi.org/10.1038/nature08984>
- Verkhatsky, A. (2007). Calcium and cell death. *Subcellular Biochemistry*, 45, 465–480. https://doi.org/10.1093/eurheartj/4.suppl_c.33
- Vig, M., & Kinet, J. P. (2009, January). Calcium signaling in immune cells. *Nature Immunology*, Vol. 10, pp. 21–27. <https://doi.org/10.1038/ni.f.220>

- Vig, M., Peinelt, C., Beck, A., Koomoa, D. L., Rabah, D., Koblan-Huberson, M., ... Kinet, J.-P. (2006). CRACM1 is a plasma membrane protein essential for store-operated Ca²⁺ entry. *Science (New York, N.Y.)*, *312*(5777), 1220–1223. <https://doi.org/10.1126/science.1127883>
- Wang, X., Wang, Y., Zhou, Y., Hendron, E., Mancarella, S., Andrade, M. D., ... Gill, D. L. (2014). Distinct Orai-coupling domains in STIM1 and STIM2 define the Orai-activating site. *Nature Communications*, *5*, 3183. <https://doi.org/10.1038/ncomms4183>
- Waterston, R. H., Lindblad-Toh, K., Birney, E., Rogers, J., Abril, J. F., Agarwal, P., ... Lander, E. S. (2002). Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome. *Nature*, *420*(6915), 520–562. <https://doi.org/10.1038/nature01262>
- Weiskopf, D., Weinberger, B., & Grubeck-Loebenstien, B. (2009, November). The aging of the immune system. *Transplant International*, Vol. 22, pp. 1041–1050. <https://doi.org/10.1111/j.1432-2277.2009.00927.x>
- Whisler, R. L., Beiqing, L., & Chen, M. (1996). Age-related decreases in IL-2 production by human T cells are associated with impaired activation of nuclear transcriptional factors AP-1 and NF-AT 1. *Cellular Immunology*, *169*(2), 185–195. <https://doi.org/10.1006/cimm.1996.0109>
- White, M. C., Holman, D. M., Boehm, J. E., Peipins, L. A., Grossman, M., & Henley, S. J. (2014). Age and cancer risk: a potentially modifiable relationship. *American Journal of Preventive Medicine*, *46*(3 Suppl 1), S7-15. <https://doi.org/10.1016/j.amepre.2013.10.029>
- Williams, R. T., Manji, S. S. M., Parker, N. J., Hancock, M. S., Van Stekelenburg, L., Eid, J.-P., ... Dziadek, M. A. (2001). Identification and characterization of the STIM (stromal interaction molecule) gene family: Coding for a novel class of transmembrane proteins. *Biochemical Journal*, *357*(3), 673–685. <https://doi.org/10.1042/0264-6021:3570673>
- Willinger, T., Freeman, T., Hasegawa, H., McMichael, A. J., & Callan, M. F. C. (2005). Molecular signatures distinguish human central memory from effector memory CD8 T cell subsets. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, *175*(9), 5895–5903. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.175.9.5895>
- Wu, M. M., Buchanan, J. A., Luik, R. M., & Lewis, R. S. (2006). Ca²⁺ store depletion causes STIM1 to accumulate in ER regions closely associated with the plasma membrane. *Journal of Cell Biology*, *174*(6), 803–813. <https://doi.org/10.1083/jcb.200604014>
- Zhan, Y., Carrington, E. M., Zhang, Y., Heinzl, S., & Lew, A. M. (2017). Life and Death of Activated T Cells: How Are They Different from Naïve T Cells? *Frontiers in Immunology*, *8*, 1809. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01809>
- Zhang, S. L., Yu, Y., Roos, J., Kozak, J. A., Deerinck, T. J., Ellisman, M. H., ... Cahalan, M. D. (2005). STIM1 is a Ca²⁺ sensor that activates CRAC channels and migrates from the Ca²⁺ store to the plasma membrane. *Nature*, *437*(7060), 902–905. <https://doi.org/10.1038/nature04147>
- Zheng, Y., Zha, Y., & Gajewski, T. F. (2008). Molecular regulation of T-cell anergy. *EMBO Reports*, *9*(1), 50–55. <https://doi.org/10.1038/sj.embor.7401138>
- Zhou, T., Edwards III, C. K., & Mountz, J. D. (1995). Prevention of age-related T cell apoptosis defect in CD2-fas-transgenic mice. *The Journal of Experimental Medicine*, *182*(1), 129–137. <https://doi.org/10.1084/jem.182.1.129>
- Zhou, X., Friedmann, K. S., Lyrmann, H., Zhou, Y., Schoppmeyer, R., Knörck, A., ... Hoth, M. (2018). A calcium optimum for cytotoxic T lymphocyte and natural killer cell

- cytotoxicity. *The Journal of Physiology*, 596(14), 2681–2698.
<https://doi.org/10.1113/JP274964>
- Zhou, Y., Mancarella, S., Wang, Y., Yue, C., Ritchie, M., Gill, D. L., & Soboloff, J. (2009). The short N-terminal domains of STIM1 and STIM2 control the activation kinetics of Orai1 channels. *The Journal of Biological Chemistry*, 284(29), 19164–19168.
<https://doi.org/10.1074/jbc.C109.010900>
- Zweifach, A. (2000). Target-cell contact activates a highly selective capacitative calcium entry pathway in cytotoxic T lymphocytes. *The Journal of Cell Biology*, 148(3), 603–614.
<https://doi.org/10.1083/jcb.148.3.603>
- Zweifach, A., & Lewis, R. S. (1995). Slow calcium-dependent inactivation of depletion-activated calcium current. Store-dependent and -independent mechanisms. *Journal of Biological Chemistry*, 270(24), 14445–14451. <https://doi.org/10.1074/jbc.270.24.14445>

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	englischer Begriff	deutscher Begriff
AG	research group	Arbeitsgruppe
AM	acetoxymethyl ester	Acetoxymethylester
AMPK	adenosine monophosphate-activated protein kinase	adenosinmonophosphataktivierte Kinase
APC	antigen-presenting cell	antigenpräsentierende Zelle
APS	ammonium persulfate	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	adenosine triphosphate	Adenosintriphosphat
AUC	area under the curve	Fläche unter der Kurve
β -ME	β -mercaptoethanol	β -Mercaptoethanol
BAPTA	1,2-bis(o-aminophenoxy)ethane-N,N,N',N'-tetraacetic acid	1,2-bis(o-aminophenoxy)ethan-N,N,N',N'-tetraessigsäure
BCA	bicinchoninic acid	Bicinchoninsäure
BSA	bovine serum albumin	bovines Serumalbumin
BZR	B cell receptor	B-Zellrezeptor
Ca ²⁺	calcium	Kalzium
[Ca ²⁺]	calcium concentration	Kalziumkonzentration
[Ca ²⁺] _{ER}	calcium concentration of the endoplasmic reticulum	Kalziumkonzentration des endoplasmatischen Retikulums
[Ca ²⁺] _{ext}	external calcium concentration	extrazelluläre Kalziumkonzentration
[Ca ²⁺] _{int}	internal calcium concentration	intrazelluläre Kalziumkonzentration
[Ca ²⁺] _{mito}	calcium concentration of the mitochondrion	mitochondriale Kalziumkonzentration
CAD	calcium activating domain	Kalzium aktivierende Domäne
CaM	calmodulin	Calmodulin
CAMKK2	calcium/calmodulin-dependent protein kinase kinase 2	Kalzium/Calmodulinabhängige Proteinkinasekinase 2
CaN	calcineurin	Calcineurin
CD	cluster of differentiation	Differenzierungsmarker
cDNA	complementary DNA	komplementäre DNA
CFSE	carboxyfluorescein succinimidyl ester	Carboxyfluoresceinsuccinimidylester
CMA	concanamycin A	Concanamycin A
CsA	cyclosporine A	Cyclosporin A
DAG	1,2-diacylglycerol	1,2-Diacylglycerin
DC	dendritic cell	dendritische Zelle
DEPC	diethyl pyrocarbonate	Diethyldicarbonat
DMSO	dimethyl sulfoxide	Dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonucleic acid	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	deoxynucleoside triphosphate	Desoxyribonukleosidtriphosphate
DTT	dithiothreitol	Dithiothreitol
ECL	electrochemiluminescence	Elektrochemilumineszenz
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	ethylene glycol-bis(β -aminoethyl ether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid	Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
EPC-10	Electronic Power Control-10	elektronischer Leistungsregler-10
ER	endoplasmic reticulum	endoplasmatisches Retikulum
FACS	fluorescence-activated cell sorting	fluoreszenzaktivierte Zellsortierung
FasL	Fas ligand	Fas-Ligand
FasR	Fas receptor	Fas-Rezeptor
FCS	fetal calve serum	fötales Kälberserum
FRET	Förster resonance energy transfer	Förster-Resonanzenergietransfer
FSC	forward scatter	Vorwärtsstreulicht
G418	geneticin	Geneticin
GAPDH	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GFP	green fluorescent protein	grün fluoreszierendes Protein
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid	4-(2-Hydroxyethyl)-1-Piperazinylethansulfonsäure
HPRT1	hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase 1	Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase 1
HSC	hematopoietic stem cell	hämatopoetischer Stammzelle

I _{CRAC}	calcium release activated calcium current	kalziumfreisetzungsaktivierter Kalziumstrom
IL-2	interleukin-2	Interleukin-2
IgG	immunoglobulin G	Immunglobulin G
IP ₃	inositol trisphosphate	Inositoltrisphosphat
IS	immunological synapse	immunologische Synapse
K _d	dissociation constant	Dissoziationskonstante
LAT	linker of activated T cells	Verknüpfers aktivierter T-Zellen
Lck	lymphocyte kinase	T-zellspezifische Tyrosinkinase
MAPK	mitogen-activated protein kinase	mitogenaktivierte Proteinkinase
MHC	major histocompatibility complex	Haupthistokompatibilitätskomplex
mRNA	messenger ribonucleic acid	Botenribonukleinsäure
mTORC1	mechanistic target of rapamycin complex 1	mechanistisches Ziel des Rapamycinkomplex
NaN ₃	sodium azide	Natriumazid
NCX	sodium-calcium exchanger	Natrium-Kalzium-Austauscher
NFAT	nuclear factor of activated t cells	nukleärer Faktor aktivierter T-Zellen
NFκB	nuclear factor ,kappa-light-chain-enhancer' of activated B cells	nukleärer Faktor, der an den Promotor leichter κ-Ketten von B-Zellen bindet
NK	natural killer cell	natürliche Killerzelle
Oligo-dT	oligo deoxythymidine	Oligodesoxythymidin
PBS	phosphate-buffered saline	phosphatgepufferte Salzlösung
PMCA	plasma membrane Ca ²⁺ ATPase	Plasmamembran Ca ²⁺ -ATPase
Pen/Strep	penicillin + streptomycin	Penicillin + Streptomycin
PIP ₂	phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate
PKC	protein kinase C	Proteinkinase C
PLC	phospholipase C	Phospholipase C
PMCA	plasma membrane calcium ATPase	Plasmamembran Kalzium-ATPase
PVDF	polyvinylidene fluoride	Polyvinylidenfluorid
qRT-PCR	quantitative real-time polymerase chain reaction	quantitative Echtzeitpolymerasekettenreaktion
RFP	red fluorescent protein	rot fluoreszierendes Protein
RIPA-Puffer	radioimmunoprecipitation assay buffer	Radioimmunoprezipitationsassaypuffer
RNA	riboneucleic acid	Riboneukleinsäure
RT	room temperature	Raumtemperatur
SARS-CoV-2	severe acute respiratory syndrome coronavirus 2	schweres akutes Atemwegssyndrom Coronavirus 2
SDS	sodium dodecyl sulfate	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS polyacrylamide gel electrophoresis	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese
SEM	standard error of the mean	Standardfehler
SERCA	sarco-/endoplasmic reticulum calcium ATPase	sarko-/endoplasmatisches Retikulum Kalzium-ATPase
SSC	side scatter	Seitwärtsstreulicht
SOCE	store-operated calcium entry	speichergesteuerter Kalziumeinstrom
SPF	specific pathogen free	spezifisch pathogenfrei
STIM	stromal interaction molecule	stromales Interaktionsmolekül
TBP	TATA-binding protein	TATA-Box bindendes Protein
TBS	tris-buffered saline	trisgepufferte Salzlösung
TBST	tris-buffered saline containing Tween	trisgepufferte Salzlösung mit Tween
T _{CM}	central memory T cell	zentrale Gedächtnis-T-Zelle
T _E	effector T cell	Effektor-T-Zelle
T _{EM}	effector memory T cell	Effektor-Gedächtnis-T-Zelle
TEMED	tetramethylethylenediamine	N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamin
TF	transcription factor	Transkriptionsfaktor
TG	thapsigargin	Thapsigargin
T _N	naive T cell	naïve T-Zelle
TZR	T cell receptor	T-Zellrezeptor
ZAP-70	ζ-chain associated protein kinase 70	ζ-kettenassoziierte Proteinkinase 70

Tabelle 12: Liste in dieser Arbeit verwendeter Abkürzungen

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Speichergesteuerter Kalziueinstrom (SOCE) durch Stromal Interaction Molecule-(STIM)-aktivierte Orai-Kanäle.....	5
Abbildung 2: Immunologische Synapse zwischen CD8 ⁺ T-Zelle und Zielzelle.	11
Abbildung 3: Gatingstrategie für die durchflusszytometrische Analyse.	33
Abbildung 4: Schematische Darstellung der in dieser Arbeit verwendeten Ca ²⁺ -Imagingprotokolle.	35
Abbildung 5: Schaubild der in Zytotoxizitätsassays untersuchten Beeinflussungen der Funktionalität CD8 ⁺ T-Zellen.....	38
Abbildung 6: Altersbedingte Unterschiede zwischen jungen und alten weiblichen C57BL/6J Mäusen.	41
Abbildung 7: Die CD8 ⁺ T-Zellsubtypenverteilung verschiebt sich bei C57BL/6J Mäusen altersbedingt von mehr naiven (T _N) zu mehr zentralen (T _{CM}) und Effektor-Gedächtnis-T-Zellen (T _{EM}).	44
Abbildung 8: Unstimulierte CD8 ⁺ T-Zellen alter Mäuse zeigen reduzierte Thapsigargin-vermittelte Ca ²⁺ -Signale im kombinierten Protokoll.	47
Abbildung 9: Unstimulierte CD8 ⁺ T-Zellen alter Mäuse zeigen reduzierte Thapsigargin-vermittelte Ca ²⁺ -Signale im Re-Additionsprotokoll.	48
Abbildung 10: Unstimulierte CD8 ⁺ T-Zellen alter Mäuse weisen verminderte T-Zellrezeptor-vermittelte Ca ²⁺ -Signale auf.	50
Abbildung 11: Unstimulierte CD8 ⁺ T-Zellen alter Mäuse zeigen reduzierte Thapsigargin-vermittelte Ca ²⁺ -Signale im kombinierten Protokoll mit näherungsweise physiologischer extrazellulärer Ca ²⁺ -Konzentration.....	51
Abbildung 12: Unstimulierte CD8 ⁺ T-Zellen alter Mäuse zeigen reduzierte Thapsigargin-vermittelte Ca ²⁺ -Signale im Re-Additionsprotokoll mit näherungsweise physiologischer extrazellulärer Ca ²⁺ -Konzentration.....	52
Abbildung 13: Stimulierte CD8 ⁺ T-Zellen alter Mäuse zeigen reduzierte Thapsigargin-vermittelte Ca ²⁺ -Signale im kombinierten Protokoll.	54
Abbildung 14: Stimulierte CD8 ⁺ T-Zellen alter Mäuse zeigen reduzierte Thapsigargin-vermittelte Ca ²⁺ -Signale im Re-Additionsprotokoll.	55
Abbildung 15: Stimulierte CD8 ⁺ T-Zellen alter Mäuse weisen verminderte T-Zellrezeptor-vermittelte Ca ²⁺ -Signale auf.....	56
Abbildung 16: Stimulierte CD8 ⁺ T-Zellen alter Mäuse zeigen reduzierte Thapsigargin-vermittelte Ca ²⁺ -Signale im kombinierten Protokoll mit näherungsweise physiologischer extrazellulärer Ca ²⁺ -Konzentration.....	57
Abbildung 17: Stimulierte CD8 ⁺ T-Zellen alter Mäuse zeigen reduzierte Thapsigargin-vermittelte Ca ²⁺ -Signale im Re-Additionsprotokoll mit näherungsweise physiologischer extrazellulärer Ca ²⁺ -Konzentration.....	58
Abbildung 18: Gesortete CD8 ⁺ zentrale und Effektor-Gedächtnis-T-Zellen alter Mäuse zeigen reduzierte Thapsigargin-vermittelte Ca ²⁺ -Signale im kombinierten Protokoll.	60
Abbildung 19: Gesortete CD8 ⁺ zentrale und Effektor-Gedächtnis-T-Zellen alter Mäuse zeigen reduzierte Thapsigargin-vermittelte Ca ²⁺ -Signale im Re-Additionsprotokoll.....	61
Abbildung 20: CD8 ⁺ T-Zellen alter Mäuse zeigen eine beschleunigte Ca ²⁺ -Extrusion.	63
Abbildung 21: CD8 ⁺ T-Zellen weisen eine altersbedingt erhöhte mRNA-Expression der PMCA4 auf.....	64

Abbildung 22: Unstimulierte CD8 ⁺ T-Zellen zeigen einen altersbedingt verminderten, IP ₃ -vermittelten I _{CRAC}	65
Abbildung 23: Altersbedingte Veränderungen der mRNA- und Proteinexpressionen von Orais und STIMs.	66
Abbildung 24: Die <i>in vitro</i> Stimulation von CD8 ⁺ T-Zellen aus Mäusen beider Altersgruppen mit anti-CD3/anti-CD28-gekoppelten Aktivatorbeads verursacht eine drastische Reduktion der mRNA-Level für sämtliche untersuchten Orais und STIMs.	67
Abbildung 25: Unstimulierte CD8 ⁺ T-Zellen junger und alter Mäuse weisen kaum zytotoxische Funktion gegen die murine P815-Krebszelllinie auf.	69
Abbildung 26: Stimulierte murine CD8 ⁺ T-Zellen zeigen eine altersbedingt gesteigerte Kinetik beim Abtöten verschiedener Krebszelllinien.	70
Abbildung 27: Die Unterschiede in der zytotoxischen Funktion zwischen CD8 ⁺ T-Zellen junger und alter Mäuse heben sich mit zunehmender <i>in vitro</i> Stimulationsdauer auf.	73
Abbildung 28: Altersbedingte Veränderungen der mRNA- und Proteinexpressionen wichtiger Proteine für die zytotoxische Funktion von CD8 ⁺ T-Zellen.	75
Abbildung 29: Die beiden prädominierenden Subtypen aktivierter CD8 ⁺ T-Zellen, zentrale (T _{CM}) und Effektor-Gedächtnis-Zellen (T _{EM}), zeigen altersbedingte Steigerungen der Kinetik ihrer zytotoxischen Funktion.	77
Abbildung 30: Die beiden prädominierenden Subtypen aktivierter CD8 ⁺ T-Zellen, zentrale und Effektor-Gedächtnis-T-Zellen, zeigen altersbedingte Steigerungen der mRNA-Expressionslevel zytotoxizitätsrelevanter Proteine.	78
Abbildung 31: CD8 ⁺ T-Zellen alter Mäuse weisen eine geringere Beeinflussung ihrer zytotoxischen Funktion durch das den lytischen Granula-vermittelten Zytotoxizitätsmechanismus inhibierende Agenz Concanamycin A auf.	80
Abbildung 32: Die Lyse von P815-Zellen durch CD8 ⁺ T-Zellen alter Mäuse wird geringfügig weniger durch die Inhibition des Fas-Ligand-vermittelten Zytotoxizitätsmechanismus reduziert als die Lyse durch CD8 ⁺ T-Zellen junger Mäuse.	82
Abbildung 33: Die Lyse von E.G7-Zellen durch CD8 ⁺ T-Zellen alter Mäuse wird geringfügig weniger durch die Inhibition des Fas-Ligand-vermittelten Zytotoxizitätsmechanismus reduziert als die Lyse durch CD8 ⁺ T-Zellen junger Mäuse.	84
Abbildung 34: Das Immunsuppressivum Cyclosporin A reduziert die Zytotoxizität CD8 ⁺ T-Zellen alter, aber nicht junger Mäuse erheblich, ohne Einfluss auf die Differenzierung zu nehmen.	86
Abbildung 35: CD8 ⁺ T-Zellen alter Mäuse weisen eine marginal geringfügigere Beeinflussung ihrer zytotoxischen Funktion durch steigende externe Ca ²⁺ -Konzentrationen auf.	88
Abbildung 36: CD8 ⁺ T-Zellen alter Mäuse weisen eine marginal geringfügigere Beeinflussung ihrer zytotoxischen Funktion durch abnehmende externe Ca ²⁺ -Konzentrationen auf.	89

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Liste der verwendeten Reagenzien	18
Tabelle 2: Liste der verwendeten Kits	18
Tabelle 3: Liste der fluorophorgekoppelten FACS-Antikörper	18
Tabelle 4: Liste der in Western Blots verwendeten Primärantikörper	19
Tabelle 5: In Western Blots verwendeter Sekundärantikörper	19
Tabelle 6: Liste der in Echtzeitzytotoxizitätsassays verwendeten Antikörper	19
Tabelle 7: Liste der verwendeten QIAGEN qRT-PCR-Primer	20
Tabelle 8: Liste der fürs Ca^{2+} -Imaging verwendeten Ringerlösungen	20
Tabelle 9: Liste der fürs Whole-Cell-Patch-Clamp verwendeten	21
Tabelle 10: Liste verwendeter Geräte	24
Tabelle 11: cDNA-Amplifikationsprotokoll	30
Tabelle 12: Liste in dieser Arbeit verwendeter Abkürzungen	129

Publikationen

als Erstautor

Orai, STIM, and PMCA contribute to reduced calcium signal generation in CD8⁺ T cells of elderly mice; Angenendt A, Steiner R, Knörck A, Schwär G, Konrad M, Krause E, Lis A; Aging (Albany NY); 2020

STIM-Orai Channels and Reactive Oxygen Species in the Tumor Microenvironment; Frisch J, Angenendt A, Hoth M, Prates Roma L, Lis A; Cancers (Basel); 2019

als Co-Autor

The neuropeptide receptor calcitonin receptor-like (CALCRL) is a potential therapeutic target in acute myeloid leukemia; Angenendt L, Bormann E, Pabst C, Alla V, Görlich D, Braun L, Dohlich K, Schwöppe C, Bohlander SK, Arteaga MF, Wethmar K, Hartmann W, Angenendt A, Kessler T, Mesters RM, Stelljes M, Rothenberg-Thurley M, Spiekermann K, Hébert J, Sauvageau G, Valk PJM, Löwenberg B, Serve H, Müller-Tidow C, Lenz G, Wörmann BJ, Sauerland MC, Hiddemann W, Berdel WE, Krug U, Metzeler KH, Mikesch JH, Herold T, Schliemann C; Leukemia; 2019

IL-17C-mediated innate inflammation decreases the response to PD-1 blockade in a model of Kras-driven lung cancer; Ritzmann F, Jungnickel C, Vella G, Kamyschnikow A, Herr C, Li D, Menger MM, Angenendt A, Hoth M, Lis A, Bals R, Beisswenger C; Sci Rep; 2019

A calcium optimum for cytotoxic T lymphocyte and natural killer cell cytotoxicity; J Physiol. 2018 Jan 25; Zhou X, Friedmann KS, Lyrmann H, Zhou Y, Schoppmeyer R, Knörck A, Mang S, Hoxha C, Angenendt A, Backes CS, Mangerich C, Zhao R, Cappello S, Schwär G, Hässig C, Neef M, Bufe B, Zufall F, Kruse K, Niemeyer BA, Lis A, Qu B, Kummerow C, Schwarz EC, Hoth M; J Physiol; 2018

Aus datenschutzrechtlichen Gründen wird der Lebenslauf in der elektronischen Fassung der Dissertation nicht veröffentlicht.

Danksagungen

Allem voran gilt meine Dankbarkeit Prof. Dr. Markus Hoth für die Möglichkeit meine Doktorarbeit in seiner AG in der Biophysik der Universität des Saarlandes in Homburg ausführen zu können. Sein Verständnis für und seine Fairness gegenüber seinen Angestellten sind sondergleichen und werden nur von seiner fachlichen Kompetenz übertroffen.

Weiterhin möchte ich meiner Betreuerin, Dr. Annette Lis, für ihre Hilfe während meiner Arbeit, ihre Geduld mit mir und ihr Vertrauen in mein Können danken. Ich wünsche ihr weiterhin viel Erfolg mit diesem spannenden Themengebiet.

Meinen Freunden und Mitdoktoranden Arne Knörck, Maik Konrad, Daniel Langfermann, Florian Bochen, Phillip Knapp und Sven Kappel danke ich für ihren beratenden Beistand und ihre Freundschaft, die mit Gold nicht aufzuwiegen ist. Vielen Dank, dass ich in diesem nicht unkomplizierten Lebensabschnitt immer auf euch zählen konnte.

Besonders dankbar bin ich meinen Brüdern Tristan und Linus Angenendt für ihren persönlichen Beistand, erinnerungswürdige Urlaube, Geburtstage und Wochenenden und letzterem zusätzlich für Diskussionen und Ratschläge in wissenschaftlichen Belangen.

Meinen Eltern Maria und Heiner Angenendt gebühren mein Dank und meine Anerkennung für ihre jahrelange Unterstützung, dafür dass sie ohne Wenn und Aber immer für mich da waren und auch immer noch sind.

Meiner Patentante Karola Roser möchte ich für ihre Unterstützung während meines Studiums sowie sämtlicher vorheriger und hoffentlich auch noch daran anschließender Lebensabschnitte danken.

Die letzte, aber in keinem Fall geringste Danksagung gebührt Lisa Lieblang, die mich und sämtliche während der Arbeit aufgekommenen persönlichen und professionellen Probleme und Schwierigkeiten hautnah miterleben musste und trotzdem nie aufgehört hat, für mich da zu sein.