

Aus dem Bereich der Biophysik  
Theoretische Medizin und Biowissenschaften  
der Medizinischen Fakultät  
der Universität des Saarlandes, Homburg/Saar

# **Gesteigerte Zytotoxizität muriner CD8<sup>+</sup> T-Zellen im Alter**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades  
eines Doktors der Naturwissenschaften  
der Medizinischen Fakultät  
der Universität des Saarlandes  
2023

vorgelegt von  
Dorina Zöphel  
Geb. am 31.05.1987 in Oelsnitz/V.

Tag der Promotion: 12.01.2024  
Dekan: Prof. Dr. med. Michael D. Menger  
Berichterstatter: Prof. Dr. Markus Hoth  
Prof. Dr. Adolfo Cavalié  
Prof. Dr. Christine Falk

# Literaturverzeichnis

Zusammenfassung .....	1
Summary .....	3
<b>1 Einleitung .....</b>	<b>5</b>
1.1 Angeborene und adaptive Immunität .....	5
1.2 Zytotoxische CD8 <sup>+</sup> T-Zellen .....	6
1.2.1 Aktivierung und Differenzierung .....	7
1.2.2 Effektorfunktionen .....	8
1.2.2.1 Granula-Exozytose-vermittelte Zytotoxizität .....	8
1.2.2.2 Rezeptor-vermittelte Zytotoxizität .....	9
1.2.2.3 Zytokin-Sekretion.....	10
1.3 Immunoseneszenz .....	11
1.3.1 CD8 <sup>+</sup> T-Zellen im Alter.....	12
1.4 Zielsetzung .....	14
<b>2 Material und Methoden .....</b>	<b>16</b>
2.1 Materialien.....	16
2.1.1 Reagenzien .....	16
2.1.2 Kits .....	17
2.1.3 Antikörper .....	17
2.1.4 Primer .....	18
2.1.5 Lösungen .....	18
2.1.6 Verbrauchsmaterialien.....	19
2.1.7 Geräte .....	19
2.1.8 Software.....	20
2.1.9 Mäuse .....	20
2.1.10 Zelllinien .....	21
2.2 Methoden.....	21
2.2.1 Isolation muriner CD8 <sup>+</sup> T-Zellen aus Splenozyten .....	21
2.2.2 Zellkultur .....	22
2.2.2.1 Stimulation von CD8 <sup>+</sup> T-Zellen aus C57BL/6J Wildtyp-Mäusen.....	22
2.2.2.2 Stimulation von CD8 <sup>+</sup> T-Zellen aus OT-I Mäusen.....	22
2.2.2.3 Kultivierung muriner Tumorzelllinien .....	22
2.2.2.4 Generierung einer stabilen E.G7 pCasper Zelllinie .....	23
2.2.3 Echtzeit-Zytotoxizitätsassay .....	23
2.2.4 Fluoreszenzmikroskopischer Zytotoxizitätsassay .....	24

2.2.4.1 Calcein-basierte Einzelzell-Analysen.....	24
2.2.4.2 pCasper-basierte Einzelzell-Analysen.....	25
2.2.5 Durchflusszytometrische Analysen .....	25
2.2.5.1 Subtypenverteilung von CD4 <sup>+</sup> und CD8 <sup>+</sup> T-Zellen.....	25
2.2.5.2 Expression von CD49d in CD8 <sup>+</sup> Gedächtnis-T-Zellen.....	26
2.2.5.3 Verteilung der variablen TZR-Regionen V <sub>α</sub> 2- und V <sub>β</sub> 5 auf OT-I CD8 <sup>+</sup> T-Zellen .....	26
2.2.5.4 CFSE Proliferationsassay .....	27
2.2.5.5 Degranulationsassay .....	27
2.2.5.6 Bead-basierter Multiplex-Assay (LEGENDplex™).....	28
2.2.6 Durchflusszytometrische Sortierung .....	28
2.2.6.1 Sortierung muriner Splenozyten aus C57BL/6J Wildtyp-Mäusen .....	28
2.2.6.2 Sortierung stimulierter CD8 <sup>+</sup> T-Zellen.....	29
2.2.7 Interne Totalreflexionsfluoreszenzmikroskopie (TIRFM) .....	29
2.2.8 Immunzytochemie und SIM ( <i>Structured Illumination Microscopy</i> ).....	29
2.2.9 qRT-PCR.....	30
2.2.10 Statistische Auswertung .....	30
<b>3 Ergebnisse .....</b>	<b>31</b>
3.1 Phänotypische und funktionelle Charakterisierung zytotoxischer CD8 <sup>+</sup> T-Zellen aus jungem und alten C57BL/6J Mäusen .....	31
3.1.1 CD8 <sup>+</sup> T-Zellen aus alten Mäusen zeigen eine schnellere Zytotoxizität gegen verschiedene Tumorzelllinien .....	31
3.1.2 Verringerte Proliferation und Viabilität von CD8 <sup>+</sup> T-Zellen aus alten Mäusen.....	35
3.1.3 Die Lyse-Kinetik von CD8 <sup>+</sup> T-Zellen junger Mäuse verändert sich mit zunehmender Stimulationsdauer.....	36
3.1.4 Altersbedingte Veränderungen in der CD8 <sup>+</sup> T-Zell-Subtypenverteilung .....	37
3.1.5 Veränderungen in der CD8 <sup>+</sup> T-Zell-Subtypenverteilung tragen nicht maßgeblich zur schnelleren Lyse-Kinetik im Alter bei .....	40
3.1.6 Die zelleigene Fähigkeit zur Degranulation lytischer Granula ist im Alter unverändert .....	44
3.1.7 Erhöhte Expression von Granzym B und Perforin in CD8 <sup>+</sup> T-Zellen aus alten Mäusen .....	47
3.1.8 Einfluss variierender Interleukin-2 Konzentrationen auf die Zytotoxizität von CD8 <sup>+</sup> T-Zellen aus jungem und alten Mäusen .....	50
3.1.9 Die erhöhte zytotoxische Aktivität muriner CD8 <sup>+</sup> T-Zellen beginnt im mittleren Lebensalter .	54
3.2 Etablierung eines heterozygoten OT-I Mausmodells zur Untersuchung der antigenspezifischen Immunantwort von CD8 <sup>+</sup> T-Zellen im Alter.....	56
3.2.1 Verringerte Inzidenz von Splenomegalien in OT-I <sup>+/-</sup> Mäusen.....	56

3.2.2 Die Expression des transgenen T-Zell-Rezeptors bleibt in alten OT-I <sup>+/-</sup> Mäusen erhalten.....	57
3.2.3 Verteilung der T-Zell-Populationen in Splenozyten von jungen und alten OT-I <sup>+/-</sup> Mäusen .....	58
3.2.4 Proliferation und Differenzierung von CD8 <sup>+</sup> T-Zellen aus jungen und alten OT-I <sup>+/-</sup> Mäusen nach antigenspezifischer Aktivierung .....	60
3.2.5 OT-I <sup>+/-</sup> Modell bestätigt altersbedingte Veränderungen in der zytotoxischen Effektorfunktion von CD8 <sup>+</sup> T-Zellen .....	62
3.2.6 CD8 <sup>+</sup> T-Zellen aus alten OT-I <sup>+/-</sup> Mäusen induzieren einen schnellen nekrotischen Zielzelltod	64
3.2.7 Altersbedingte Veränderungen in der Expression zytotoxischer Effektormoleküle finden auf transkriptioneller Ebene statt .....	66
3.2.8 Einfluss des zelleigenen Zytokinprofils auf die zytotoxische Funktion von CD8 <sup>+</sup> T-Zellen .....	66
<b>4 Diskussion .....</b>	<b>69</b>
4.1 Einfluss zellintrinsischer Alterationen auf die zytotoxische Funktion muriner .....	70
CD8 <sup>+</sup> T-Zellen im Alter.....	70
4.1.1 Altersbedingte Veränderungen im Phänotyp der CD8 <sup>+</sup> T-Zell-Subpopulationen .....	71
4.1.2 Altersbedingte Veränderungen in der Granula-Exozytose-vermittelten Zytotoxizität.....	73
4.1.3 Einfluss von Interleukin-2 auf die zytotoxische Funktion von CD8 <sup>+</sup> T-Zellen im Alter .....	75
4.1.4 Veränderungen der Zytotoxizität von CD8 <sup>+</sup> T-Zellen im mittleren Lebensalter .....	77
4.2 Verwendung eines heterozygoten OT-I Mausmodells für Alterungsstudien zur antigenspezifischen CD8 <sup>+</sup> T-Zell-Immunität .....	78
4.2.1 Antigen spezifisches OT-I <sup>+/-</sup> Modell bestätigt erhöhte Zytotoxizität von CD8 <sup>+</sup> T-Zellen im Alter.....	79
4.2.2 Die hohe zytotoxische Effizienz von CD8 <sup>+</sup> T-Zellen im Alter hat einen nekrotischen.....	81
Zielzelltod zur Folge.....	81
4.3 Fazit.....	82
<b>5 Literaturverzeichnis .....</b>	<b>83</b>
<b>6 Anhang .....</b>	<b>101</b>
6.1 Abbildungsverzeichnis .....	101
6.2 Tabellenverzeichnis.....	102
6.3 Abkürzungsverzeichnis .....	103
Publikationen.....	105
Danksagung.....	106

## Zusammenfassung

Das Altern geht mit einer tiefgreifenden Veränderung der Immunfunktionen einher. Ein steigendes Risiko für Krebserkrankungen und schwere Krankheitsverläufe bei Infektionen machen deutlich, welche dramatischen Auswirkungen eine Beeinträchtigung des Immunsystems auf die Lebensqualität und die Mortalität im Alter haben kann. Zytotoxische CD8<sup>+</sup> T-Zellen besitzen die Fähigkeit zur Ausbildung eines immunologischen Gedächtnisses und spielen als Teil der adaptiven Immunantwort eine Schlüsselrolle bei der Erkennung und Abtötung virusinfizierter und entarteter Zellen. CD8<sup>+</sup> T-Zellen nutzen für die Eliminierung ihrer Zielzellen zwei wesentliche Zytotoxizitätsmechanismen: Die über Liganden-Rezeptor-Interaktion induzierte Apoptose und die Exozytose-vermittelte Freisetzung lytischer Granula. In der Vergangenheit wurden bereits eine Vielzahl von quantitativen und funktionalen Veränderungen von CD8<sup>+</sup> T-Zellen im Alter identifiziert, die zu einer verminderten Immunantwort gegenüber neuen Erregern und Tumorzellen beitragen. Dennoch sind die zugrunde liegenden Mechanismen bis heute nur unvollständig verstanden. Insbesondere die Abgrenzung zelleigener Alterationen vom Einfluss der alternden Mikroumgebung bleibt eine Herausforderung, ist für die Optimierung immuntherapeutischer Ansätze jedoch von zentraler Bedeutung. Trotz der mehrfach beschriebenen Beeinträchtigungen der CD8<sup>+</sup> T-Zell-Immunität im Alter, ist über Alterationen in der zytotoxischen Effektorfunktion der Zellen bemerkenswert wenig bekannt.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde daher untersucht welchen Einfluss zelleigene Veränderungen auf die Zytotoxizität von murinen CD8<sup>+</sup> T-Zellen im Alter nehmen. Fluoreszenzbasierte Echtzeit-Zytotoxizitätsassays auf Populations- und Einzelzellebene lieferten ein überraschendes Ergebnis: CD8<sup>+</sup> T-Zellen aus gealterten C57BL/6J Wildtyp-Mäusen zeigen nach polyklonaler *in vitro* Stimulation eine signifikant schnellere Kinetik der Zielzellyse. Dies gilt nicht nur für die Gesamt-CD8<sup>+</sup> T-Zellpopulation, sondern trifft ebenfalls auf die zytotoxische Aktivität zentraler Gedächtnis- und Effektor-Gedächtnis-T-Zellen zu. Diese Ergebnisse legen nahe, dass es im Alter zu einem veränderten Phänotyp beider CD8<sup>+</sup> Gedächtnis-Populationen kommt, der mit einer erhöhten zytotoxischen Effizienz der Zellen einhergeht. Die weitere Analyse der zugrundeliegenden Zytotoxizitätsmechanismen verdeutlichte, dass die schnelle Zielzellyse durch CD8<sup>+</sup> T-Zellen im Alter weniger auf Alterationen in Rezeptor-vermittelten Signalwegen, sondern vielmehr auf eine veränderte Granula-Exozytose-vermittelte Zytotoxizität zurückzuführen ist. Während durch die Beurteilung des Degranulationsverhaltens mittels Durchflusszytometrie und TIRF-Mikroskopie keine altersbedingte Veränderung in der Exozytose lytischer Granula nachgewiesen werden konnte, zeigte die Quantifizierung der in den lytischen Vesikeln enthaltenen Effektormoleküle eine im Alter signifikant erhöhte Expression von Perforin und Granzym B. Die Ergebnisse mit *in vitro* stimulierten murinen CD8<sup>+</sup> T-Zellen lieferten somit erstmals deutliche Hinweise darauf, dass die altersbedingt unzureichende Eliminierung von

Erregern und Tumorzellen *in vivo*, nicht durch zelleigene Alterationen in der zytotoxischen Funktion von CD8<sup>+</sup> T-Zellen bedingt ist.

Im Gegensatz zu der hier durchgeführten Antikörper-basierten polyklonalen Stimulation der CD8<sup>+</sup> T-Zellen, erfolgt die Aktivierung des T-Zell-Rezeptors unter physiologischen Bedingungen antigenspezifisch. Die Bestätigung der aus den Wildtyp-Mäusen gewonnenen Erkenntnisse erforderte daher die Untersuchung der zytotoxischen Funktion nach antigenspezifischer *in vitro* Aktivierung. OT-I Mäuse exprimieren T-Zell-Rezeptoren auf CD8<sup>+</sup> T-Zellen die spezifisch das über den MHC-I Komplex präsentierte Peptid OVA<sub>257-264</sub> des Modellantigens Ovalbumin erkennen und zählen zu den am häufigsten verwendeten transgenen Mausmodellen für die Untersuchung der antigenspezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zell-Immunität. Der per se immundefiziente Phänotyp der Mäuse hat jedoch eine deutliche Reduktion der Lebenserwartung zur Folge, wodurch die üblicherweise eingesetzte homozygote OT-I Linie für Alterungsstudien weitestgehend ungeeignet ist. Um diese Limitation zu überwinden, wurde im Rahmen dieser Arbeit eine heterozygote OT-I Linie etabliert, was den Gesundheitsstatus der Mäuse deutlich verbesserte und erstmals die Charakterisierung der Effektorfunktionen antigenspezifischer OT-I CD8<sup>+</sup> T-Zellen im Alter ermöglichte.

Die kinetische Analyse der Zielzellyse im antigenspezifischen *in vitro* Modell bestätigte die hohe zytotoxische Effizienz von CD8<sup>+</sup> T-Zellen im Alter. Eine erhöhte Expression von Perforin und Granzym in CD8<sup>+</sup> T-Zellen aus alten OT-I Mäusen unterstützt die Annahme, dass die gesteigerte Zytotoxizität der Zellen durch zellintrinsische Alterationen in der Expression lytischer Effektormoleküle bedingt ist. Die Generierung einer OVA-exprimierenden Tumorzelllinie mit stabiler Expression des Apoptose-Reporters pCasper ermöglichte eine detailliertere Analyse des Zielzelltodes. Dabei zeigte sich, dass antigenspezifische CD8<sup>+</sup> T-Zellen aus alten OT-I Mäusen bereits wenige Minuten nach Zielzellkontakt einen nekrotischen Zelltod verursachen. Offenbar führen die hohen Perforin-Konzentrationen im Alter zu einer erheblichen Schädigung der Membranintegrität von Zielzellen, wodurch die Granzym-vermittelte Apoptose durch eine schnelle Induktion von Nekrosen ersetzt wird.

Die in dieser Arbeit aufgezeigten zelleigenen Veränderungen der zytotoxischen Effektorfunktion von CD8<sup>+</sup> T-Zellen im Alter könnten sich für den alternden Organismus als vorteilhaft oder nachteilig erweisen und sollten im Rahmen immunmodulatorischer Ansätze nicht unberücksichtigt bleiben. Die Möglichkeit heterozygote OT-I Mäuse bis ins hohe Alter zu halten und die Entwicklung typischer altersbedingter Veränderungen ihrer CD8<sup>+</sup> T-Zellen, macht sie zu einem attraktiven Modell mit breitem Anwendungsfeld für zukünftige *in vitro* und *in vivo* Alterungsstudien.

## Summary

Aging is accompanied by pronounced changes in immune cell functions. Higher incidences of cancer and a higher risk for severe infectious diseases underline the dramatic impact of impaired immunity on the life quality and mortality of elderly individuals. As part of the adaptive immune response, cytotoxic CD8<sup>+</sup> T cells are key players in recognizing and killing virus-infected and tumor cells. Target cell elimination by cytotoxic CD8<sup>+</sup> T cell can be induced by two major pathways: Induction of apoptosis by ligand-receptor interactions or exocytosis-mediated release of lytic granules. Various quantitative and functional alterations of CD8<sup>+</sup> T cells have been identified that contribute to the impaired immune response to novel pathogens and cancer cells during aging. Nevertheless, the underlying mechanisms are still incompletely understood. In particular, separating cell-intrinsic alterations from the aged environments' influence remains challenging but is crucial for optimizing immunotherapeutic approaches. Despite the commonly described defects in CD8<sup>+</sup> T cells' immunity in old age, remarkably little is known about alterations in the cytotoxic behavior itself.

Therefore, this work addressed the impact of cell-intrinsic alterations on the cytotoxic effector function of murine CD8<sup>+</sup> T cells during aging. Fluorescence-based real-time cytotoxicity assays at population and single-cell level revealed a surprising result: CD8<sup>+</sup> T cells from elderly C57BL/6J wild-type mice exhibit significantly faster kinetics of target cell lysis after polyclonal *in vitro* stimulation. This is true for the total CD8<sup>+</sup> T cell population and applies to the cytotoxic activity of central memory and effector memory T cells. These findings suggest a yet undescribed altered phenotype of both CD8<sup>+</sup> memory populations, associated with an increased cytotoxic capacity with age. Further analysis of the underlying cytotoxic mechanisms revealed that alterations in the granule exocytosis pathway decisively contribute to increased cytotoxicity during aging. While evaluation of degranulation ability by flow cytometry and TIRF microscopy did not show any age-related changes in the exocytosis of lytic granules, quantification of the lytic granules' effector molecules revealed significantly increased expression of perforin and granzyme B in CD8<sup>+</sup> T cells from elderly mice. Together, these findings provide evidence that the age-related inadequate elimination of pathogens and tumor cells *in vivo* is not caused by cell-intrinsic alterations in CD8<sup>+</sup> T cells' cytotoxic effector function.

In contrast to antibody-based polyclonal *in vitro* stimulation as used for CD8<sup>+</sup> T cells from wild-type mice, physiological activation of T cell receptors requires the recognition of a specific antigen. Thus, investigating the cytotoxic behavior of aged CD8<sup>+</sup> T cells after antigen-specific *in vitro* stimulation was necessary to confirm the recent findings in a more physiological context. OT-I mice express T cell receptors on CD8<sup>+</sup> T cells specific for the OVA<sub>257-264</sub> peptide and are among the most widely used transgenic mouse models to study antigen-specific CD8<sup>+</sup> T cell immunity.

Unfortunately, using a homozygous OT-I model in aging research is challenging due to increased mortality and general health issues of these per se immunodeficient mice.

Within the scope of this work, a heterozygous OT-I model was established, which improved the health status of the mice and enabled the characterization of antigen-specific CD8<sup>+</sup> T cells even in old age. Kinetic analysis of antigen-directed target cell lysis confirmed the high cytotoxic efficiency of CD8<sup>+</sup> T cells with age. Increased expression of perforin and granzyme B in CD8<sup>+</sup> T cells from elderly OT-I mice supports the notion that increased cytotoxicity is caused by cell-intrinsic alterations in the expression of lytic effector molecules. Generating an OVA-expressing tumor cell line that stably expresses the apoptosis reporter pCasper allowed a more detailed analysis of target cell death, uncovering that antigen-specific CD8<sup>+</sup> T cells from elderly OT-I mice induce necrotic cell death within minutes after target cell contact. Age-related high perforin concentrations substantially disrupt the targets cells' membrane integrity, replacing granzyme-mediated apoptosis by rapid necrosis induction.

The cell-intrinsic alterations of CD8<sup>+</sup> T cells uncovered within the present work might prove to be beneficial or detrimental for the aging organism and are worth considering in immunomodulatory approaches. The possibility of keeping heterozygous OT-I mice into old age and the development of typical age-related changes of their CD8<sup>+</sup> T cells opens a widely applicable tool for future *in vitro* and *in vivo* aging studies.

## 1 Einleitung

Der demographische Wandel führt zu einer stetig wachsenden Anzahl älterer Menschen in unserer Gesellschaft und stellt das Gesundheitssystem und die Wissenschaft vor neue Herausforderungen. Dabei geht es nicht allein um die Verlängerung der Lebenserwartung bei Krankheit, sondern vielmehr um den Erhalt der Gesundheit und der Lebensqualität im Alter. Veränderungen des Immunsystems tragen wesentlich zur Erhöhung der Morbidität in dieser Bevölkerungsgruppe bei. Eine effiziente Immunantwort setzt ein komplexes Zusammenspiel verschiedener Abwehrmechanismen voraus. Störungen in diesen Interaktionen können Tumorerkrankungen, schwere Verläufe bei Infektionskrankheiten aber auch chronische Entzündungsreaktionen und Autoimmunität zur Folge haben. Ein umfassendes Verständnis der zugrundeliegenden Prozesse ist für die Entwicklung neuer immuntherapeutischer Strategien von essenzieller Bedeutung.

### 1.1 Angeborene und adaptive Immunität

Grundsätzlich lässt sich die körpereigene Immunantwort in die angeborene und die adaptive (erworbene) Immunität unterteilen. Das angeborene Immunsystem stellt die erste Abwehr von Krankheitserregern dar und umfasst physikalische Barrieren wie Haut und Mukosa, humorale Komponenten wie antimikrobielle Peptide und eine Zell-vermittelte Immunantwort durch natürliche Killer-Zellen, Granulozyten, dendritische Zellen, Monozyten und Makrophagen (Clark & Kupper, 2005; Riera Romo et al., 2016). Zellen des angeborenen Immunsystems reagieren innerhalb weniger Minuten bis Stunden, die Pathogen-Erkennung erfolgt unspezifisch anhand charakteristischer Struktur motive (PAMPs, *pathogen-associated molecular patterns*). Die Aktivierung über entsprechende Rezeptoren (PRRs, *pattern recognition receptors*) führt abhängig vom Zelltyp, zur sofortigen Eliminierung infizierter Zellen, zur Phagozytose und anschließender Antigen-Präsentation und/oder zur Ausschüttung inflammatorischer Zytokine (Riera Romo et al., 2016; Smith et al., 2019).

Die adaptive Immunität besteht ebenfalls aus einer zellulären und einer humoralen Immunantwort, vermittelt durch B- und T-Zellen. Die Etablierung der adaptiven Immunantwort dauert 1-2 Wochen (Netea et al., 2019; Pennock et al., 2013), ist antigenspezifisch und ermöglicht durch die Ausbildung eines immunologischen Gedächtnisses eine langanhaltende Immunität durch schnelle Reaktion bei erneutem Antigen-Kontakt. Anders als PRPs auf Zellen des angeborenen Immunsystems, entstehen B- und T-Zell-Rezeptoren durch somatische V(D)J-Rekombination von verschiedenen Gensegmenten. Dies führt zu einer enormen Vielfalt unterschiedlicher Rezeptoren mit einzigartiger Antigen-Spezifität (Bonilla & Oettgen, 2010; Clark & Kupper, 2005).

B-Zell-Rezeptoren bestehen aus membrangebundenen Immunglobulinen, nach entsprechendem Antigen-Kontakt differenzieren die B-Zellen zu Antikörper-sezernierenden Plasmazellen aus.

T-Zell-Rezeptoren (TZR) binden hingegen nicht direkt an Antigene, sondern an prozessierte Peptidfragmente des Antigens die von MHC-Molekülen (*major histocompatibility complex*) auf der Zelloberfläche präsentiert werden. Trotz vergleichbarer Mechanismen der TZR-Aktivierung, können T-Zellen je nach Subtyp sehr unterschiedliche Effektorfunktionen erfüllen. Diese reichen von direkter zytotoxischer Aktivität, durch die infizierte oder entartete Zellen eigenständig eliminiert werden können, bis hin zur Regulation von Immunantworten durch Ausschüttung pro- oder anti-inflammatorischer Zytokine (Bonilla & Oettgen, 2010). Obwohl häufig als getrennte Systeme betrachtet, verdeutlicht das zunehmende Verständnis immunregulatorischer Mechanismen das synergistische Zusammenspiel der angeborenen und adaptiven Immunität. Antigenpräsentierende Zellen (APCs) des angeborenen Immunsystems initiieren nicht nur die Aktivierung und Expansion von B- und T-Zellen, die Ausschüttung von Chemokinen ermöglicht zudem die Rekrutierung weiterer Immunzellen (Chang & Beatty, 2020; Clark & Kupper, 2005). Die Sekretion von Zytokinen durch APCs, NK-, B- und T-Zellen führt zur wechselseitigen Modulation von Immunantworten und ist essentiell für die Aufrechterhaltung der Immunhomöostase (Belardelli & Ferrantini, 2002; Wu et al., 2014; Zingoni et al., 2005).

### 1.2 Zytotoxische CD8<sup>+</sup> T-Zellen

T-Zellen werden anhand funktionaler Unterschiede und der Expression immunphänotypischer Oberflächenmarker (CD, *Cluster of Differentiation*) in zytotoxische T-Zellen, T-Helfer-Zellen und regulatorische T-Zellen unterteilt. Alle T-Zellen exprimieren den TZR-Co-Rezeptor CD3, zytotoxische T-Zellen exprimieren zudem den Co-Rezeptor CD8, T-Helfer-Zellen zeichnen sich durch die Expression von CD4 aus. T-Zellen reifen im Thymus heran und durchlaufen während ihrer Entwicklung verschiedene Differenzierungsstadien. Die aus dem Knochenmark hämatogen in den Thymus eingewanderten multipotenten CD34<sup>+</sup> hämatopoetischen Stammzellen, exprimieren als frühe, doppelt-negative Thymozyten weder T-Zell-Rezeptoren noch die Oberflächenmarker CD3, CD4 und CD8 (Anderson et al., 1996; Schmitt et al., 1995). Während der weiteren Differenzierung erfolgt die T-Zell-Spezifizierung einschließlich des Gen-Rearrangements für die  $\alpha$ - und  $\beta$ -Ketten des TZR und der gleichzeitigen Expression von CD4 und CD8 (doppelt-positive Thymozyten). In diesem Stadium findet die positive Selektion der Thymozyten nach Bindungsaffinität des T-Zell-Rezeptors an den MHC-Komplex statt. Zellen, die eine ausreichend stabile TZR-MHC-Bindung aufweisen, differenzieren durch Herunterregulation von CD8 oder CD4 zu einfach positiven Thymozyten aus. Durch negative Selektion werden autoreaktive Thymozyten entfernt (Anderson et al., 1996; Takada & Jameson, 2009), die reifen CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> Zellen wandern als naive T-Zellen (T<sub>N</sub>) in die Blutbahn und lymphatische Organe, wo sie auf ihre MHC-assoziierten Antigene treffen. Die polymorphen MHC-Moleküle lassen sich anhand ihrer Peptid-Interaktionen in zwei Gruppen einteilen. MHC-I-Moleküle werden von fast allen kernhaltigen Zellen exprimiert und präsentieren vor allem Tumorantigene oder virale und parasitäre Peptide die aktiv in

der Zelle synthetisiert werden oder in das Zytosol gelangen (Germain & Margulies, 1993; Moore et al., 1988). MHC-Klasse-II-Moleküle werden von antigenpräsentierenden Zellen wie Makrophagen und dendritischen Zellen exprimiert und präsentieren phagozytierte und lysosomal degradierte Peptide (Castellino & Germain, 1995; Germain & Margulies, 1993). Zytotoxische CD8<sup>+</sup> T-Zellen erkennen MHC-I-präsentierte Peptide, MHC-II-präsentierte Antigene werden von CD4<sup>+</sup> T-Zellen erkannt.

### 1.2.1 Aktivierung und Differenzierung

Die Bindung des T-Zell-Rezeptors an ein MHC-assoziiertes Antigen hat die Aktivierung einer komplexen Signalkaskade zur Folge, die über verschiedene Membranproteine, Adaptermoleküle und „*Second Messenger*“ die Transkription zahlreicher, an der T-Zell-Aktivierung und -Funktion beteiligter, Gene initiiert. Der TZR-Komplex besteht aus den  $\alpha$ - und  $\beta$ -Ketten des T-Zell-Rezeptors die mit den CD3-Untereinheiten  $\delta$ ,  $\gamma$ ,  $\epsilon$  und  $\zeta$  assoziiert sind. Diese beinhalten Immunrezeptor-Tyrosin-basierte Aktivierungsmotive (ITAMs) die durch die Protein-Tyrosin-Kinasen Lck und Fyn phosphoryliert werden und so die Bindung und Aktivierung der ZAP70 Kinase ermöglichen (Hwang et al., 2020). ZAP70 phosphoryliert das Transmembranprotein LAT (*linker for activation of T cells*), was zur Rekrutierung weiterer Signalmoleküle führt, die unter anderen an den Aktivierungskaskaden des Ca<sup>2+</sup>-IP<sub>3</sub>-NFAT (*nuclear factor of activated T cells*), des MAPK (mitogen-activated protein kinase) - und des NF- $\kappa$ B (*nuclear factor- $\kappa$ B*) - Signalweges beteiligt sind (Brownlie & Zamoyska, 2013; Conley et al., 2016; Courtney et al., 2018). Die daraus resultierende Translokation und Aktivierung der entsprechenden Transkriptionsfaktoren führt zur Expression verschiedener Zytokine und Effektormoleküle, die essenziell für die Proliferation, Differenzierung und Funktion der Zelle sind. Die Initiation von Effektorfunktionen, die klonale Expansion und Ausbildung langlebiger Gedächtnispopulationen erfordert neben der TZR-MHC-Bindung zwei weitere Aktivierungssignale, die der Ligandenbindung an den Kostimulatorischen Rezeptor CD28 und die Stimulation durch pro-inflammatorische Zytokine wie IL-12 und IFN- $\alpha$  (Borowski et al., 2007; Mescher et al., 2006). Die Proliferation der aktivierten CD8<sup>+</sup> T-Zellen führt zur Generierung antigenspezifischer Effektorpopulationen, die über die Blutbahn in entzündliches Gewebe migrieren und infizierte oder entartete Zellen beseitigen. In der darauffolgenden Kontraktionsphase sterben 90-95% der Effektor-T-Zellen durch Apoptose-induzierende Signalwege (Badovinac et al., 2002; Obar & Lefrançois, 2010; Pennock et al., 2013). Die zurückbleibenden, antigenspezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen differenzieren zu Gedächtnis-T-Zellen und ermöglichen so die schnelle Re-Aktivierung bei erneutem Antigen-Kontakt. Anhand immunphänotypischer und funktioneller Merkmale lassen sich diese in Zentrale Gedächtnis-T-Zellen (T<sub>CM</sub>, *central memory T cells*) und Effektor-Gedächtnis-T-Zellen (T<sub>EM</sub>, *effector memory T cells*) unterteilen (Sallusto et al., 1999). T<sub>CM</sub> sind charakterisiert durch eine starke Expression der Adhäsionsmoleküle CD44 und CD62L und einem hohen Proliferationspotential nach Antigen-Kontakt. T<sub>EM</sub> exprimieren wenig CD62L und zeichnen sich durch

eine schnelle Initiierung der zytotoxischen Effektorfunktion bei eingeschränkter Proliferationsfähigkeit aus (Obar & Lefrançois, 2010; Pennock et al., 2013; M. A. Williams & Bevan, 2007). Ob CD8<sup>+</sup> T-Zellen zu kurzlebigen Effektorzellen oder langlebigen T<sub>CM</sub> und T<sub>EM</sub> differenzieren, ist von zahlreichen Faktoren abhängig. Die Intensität des TZR-Signals, die Sekretion von Zytokinen und gewebespezifischen Faktoren beeinflussen das Transkriptionsprofil und entscheiden somit über das Differenzierungsschicksal einer T-Zelle (Conley et al., 2016; Hwang et al., 2020; Pennock et al., 2013; M. A. Williams & Bevan, 2007).

### 1.2.2 Effektorfunktionen

Die Hauptfunktion zytotoxischer CD8<sup>+</sup> T-Zellen liegt in der Abtötung infizierter und entarteter Zellen. Die Fähigkeit zu Apoptose-Induktion, der geordneten Selbsteliminierung von Zielzellen, ist essenziell für die Aufrechterhaltung der Gewebe- und Immunhomöostase. Die zugrundeliegenden Prozesse sind vielfältig und in ihrer Komplexität bis heute nicht vollständig aufgeklärt. Grundsätzlich verfügen CD8<sup>+</sup> T-Zellen über zwei Mechanismen ihrer zytotoxischen Funktion: Eine über Liganden-Rezeptor-Interaktion induzierte Zytotoxizität und die Exozytose-vermittelte Freisetzung lytischer Granula (Abbildung 1).

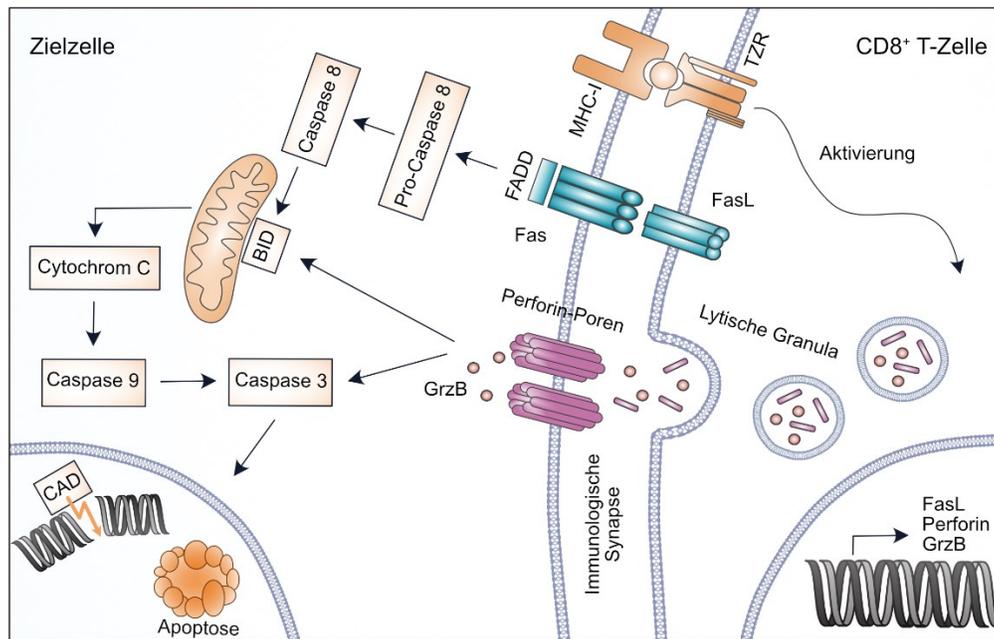
#### 1.2.2.1 Granula-Exozytose-vermittelte Zytotoxizität

Wird eine Zielzelle von einer CD8<sup>+</sup> T-Zelle erkannt, führt dies zur Ausbildung einer „immunologischen Synapse“ (IS), vermittelt durch die Bindung des TZR and den MHC-Komplex und die Bindung von LFA-1 (*lymphocyte function-associated antigen 1*) an ICAM-1 (*intercellular adhesion molecule 1*) auf der Zielzelloberfläche (Huppa & Davis, 2003). Dieser stabile Kontakt führt zur Polarisierung der CD8<sup>+</sup> T-Zelle und einer Reorganisation des Zytoskeletts. Das Mikrotubuli-organisierende Zentrum (MTOC, *microtubule organizing centre*) bewegt sich in Richtung Plasmamembran wodurch sekretorische Lysosomen, die „lytischen Granula“, entlang der Tubuli in Richtung Zielzelle transportiert werden (Stinchcombe & Griffiths, 2007). Die Hauptkomponenten lytischer Granula sind Perforin und verschiedene Granzyme. Perforin verursacht durch Bindung an Phosphorylcholin-Kopfgruppen und Polymerisation die Bildung von Poren in der Plasmamembran von Zielzellen (Smyth & Trapani, 1998). Die strukturelle und funktionelle Ähnlichkeit von Perforin zu dem Poren-bildenden Komplementprotein C9 führte zu der ursprünglichen Annahme, dass CD8<sup>+</sup> T-Zellen ihre Zielzellen allein durch die Schädigung der Plasmamembran lysieren (Shinkai et al., 1988; Tschopp et al., 1986). Inzwischen ist sicher, dass Perforin für den Exozytose-vermittelten Zielzelltod zwar unerlässlich, die Freisetzung von Granzymen jedoch Voraussetzung für die nachfolgende Apoptose-Induktion ist (Abbildung 1). Granzyme sind Serinproteasen, die eine Vielzahl von Proteinsubstraten spalten, was entweder direkt oder indirekt zur DNA-Fragmentierung und Apoptose der Zelle führt (Russell & Ley, 2002). In Mäusen wurden bisher elf, im Menschen fünf Granzyme mit unterschiedlicher Substratspezifität identifiziert (Stinchcombe and Griffiths 2007, Cullin and Martin 2008). Granzym B ist aufgrund der Abundanz und funktionalen

Relevanz bisher am besten charakterisiert (Cullen and Martin 2007, Fang and Zhang 2005). Die zytotoxische Wirkung von Granzym B beruht auf der Aktivierung von Caspasen, was die Proteolyse weiterer an der Caspase-Kaskade beteiligten Substrate zur Folge hat. So führt die Aktivierung der Nuklease CAD (*caspase-activated DNase*) durch Spaltung ihres Inhibitors zur Fragmentierung der DNA (Cullen & Martin, 2008; Fan & Zhang, 2005; Russell & Ley, 2002). Die Granzym B-vermittelte Initiation der Caspase-Kaskade erfolgt dabei entweder direkt, durch Spaltung der Caspasen 3 und 8 oder indirekt, durch Spaltung von BID (*BH3 interacting domain death agonist*), was die Permeabilisierung der mitochondrialen Membran, die Freisetzung von Cytochrom C in das Cytosol und somit die Aktivierung der Caspase-Kaskade zur Folge hat (Cullen & Martin, 2008; Fan & Zhang, 2005). Die genauen Mechanismen der Granzym-Aufnahme in die Zielzelle wurden lange Zeit kontrovers diskutiert (Barry & Bleackley, 2002; Russell & Ley, 2002). Auch wenn bisher noch nicht vollständig verstanden, ist die Annahme, dass Perforin Poren in der Plasmamembran der Zielzelle bildet durch die Granzyme in das Zytosol gelangen, weitgehend akzeptiert (Ivanova et al., 2022; Leung et al., 2017; Lopez et al., 2013). Theorien, bei denen Perforin und Granzyme von der Zielzelle endozytiert und anschließend aus intrazellulären Vesikeln freigesetzt werden sind strittig, aber ebenfalls bis heute vertreten (Gordy & He, 2012; Ivanova et al., 2022; Kurschus et al., 2008; X. Liu & Lieberman, 2020).

### 1.2.2.2 Rezeptor-vermittelte Zytotoxizität

Neben der Freisetzung lytischer Granula, ist die Apoptose-Induktion über Todesrezeptoren ein weiterer, wesentlicher Zytotoxizitätsmechanismus von CD8<sup>+</sup> T-Zellen. Die Interaktion des Fas-Rezeptors (CD95) auf Zielzellen mit seinem Liganden (FasL, CD178) auf CD8<sup>+</sup> T-Zellen spielt hierbei wohl die bedeutendste Rolle (Abbildung 1). Fas ist ein Typ-I Transmembranprotein der Tumornekrosefaktor-Rezeptor (TNF-R)-Familie mit einer zytoplasmatischen Todesdomäne (Volpe et al., 2016). Die Bindung des Fas-Liganden, einem Typ-II Transmembranprotein der entsprechenden TNF-Zytokin-Familie, führt zur Rekrutierung des Adaptermoleküls FADD (*Fas-associated death domain*) und der Formierung des Apoptose-induzierenden Signalkomplexes DISC (*death-inducing signaling complex*) um die Rezeptor-Todesdomäne (Strasser et al., 2009; Volpe et al., 2016; Wajant, 2002). Dieser beinhaltet die Initiator-Caspase 8 wodurch die Effektor-Caspasen 3 und 7 entweder direkt oder über die BID-initiierte Freisetzung von Cytochrom C aus dem Mitochondrium aktiviert werden (Hao & Mak, 2010; Wajant, 2002). Neben der Eliminierung infizierter und entarteter Zellen, ist die Todesrezeptor-vermittelte Zytotoxizität ein essenzieller Mechanismus für die Aufrechterhaltung der T-Zell-Homöostase. Die Fas-FasL-induzierte Apoptose schützt den Organismus vor autoreaktiven Zellen und ermöglicht die kontrollierte Beseitigung aktivierter T-Zellen während der Immunantwort (Krammer, 2000; Peter et al., 2015).



**Abbildung 1. Zytotoxizitätsmechanismen von CD8<sup>+</sup> T-Zellen.** Die Bindung des T-Zell-Rezeptors an ein MHC-I assoziiertes Antigen führt zur Ausbildung einer immunologischen Synapse zwischen Zielzelle und CD8<sup>+</sup> T-Zelle. Zur Induktion des Zielzelltodes nutzen CD8<sup>+</sup> T-Zellen zwei wesentliche Zytotoxizitätsmechanismen: Die Exozytose lytischer Granula und die Aktivierung des Todes-Rezeptors Fas. Die Granula-Exozytose vermittelte Zytotoxizität basiert auf der Freisetzung der in den lytischen Vesikeln enthaltenen Effektormoleküle Perforin und Granzym B. Perforin verursacht die Bildung von Poren in der Plasmamembran der Zielzelle wodurch Granzym B in das Zytosol gelangt und über Aktivierung der Caspase-Kaskade die Apoptose der Zielzelle induziert. Die Bindung des Fas-Liganden auf CD8<sup>+</sup> T-Zellen an den Fas-Rezeptor auf der Zielzelle führt zur Rekrutierung des Adaptermoleküls FADD, was ebenfalls die Aktivierung der Caspase-Kaskade zur Folge hat. Die dadurch in aktivierter Form vorliegende Nuklease CAD induziert durch DNA-Fragmentierung den apoptotischen Zielzelltod. MHC-I (*major histocompatibility complex*); TZR (T-Zell-Rezeptor); GrzB (Granzym B); FasL (Fas-Ligand); FADD (*Fas-associated death domain*); BID (*BH3 interacting domain death agonist*); CAD (*caspase-activated DNase*).

### 1.2.2.3 Zytokin-Sekretion

Die Sekretion pro- und anti-inflammatorischer Zytokine gehört zu den wesentlichen Effektorfunktionen aktivierter Immunzellen. Während der adaptiven Immunantwort zählen CD4<sup>+</sup> T-Helfer-Zellen zu den Hauptproduzenten von Zytokinen, die durch charakteristische Sekretionsprofile funktional in verschiedene Subpopulationen, wie Th1-, Th2-, Th9-, Th17- und regulatorische T-Zellen (Treg), unterteilt werden (Wan & Flavell, 2009). Auch CD8<sup>+</sup> T-Zellen zeichnen sich durch Unterschiede in der Zytokin-Expression aus, deren Muster vergleichbar mit dem von CD4<sup>+</sup> T-Zellen ist. CD8<sup>+</sup> T-Zellen mit hoher Sekretion von IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  und IL-2 werden als Tc1-Zellen definiert. Tc2-Zellen produzieren überwiegend IL-4, IL-6 und IL-10, Tc9-Zellen IL-9 und Tc17-Zellen IL-17, IL-21 und IL-22 (Mittrücker et al., 2014; Mosmann et al., 1997; Yu et al., 2013). Vor allem Tc1-Zellen zeichnen sich durch eine hohe Zytotoxizität aus, aber auch Tc2-Zellen eliminieren ihre Zielzellen über Perforin/Granzym- und Fas/FasL-vermittelte Signalwege (Mosmann et al., 1997; Sad et al., 1995; Yu et al., 2013). Tc9- und Tc17-Zellen zeigen hingegen kaum

zytotoxische Aktivität. Sie können die antitumorale Immunantwort sowohl positiv als auch negativ beeinflussen und werden mit Autoimmunerkrankungen und Allergien in Verbindung gebracht (Huber et al., 2009; Lu et al., 2014; Lückel et al., 2020; Visekruna et al., 2013). Die funktionelle Klassifizierung von CD8<sup>+</sup> T-Zellen anhand ihres Zytokinmusters ist im Vergleich zu CD4<sup>+</sup> T-Zellen weit weniger verbreitet, gewinnt jedoch aufgrund der klinischen Relevanz zunehmend an Aufmerksamkeit. Auch wenn der Fähigkeit zur Expression unterschiedlicher Zytokinprofile eine wesentliche, immunregulatorische Bedeutung zukommt, zeigen CD8<sup>+</sup> T-Zellen, anders als CD4<sup>+</sup> T-Zellen, eine starke Präferenz zur Differenzierung in Tc1-Zellen (Mosmann et al., 1997). Somit exprimiert der überwiegende Anteil der CD8<sup>+</sup> Effektor-T-Zellen große Mengen an IL-2 und IFN- $\gamma$ , Zytokine mit direktem Einfluss auf die zytotoxische Funktion der Zellen (Bhat et al., 2017; Janas et al., 2005). Neben der Beteiligung an Proliferation und Differenzierung von CD8<sup>+</sup> T-Zellen, vermittelt IL-2 die Expression von Granzymen, Perforin und IFN- $\gamma$  (Janas et al., 2005; Liao et al., 2013; Ross & Cantrell, 2018). IFN- $\gamma$  spielt eine wichtige Rolle bei der Migration der CD8<sup>+</sup> T-Zellen zum Entzündungsort und wird mit einer erhöhten Zytotoxizität der Zellen in Verbindung gebracht (Bhat et al., 2017; Tau et al., 2001).

### 1.3 Immunoseneszenz

Während des Alterns werden die Funktionen des Immunsystems auf vielschichtige Weise beeinträchtigt. Ein erhöhtes Risiko für die Entstehung von Krebserkrankungen, schwere Verläufe bei Infektionen und ein verminderter Schutz nach Impfungen sind nur einige der Folgen. Der unter dem Begriff „Immunoseneszenz“ zusammengefasste Alterungsprozess betrifft sowohl Zellen des angeborenen als auch des adaptiven Immunsystems und beeinflusst somit ebenfalls die gegenseitige Modulation der Immunantworten. So führen Veränderungen in der Aktivierung von Toll-like-Rezeptoren auf Makrophagen und dendritischen Zellen einerseits zu Beeinträchtigungen in der eigenen phagozytischen Funktion und Eliminierung von Krankheitserregern und Tumorzellen (Fulop et al., 2013; Plowden et al., 2004; Weiskopf et al., 2009). Andererseits trägt die eingeschränkte Aufnahme von Antigenen in Kombination mit einer verringerten Expression von MHC-II-Molekülen im Alter (Plowden et al., 2004; Weiskopf et al., 2009) zu einer reduzierten T-Zell-Aktivierung bei. Die verminderte Anzahl naiver T-Zellen durch Thymusinvolution verstärkt die unzureichende Antwort des adaptiven Immunsystems gegen neue Erreger (Cunha et al., 2020). Die fortwährende Antigenexposition im Verlauf des Lebens und die zunehmende Unfähigkeit der effektiven Beseitigung von Pathogenen, hat eine stetige Stimulation der Immunzellen zur Folge. Dies führt letztlich zu einer tiefgreifenden Dysregulation von Immunantworten, wobei einige Effektorfunktionen herunterreguliert und andere verstärkt werden (Pinti et al., 2016). Insbesondere die erhöhte Expression pro-inflammatorischer Zytokine wird mit chronischen Entzündungsprozessen assoziiert, die die Karzinogenese fördern (Fulop et al., 2013) und zur Entstehung typischer Alterserkrankungen wie Alzheimer, Arteriosklerose oder Arthritis beitragen (Fülöp et al., 2016;

Weiskopf et al., 2009). Die genauen Mechanismen des Zusammenspiels zwischen verminderter Immunantwort einerseits und chronischen Entzündungsreaktionen auf der anderen Seite sind noch unzureichend verstanden.

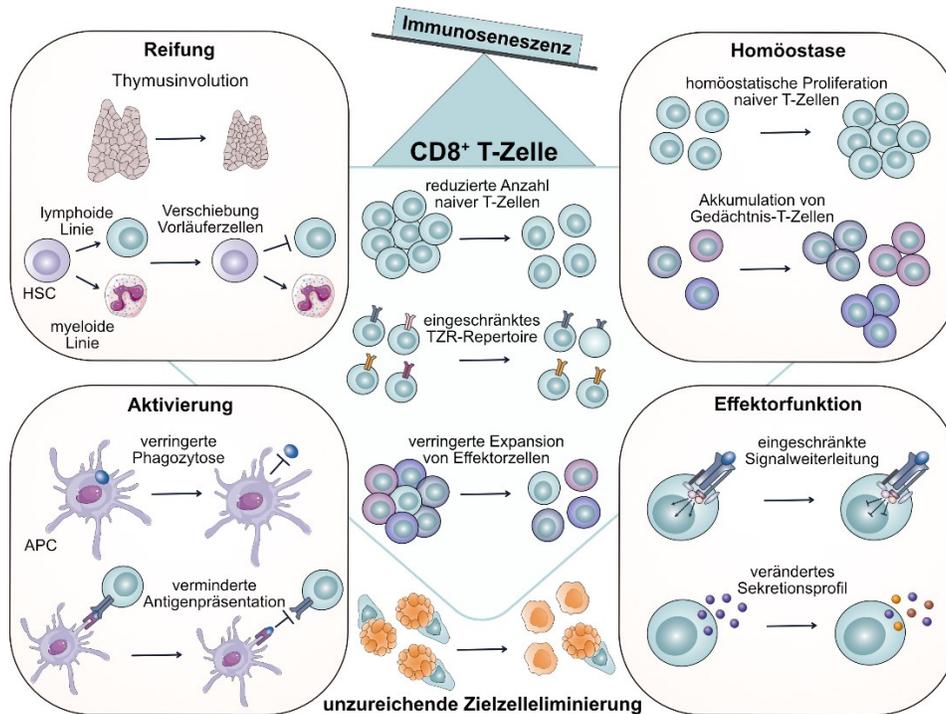
Immunoseneszenz wurde lange Zeit als fortschreitende Verschlechterung der Immunfunktionen im Alter betrachtet. Das wachsende Verständnis dieser dynamischen Prozesse richtet den Fokus jedoch zunehmend auf das inzwischen mehrfach beschriebene Modell der „Remodellierung des Immunsystems“ (Franceschi et al., 1995, 2000; Fulop et al., 2016; Pinti et al., 2016). Dabei sind Veränderungen einzelner Immunfunktionen als Ergebnis einer kontinuierlichen Anpassung an die im Alter auftretenden Beeinträchtigungen zu verstehen. Diese Adaption stellt die Aufrechterhaltung der Immunantwort sicher, fördert jedoch auch den Organismus schädigende Prozesse.

### 1.3.1 CD8<sup>+</sup> T-Zellen im Alter

Der Thymus ist das zentrale Organ für die Produktion von T-Zellen. Die stetige Rückbildung des Thymusgewebes im Verlauf des Lebens ist wohl eines der markantesten Veränderungen im Alterungsprozess und ein wesentlicher Faktor der Immunoseneszenz (Nikolich-Zugich, 2014). Die Thymusinvolutions wird von einer veränderten Struktur des Thymusstromas begleitet, wodurch die für die T-Zell-Reifung notwendigen zellulären Interaktionen zwischen Thymusepithelzellen und einwandernden lymphoiden Zellen stark beeinträchtigt sind (Chinn et al., 2012). Darüber hinaus verändert sich im Alter das Differenzierungspotenzial hämatopoetischer Stammzellen, was eine Verschiebung von lymphoiden Vorläuferzellen in Richtung myeloide Linie zur Folge hat (Rossi et al., 2005). Altersbedingte Defekte im Proliferations- und Differenzierungspotenzial der in den Thymus eingewanderten lymphoiden Zellen reduzieren die Produktion reifer T-Zellen zusätzlich (Berent-Maoz et al., 2012). Der mangelnde Nachschub beeinflusst die homöostatische Proliferation der verbleibenden peripheren naiven T-Zellen, wodurch die TZR-Diversität des naiven T-Zell-Pools weiter abnimmt (Blackman & Woodland, 2011; Cicin-Sain et al., 2007). Durch die zunehmende Antigenerfahrung im Laufe des Lebens dominieren letztlich klonal expandierte Gedächtnis-T-Zellen den T-Zell-Pool im Alter (Ahmed et al., 2009). Die Verringerung des TZR-Repertoires durch die massive Abnahme naiver T-Zellen trägt wesentlich zur einer eingeschränkten Immunantwort gegen neue Erreger und Impfungen bei (Abbildung 2).

Funktionale Defekte innerhalb der Subpopulationen verstärken die unzureichende T-Zell-Immunität im Alter. Veränderungen in der Expression von Oberflächenrezeptoren und Signalmolekülen beeinflussen die Aktivierung des T-Zell-Rezeptors und die nachgeschaltete Signaltransduktion. Der Verlust des Co-stimulatorischen Rezeptors CD28 und die gleichzeitige Hochregulation von NK-Zell-Rezeptoren in humanen CD8<sup>+</sup> T-Zellen gehören hierbei sicher zu den prominentesten Beispielen (Abedin et al., 2005; Effros, 2004). Alterationen in den intrazellulären Signalwegen bestimmen die Expression von Transkriptionsfaktoren und Effektormolekülen, die für Proliferation, Differenzierung und Funktion der

Zelle entscheidend sind (Goronzy et al., 2012). Zahlreiche Studien belegen sowohl eine eingeschränkte Expansion und Differenzierung naiver T-Zellen als auch eine eingeschränkte Proliferationsfähigkeit von Gedächtnis-T-Zellen im Alter (Nikolich-Žugich, 2018; Nikolich-Žugich et al., 2012).



**Abbildung 2. Altersbedingte Veränderungen in der CD8<sup>+</sup> T-Zell-Immunität.** Verschiedene Faktoren tragen zu einer unzureichenden Immunantwort von CD8<sup>+</sup> T-Zellen im Alter bei. Die Rückbildung des Thymusgewebes und Alterationen im Differenzierungspotential hämatopoetischer Stammzellen (HSC) führen zu einer reduzierten Anzahl naiver T-Zellen in der Peripherie, was eine homöostatische Proliferation zur Folge hat. In Kombination mit der Akkumulation von Gedächtnis-T-Zellen durch die andauernde Antigenexposition im Verlauf des Lebens, wird die Diversität des T-Zell-Rezeptor (TZR)- Repertoires zunehmend eingeschränkt. Altersbedingte Veränderungen auf Seiten antigenpräsentierender Zellen (APC) gehen mit einer verringerten Aktivierung der CD8<sup>+</sup> T-Zellen einher. Verstärkt durch zelleigene Alterationen in intrazellulären Signalwegen, führt dies zu einer veränderten Expression von Transkriptionsfaktoren und Effektormolekülen. Der damit einhergehende Mangel an spezifischen Effektorzellen führt zu einer unzureichenden Eliminierung virusinfizierter und entarteter Zellen.

Letztlich ist die Aktivierung und Initiation von Proliferation und Effektorfunktionen jedoch wesentlich von externen Stimuli, insbesondere dem Zytokinmilieu und einer adäquaten Antigenpräsentation abhängig. Inwieweit und in welchem Ausmaß funktionale Defekte durch die genannten zellintrinsic Veränderungen oder durch externe Faktoren verursacht werden ist häufig schwer zu differenzieren und bis heute nicht vollständig aufgeklärt.

## 1.4 Zielsetzung

Das Immunsystem unterliegt während des Alterungsprozesses einer kontinuierlichen Remodellierung, die mit einer tiefgreifenden Veränderung der adaptiven Immunantwort einhergeht. CD8<sup>+</sup> T-Zellen spielen eine Schlüsselrolle bei der Erkennung und Abtötung virusinfizierter und entarteter Zellen. Quantitative und funktionale Veränderungen im Alter tragen wesentlich zur Entstehung von Tumorerkrankungen und schweren Infektionsverläufen bei. Im Rahmen moderner immuntherapeutischer Strategien gewinnen CD8<sup>+</sup> T-Zellen zunehmend an Aufmerksamkeit. Adoptive T-Zell-Therapien, bei denen patienteneigene CD8<sup>+</sup> T-Zellen *in vitro* gezielt gegen Tumorzellen sensibilisiert, expandiert und anschließend zurückgeführt werden, lieferten bei verschiedenen Krebserkrankungen vielversprechende Resultate (Baruch et al., 2017; Y. Zhao et al., 2022), finden bei älteren Patienten jedoch kaum Anwendung. Die mehrfach beschriebenen, altersbedingten Beeinträchtigungen in der CD8<sup>+</sup> T-Zell-Immunität lassen am Erfolg T-Zell-basierter Therapieansätze zweifeln (Granier et al., 2021; Shouse et al., 2022). Welchen Einfluss zelleigene Alterationen von CD8<sup>+</sup> T-Zellen auf die unzureichende Eliminierung von Krankheitserregern und Tumorzellen im Alter nehmen, ist bisher weitestgehend unklar, für die Beurteilung des therapeutischen Potentials der Zellen jedoch von großer Bedeutung.

Ziel dieser Arbeit ist daher die Untersuchung möglicher zellintrinsischer Alterationen bei der Initiation der Effektorfunktionen von CD8<sup>+</sup> T-Zellen im Alter. Zahlreiche altersbedingte Veränderungen von humanen T-Zellen konnten bereits in murinen Modellen bestätigt und näher charakterisiert werden (Maue et al., 2009; Nikolich-Zugich, 2014). Mausmodelle haben sich somit als besonders geeignete Alternative erwiesen, um die häufig durch große gesundheitliche Unterschiede älterer Menschen bestehenden Limitationen der humanen Alterungsforschung zu überwinden.

Die im ersten Teil der Arbeit verwendeten C57BL/6J Wildtyp-Mäuse zählen zu den gängigsten Inzuchtstämmen. Die Antikörper-basierte Stimulation des CD3/CD28-Rezeptors ist eine seit langem etablierte Methode und ermöglicht durch die polyklonale *in vitro* Stimulation die Untersuchung der Effektorfunktionen ohne eine vorherige *in vivo* Aktivierung der Zellen. Im Fokus soll dabei die Charakterisierung des zytotoxischen Verhaltens der CD8<sup>+</sup> T-Zellen und die Aufklärung zugrunde liegender Mechanismen zellintrinsischer Veränderungen im Alter stehen. Mit Hilfe eines in unserem Labor etablierten Echtzeit-Zytotoxizitätsassays und fluoreszenzmikroskopischen Verfahren kann die zytotoxische Aktivität der CD8<sup>+</sup> T-Zellen auf Populations- und Einzelzellebene kinetisch quantifiziert werden. Die weitere Untersuchung des Proliferations- und Differenzierungspotentials, sowie die Analyse der Expression von Schlüsselkomponenten mit direkter Beteiligung an zytotoxischen Signalwegen, soll Aufschluss über mögliche Zusammenhänge altersbedingter Veränderungen liefern.

Im Zweiten Teil der Arbeit sollen die nach polyklonaler Stimulation der CD8<sup>+</sup> T-Zellen gewonnenen Erkenntnisse in einem antigenspezifischen Modellsystem bestätigt werden. Die TZR-transgene Mauslinie OT-I exprimiert T-Zell-Rezeptoren auf CD8<sup>+</sup> T-Zellen die spezifisch das über den MHC-I Komplex

präsentierte Peptid OVA<sub>257-264</sub> (SIINFEKL) des Modellantigens Ovalbumin erkennen. OT-I Mäuse gehören zu den am häufigsten eingesetzten TZR-transgenen Mausmodellen um die Immunantwort von CD8<sup>+</sup> T-Zellen in einem antigenspezifischen Kontext zu untersuchen. Der immundefiziente Phänotyp führt jedoch zu einer deutlich reduzierten Lebenserwartung der üblicherweise verwendeten homozygoten OT-I Mäuse, wodurch sie in Alterungsstudien bislang nur wenig Beachtung fanden. Im Rahmen dieser Arbeit soll daher eine heterozygote OT-I Linie generiert werden, mit dem Ziel, den Gesundheitsstatus der Tiere zu verbessern und somit ein neues Modellsystem für die Untersuchung der antigenspezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zell-Immunität im Alter zu etablieren. Zur Überprüfung der Anwendbarkeit des heterozygoten Alterungsmodells dient zunächst der phänotypische und funktionale Vergleich von CD8<sup>+</sup> T-Zellen aus jungen homo- und heterozygoten OT-I Mäusen. Darauf aufbauend sollen, angelehnt an die Ergebnisse mit C57BL/6J Wildtyp-Mäusen, altersbedingte Veränderungen des zytotoxischen Verhaltens von CD8<sup>+</sup> T-Zellen nach antigenspezifischer *in vitro* Aktivierung charakterisiert werden.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Materialien

#### 2.1.1 Reagenzien

Tabelle 1. Reagenzien

<b>Reagenz</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Bestellnummer</b>
Acridine Orange	Logos	F23001
Actinomycin D	Sigma Aldrich	A4262
$\beta$ -Mercaptoethanol	Acros Organics	125472500
Bovines Serumalbumin (BSA)	Thermo Fisher Scientific	11413164
Calcein-AM	Thermo Fisher Scientific	C3100MP
Chloroform	Thermo Fisher Scientific	15677730
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma	D4540
Desoxynukleosidtriphosphate (dNTP)	Sigma-Aldrich	DNTP10-1KT
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Sigma-Aldrich	E9884
Fetales Kälberserum (FCS)	Thermo Fisher Scientific	10270-106
Geneticin (G418)	MilliporeSigma	345810-M
Glykogen	Thermo Fisher Scientific	10757844
HEPES	Sigma Aldrich	H-7523
Interleukin 2 (human)	Miltenyi Biotec	130-097-743
Isopropanol	Sigma Aldrich	19516
KHCO <sub>3</sub>	Sigma Aldrich	17205
NaCl	EMD Millipore	S9888-M
NH <sub>4</sub> Cl	Sigma	A9434
Oligodesoxythymidin (Oligo-dT)	Sigma-Aldrich	O4387
Phosphate-buffered saline (PBS)	Thermo Fisher Scientific	10270-106
Penicillin/Streptomycin	Sigma Aldrich	P4333
SuperScript™ II Reverse Transkriptase	Thermo Fisher Scientific	18064-071
Triton X-100	Eurobio	018774
TRIzol™	Thermo Fisher Scientific	15596018

### 2.1.2 Kits

Tabelle 2. Kits

<b>Kit</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Bestellnummer</b>
CellTrace™ CFSE Cell Proliferation Kit	Thermo Fisher Scientific	C34554
Dynabeads™ Untouched™ Mouse CD8 Cells	Thermo Fisher Scientific	11417D
Dynabeads™ Mouse T-Activator CD3/CD28	Thermo Fisher Scientific	11453D
LEGENDplex™ MU Th Cytokine Panel	Biolegend	741044
Naive CD8a <sup>+</sup> T Cell Isolation Kit, mouse	Miltenyi Biotec	130-096-543
QuantiTect SYBR Green PCR Kit	Qiagen	204145
SF Cell Line 4D-Nucleofector™ X Kit	Lonza	V4XC-2012

### 2.1.3 Antikörper

Tabelle 3. Antikörper für durchflusszytometrische Analysen

<b>Spezifität</b>	<b>Fluorophor</b>	<b>Klon</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Bestellnummer</b>
anti-CD3ε	PerCP	145-2C11	Biolegend	100326
anti-CD4	PacificBlue	RM4-5	Biolegend	100531
anti-CD8	FITC	53-6.7	Biolegend	100706
anti-CD8	Pacific Blue	53-6.7	Biolegend	100728
anti-CD8	PerCP	53-6.7	Biolegend	100731
anti-CD25	APC	PC61	Biolegend	102012
anti-CD44	PE	IM7	Biolegend	103024
anti-CD44	PerCP	IM7	Biolegend	103036
anti-CD49d	PE	R1-2	Biolegend	103607
anti-CD62L	APC	MEL-14	Biolegend	104412
anti-CD69	PE	H1.2F3	Biolegend	104508
anti-CD107a	BV421	1D4B	Biolegend	121618
anti-TCR Vα2	BV421	B20.1	Biolegend	127825
anti-TCR Vβ5	PE	MR9-4	Biolegend	139504

Tabelle 4. Aktivierende und inhibitorische Antikörper für Echtzeit-Zytotoxizitäts-Assays

Spezifität	Klon	Hersteller	Bestellnummer
anti-CD3ε	145-2C11	Biologend	100340
anti-CD95 (Fas)	Jo2	BD Biosciences	554254
anti-CD178 (FasL)	MFL3	Biologend	106612
anti-CD314 (NKG2D)	CX5	Biologend	130202

#### 2.1.4 Primer

Tabelle 5. QuantiTect Primer für qPCR

Gen	Produkt	Hersteller	Bestellnummer
CISH	Mm_Cish_1_SG	Qiagen	QT00247681
FasL	Mm_Tnfsf6_1_SG	Qiagen	QT00104125
Granzym A	Mm_Gzma_1_SG	Qiagen	QT00100667
Granzym B	Mm_Gzmb_1_SG	Qiagen	QT00114590
HPRT1	Mm_Hprt_1_SG	Qiagen	QT00166768
NKG2D	Mm_Klrk1_1_SG	Qiagen	QT00104363
Perforin	Mm_Prf1_1_SG	Qiagen	QT00282002
SOCS1	Mm_Socs1_1_SG	Qiagen	QT01059268
SOCS3	Mm_Socs3_2_SG	Qiagen	QT02488983
TBP	Mm_Tbp_1_SG	Qiagen	QT00198443

#### 2.1.5 Lösungen

Tabelle 6. Lösungen

Lösung	Zusammensetzung	Konzentration
HEPES-Puffer	HEPES	10 mM
pH 7,4	NaCl	150 mM
Erythrozyten-Lysepuffer	NH <sub>4</sub> Cl	155 mM
pH 7,3	KHCO <sub>3</sub>	9,99 mM
	EDTA	130 µM

Tabelle 7. Zellkulturmedien und Puffer

<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Bestellnummer</b>
AIM V Medium	Thermo Fisher Scientific	12055-083
Dulbecco`s PBS	Thermo Fisher Scientific	14190-094
RPMI-1640	Thermo Fisher Scientific	21875-034

### 2.1.6 Verbrauchsmaterialien

Alltägliche Verbrauchsmaterialien wie serologische Pipetten, Pipettenspitzen und Reaktionsgefäße wurden von VWR, BD Biosciences, PEQLAB und Sarstedt bezogen.

Tabelle 8. Spezielle Verbrauchsmaterialien

<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Bestellnummer</b>
Corning™ Cell Strainer (40 µM)	VWR	734-2760
Falcon® 96-Well-Platten (Black/Clear Bottom)	VWR	353219
Greiner Bio-One™ 96-Well-Platten (V-Bottom)	Greiner	651201
Petrischale (100 x 20 mm)	Sarstedt	83.3902
Zellkulturflaschen (T-25; T-75)	Sarstedt	83.3910.502; 83.3911.502
Zellkultur-Platten (12-Well; 24-Well)	VWR	353043; 353047

### 2.1.7 Geräte

Tabelle 9. Spezielle Geräte

<b>Gerät</b>	<b>Hersteller</b>
CFX96™ Real-Time system/C1000 Thermal Cycler	Biorad
Genios Pro	Tecan
FACSARIA™ III	BD Biosciences
FACSVerse™	BD Biosciences
ImageXpress Micro XLS System	Molecular Devices
Luna™	Logos
Zellzähler Z2	Beckman Coulter

### 2.1.8 Software

Tabelle 10. Spezielle Software

Software	Hersteller
Affinity Designer	Serif
CorelDraw	Corel Corporation
FACSDiva V6.1.3	BD Biosciences
FACSSuite V1.0.5.3841	BD Biosciences
FlowJo V10.1	BD Biosciences
ImageJ 1.51d	National Institutes of Health
Prism 8	Graphpad
LEGENDplex™ Data Analysis Software Suite	Biolegend/Qognit

### 2.1.9 Mäuse

#### C57BL/6J

Die C57BL Mauslinie wurde 1921 von C.C. Little generiert. In den 1940er und 1950er Jahren wurden daraus die Stämme C57BL/6J (Jackson Institute, Bar Harbor, Maine, USA) und C57BL/6N (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA) etabliert. C57BL/6 Mäuse liefern den genetischen Hintergrund zahlreicher transgener Mauslinien und zählen heute zu den am häufigsten verwendeten Inzuchtstämmen (Song & Hwang, 2017). Im Rahmen dieser Arbeit wurden weibliche C57BL/6J Mäuse verwendet. Die Tiere wurden von Charles River bezogen und in unseren eigenen Kolonien gezüchtet. Die Zucht und Haltung erfolgte spezifisch pathogenfrei (SPF) im Tierstall des Centrums für Integrative Physiologie und Molekulare Medizin (CIPMM) der Universität des Saarlandes gemäß den Vorgaben nach §1 der Tierschutzversuchstierverordnung. Für *in vitro* Versuche wurden die Tiere zum Zweck der Organentnahme durch zervikale Dislokation getötet (gemäß §4 des Tierschutzgesetzes).

#### OT-I

OT-I Mäuse (C57BL/6-Tg(TcraTcrb)1100Mjb/J) exprimieren einen transgenen T-Zell-Rezeptor auf CD8<sup>+</sup> T-Zellen, der aus der variablen  $\alpha$ -Kettenregion 2 ( $V_{\alpha 2}$ ) und der variablen  $\beta$ -Kettenregion 5 ( $V_{\beta 5}$ ) besteht, die über ein einziges Transgen vererbt werden (Hogquist et al., 1994). Diese T-Zell-Rezeptoren erkennen spezifisch ein antigenes Epitop des Hühner-Ovalbumins (OVA<sub>257-264</sub>/SIINFEKL). Die transgene Mauslinie wurde 1994 von Hogquist et al. generiert (Hogquist et al., 1994) und hat sich zu einem wichtigen Modell für die Untersuchung der spezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zell-Antwort etabliert. Homozygote OT-I Mäuse (OT-I<sup>+/+</sup>) wurden von Charles Rivers erworben und in eigenen Kolonien gezüchtet. Heterozygote F1-Generationen (OT-I<sup>+/-</sup>) wurden durch Verpaarung weiblicher C57BL/6J und männlicher

OT-I<sup>+/+</sup> Mäuse generiert. Die Zucht und Haltung erfolgte unter SPF-Haltung im Tierstall des Centrums für Integrative Physiologie und Molekulare Medizin (CIPMM) der Universität des Saarlandes gemäß den Vorgaben nach §1 der Tierschutzversuchstierverordnung. Für *in vitro* Versuche wurden die Tiere zum Zweck der Organentnahme durch zervikale Dislokation getötet (gemäß §8 des Tierschutzgesetzes).

### 2.1.10 Zelllinien

#### P815

P815 Zellen wurden aus einem Methylcholanthren-induzierten Mastozytom einer männlichen DBA/2 Maus gewonnen. Die Suspensionszelllinie findet breite Anwendung in experimentellen Tumormodellen und ist kommerziell erhältlich (ATCC, #TIB-64<sup>TM</sup>).

#### EL4

Die murine T-Zell-Lymphom-Zelllinie EL4 wurde aus einem 9,10-dimethyl-1,2-benzanthracene-induzierten Lymphom einer C57BL Maus generiert und ist kommerziell erhältlich (ATCC, #TIB-39).

#### E.G7

E.G7 Zellen (ATCC, # CRL-2113<sup>TM</sup>) sind ein Derivat der EL4-Zelllinie, die das von OT-I CD8<sup>+</sup> T-Zellen erkannte Ovalbumin-SIINFEKL (OVA<sub>257-264</sub>) H-2kb-abhängig präsentieren. Generiert wurde die Suspensionszelllinie durch stabile Transfektion des Plasmids pAc-neo-OVA, das die vollständige Kopie der Hühner-Ovalbumin-mRNA und ein Neomycin-Resistenzgen (G418) enthält (Moore et al., 1988). Die E.G7-Zellen wurden vom Institut de Recherche et d'Innovation Biomédicale der Université de Rouen Normandie zur Verfügung gestellt.

## 2.2 Methoden

Im Rahmen dieser Arbeit wurden weibliche C57BL/6J- sowie homo- und heterozygote OT-I Mäuse beiden Geschlechts verwendet. Zur Einschätzung des Gesundheitszustandes wurde nach zervikaler Dislokation zunächst das Körper- und Milzgewicht bestimmt. Mäuse mit Splenomegalie (Verhältnis Körper-zu Milzgewicht > 0,6) oder makroskopisch sichtbarem Tumor wurden von den Versuchen ausgeschlossen. Für die Untersuchung altersbedingter Veränderungen muriner CD8<sup>+</sup> T-Zellen wurden die Tiere in zwei Kohorten (jung: 12-26 Wochen, alt: 70-102 Wochen) eingeteilt.

### 2.2.1 Isolation muriner CD8<sup>+</sup> T-Zellen aus Splenozyten

Für die Gewinnung muriner CD8<sup>+</sup> T-Zellen wurde die zuvor entfernte Milz zerkleinert und mit dem Kolben einer 2 ml Spritze durch einen 40 µm Zellsieb gerieben. Die somit vereinzelt Splenozyten wurden in 50 ml kaltem PBS +0,5% BSA/+2mM EDTA aufgenommen und für 8 min bei 4°C

zentrifugiert. Die im Zellpellet enthaltenen Erythrozyten wurden durch Zugabe von 2 ml einer hypoosmolaren Lösung (Tabelle 6) und anschließender 2-minütiger Inkubation lysiert. Im Anschluss wurden die Zellen in 48 ml PBS +0,5% BSA/+2 mM EDTA aufgenommen und die Anzahl vitaler Splenozyten durch Acridinorange/Propidiumiodid-Färbung und automatisiertem Fluoreszenz-Zellzähler (LUNA-FL™) ermittelt.

Die Isolation der CD8<sup>+</sup> T-Zellen erfolgte mittels „Dynabeads™ Untouched™ Mouse CD8 Cells“ Kit (ThermoFisher) gemäß den Protokollangaben des Herstellers. Bei dieser magnetbasierten Negativ-Isolation werden alle unerwünschten Immunzellen und Erythrozyten durch Antikörper gegen entsprechende Oberflächenmoleküle gebunden. Nach Magnet-Aufreinigung befinden sich die isolierten CD8<sup>+</sup> T-Zellen im Überstand. Die Isolation naiver CD8<sup>+</sup> Zellen erfolgte mittels „Naive CD8a<sup>+</sup> T Cell Isolation“ Kit (Miltenyi) nach Herstellerangaben. Die Reinheit der isolierten CD8<sup>+</sup> T-Zellen wurde durchflusszytometrisch überprüft.

### **2.2.2 Zellkultur**

#### 2.2.2.1 Stimulation von CD8<sup>+</sup> T-Zellen aus C57BL/6J Wildtyp-Mäusen

Die zuvor isolierten CD8<sup>+</sup> T-Zellen wurden in AIM V + 10% FCS/ + 50 µM β-Mercapthoethanol/ +100 U/ml IL-2 (human) aufgenommen. Die Stimulation der Zellen erfolgte mittels „Dynabeads™ Mouse T-Activator CD3/CD28“ Kit (ThermoFisher) in einem 0,8:1 Bead-zu-Zell-Verhältnis. Die anti-CD3/anti-CD28 Antikörper-beschichteten Beads ermöglichen eine Aktivierung der Zellen über den CD3/TZR-Komplex. Die Zellen wurden in 24-Well-Platten mit einer Anfangsdichte von 1x10<sup>6</sup> CD8<sup>+</sup> T-Zellen/ml Medium für 3 Tage bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> kultiviert und anschließend in ca. 2-tägigem Rhythmus erneut verdünnt. Vor Versuchsdurchführungen wurden die CD3/CD28-Beads mit Hilfe eines Magneten wieder entfernt.

#### 2.2.2.2 Stimulation von CD8<sup>+</sup> T-Zellen aus OT-I Mäusen

Für die antigenspezifische Aktivierung wurden die zuvor isolierten OT-I CD8<sup>+</sup> T-Zellen in AIM V + 10% FCS/ + 50 µM β-Mercapthoethanol/ + 100 U/ml IL-2 (human) aufgenommen. Als antigenpräsentierende Zellen (APC) dienten bei 120 Gray bestrahlte E.G7 Zellen, in einem APC:CD8<sup>+</sup>-Verhältnis von 2:1. Die Zellen wurden in 12-Well-Platten mit einer Anfangsdichte von 1x10<sup>6</sup> CD8<sup>+</sup> T-Zellen/ml Medium für 3 Tage bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> kultiviert und anschließend in ca. 2-tägigem Rhythmus erneut verdünnt.

#### 2.2.2.3 Kultivierung muriner Tumorzelllinien

Die Kultivierung der murinen Tumorzelllinien P815, EL4 und E.G7 erfolgte in RPMI + 10% FCS/ + 1% Penicillin/Streptomycin bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>. Den EL4-Zellen wurden zusätzlich 40 µM β-Mercapthoethanol hinzugefügt, den E.G7-Zellen 0,4 mg/ml des Selektionsantibiotikums G418. Bei

Verwendung der Zellen in Zytotoxizitätsversuchen wurden diese zuvor auf eine Zieldichte von  $0,4-0,8 \times 10^6$  Zellen/ml eingestellt.

### 2.2.2.4 Generierung einer stabilen E.G7 pCasper Zelllinie

Für fluoreszenzmikroskopische Zytotoxizitätsanalysen wurde eine E.G7 Zelllinie generiert, die den FRET-basierten Apoptose-Reporter pCasper stabil exprimiert. Der Sensor besteht aus einem TagGFP und TagRFP Fluorophor, verbunden über eine Peptidsequenz aus 17 Aminosäuren die eine durch Caspase-3 katalysierte Spaltungssequenz (DEVD) enthält (Shcherbo et al., 2009). In vitalen Zellen sind die Fluoreszenzintensitäten beider Fluorophore konstant. Bei Apoptose-Induktion wird die DEVD-Sequenz durch Caspase-3 Aktivierung gespalten. Durch die räumliche Trennung der Fluorophore sinkt die rote FRET-Fluoreszenz, die GFP-Fluoreszenz nimmt hingegen zu (Backes et al., 2018). Die Generierung der E.G7 pCasper Zelllinie erfolgte durch stabile Transfektion von  $4 \mu\text{g}$  des pCasper-pMAX-pGK-Puromycin Plasmids (R. Zhao et al., 2021) unter Verwendung des „SF Cell Line 4D-Nucleofector™ X“ Kits gemäß den Herstellerangaben. Nach 48h wurde das Medium gewechselt und zusätzlich  $4 \mu\text{g/ml}$  des Selektionsantibiotikums Puromycin hinzugegeben. Nach Expansion und Sortierung der Zellen erfolgte eine Einzellklonierung in 96-Well-Platten. Die monoklonal expandierten Zellen wurden in RPMI +10% FCS/ + 1% Penicillin/Streptomycin/ +  $4 \mu\text{g}$  Puromycin/ +  $0,4 \text{ mg/ml}$  G418 kultiviert. Die durchflusszytometrische Analyse zeigte einen Anteil von 98% GFP/RFP-positiver Zellen. Die Funktionalität des Apoptose-Reporters wurde fluoreszenzmikroskopisch mittels Staurosporin überprüft.

### **2.2.3 Echtzeit-Zytotoxizitätsassay**

Die Analyse der zytotoxischen Funktion muriner  $\text{CD8}^+$  T-Zellen erfolgte anhand eines Calcein-AM-basierten Echtzeit-Zytotoxizitätsassays nach Kummerow et al. (Kummerow et al., 2014). Calcein-AM (Acetoxymethylester) ist in seiner unpolaren Form membranpermeabel, die intrazelluläre Abspaltung der lipophilen AM-Gruppe durch endogene Esterasen verhindert jedoch das Herausdiffundieren des grünen Fluoreszenzfarbstoffs Calcein. Durch die Zerstörung der Membranintegrität bei Lyse der Zielzellen wird das Calcein aus dem Zytosol freigesetzt. Da die Fluoreszenzintensität linear mit der Anzahl der mit Calcein beladenen Zielzellen korreliert, kann die zytotoxische Aktivität der  $\text{CD8}^+$  T-Zellen kinetisch erfasst werden. Für antigenunspezifische Zytotoxizitätsassays mit  $\text{CD8}^+$  T-Zellen aus C57BL/6J Wildtyp-Mäusen, dienten die Tumorzelllinien P815 und EL4 als Zielzellen, für die Untersuchung der antigenspezifischen Zytotoxizität von OT-I  $\text{CD8}^+$  T-Zellen wurden entsprechend E.G7 Zellen verwendet. Die Färbung der Zielzellen erfolgte mit  $500 \text{ nM}$  Calcein-AM in AIM V +  $10 \text{ mM}$  HEPES für  $15 \text{ min}$  bei Raumtemperatur im Dunkeln. Nach anschließendem Waschen wurden die Zellen in einer Dichte von  $2,5 \times 10^4$  Zellen/ $200 \mu\text{l}$  AIM V +  $10 \text{ mM}$  HEPES in einer schwarzen 96-Well-Platte mit durchsichtigem Boden ausgesät. Nach Absitzen der Zielzellen (ca.  $20 \text{ min}$ ) wurden die  $\text{CD8}^+$  T-Zellen in einem

Effektor:Zielzell-Verhältnis von 20:1, 10:1 oder 5:1 in 50 µl AIM V + 10 mM HEPES vorsichtig hinzugegeben. Die antigenunspezifische TZR-Aktivierung von CD8<sup>+</sup> T-Zellen aus C57BL/6J Wildtyp-Mäusen erfolgte durch die Zugabe von 2 µg/ml eines anti-CD3ε-Antikörpers. Die Bindung des spezifischen Epitops an den TZR-Co-Rezeptor CD3 und die Bindung der Fc-Region an Fc-Rezeptoren an der Oberfläche der Zielzellen ermöglicht dabei die Ausbildung der immunologischen Synapse. Zur späteren Quantifizierung der Zytotoxizität wurde eine Lebendkontrolle (Zielzellen ohne Zugabe von CD8<sup>+</sup> T-Zellen), eine Lysekontrolle (Zielzellen + 10% TritonX in AIM V) und entsprechende Mediumkontrollen mitgeführt. Die Fluoreszenzmessung erfolgte mit dem GENios Pro Tecan Reader alle 10 min über einen Zeitraum von 4 h bei 37°C (Anregungswellenlänge 485 nm; Emission 535 nm). Die Berechnung der prozentualen Zielzelllyse ergibt sich aus der von Kumerow et al. etablierten Formel (Kummerow et al., 2014):

$$\text{Zielzelllyse (\%)} = \frac{(F_{\text{Probe}}(t) - (I * F_{\text{Lebend}}(t)))}{(I * (F_{\text{Lyse}}(t) - F_{\text{Lebend}}(t)))} * 100$$

$F_{\text{Probe}}(t)$  = Fluoreszenz der untersuchten Probe zum Zeitpunkt t

$F_{\text{Lebend}}(t)$  = Fluoreszenz der Lebendkontrolle zum Zeitpunkt t

$F_{\text{Lyse}}(t)$  = Fluoreszenz der Lyse-Kontrolle zum Zeitpunkt t

I = Index zum Zeitpunkt 0 ( $F_{\text{Probe}}(0) / F_{\text{Lebend}}(0)$ )

### 2.2.4 Fluoreszenzmikroskopischer Zytotoxizitätsassay

Alle fluoreszenzmikroskopischen Zytotoxizitäts-Analysen wurden unter Verwendung des High-Content-Imaging-System ImageXpress Micro XLS (Molecular Devices) durchgeführt. Dieses, mit Temperaturregulation und CO<sub>2</sub>-Anschluss ausgestattete Weitfeld-Fluoreszenzmikroskop, ermöglicht die Analyse der zytotoxischen Aktivität auf Einzelzellebene über mehrere Stunden unter Brutschrank-ähnlichen Bedingungen.

#### 2.2.4.1 Calcein-basierte Einzelzell-Analysen

Für die Untersuchung der Zytotoxizität von CD8<sup>+</sup> T-Zellen aus C57BL/6J Wildtyp-Mäusen wurden P815-Zellen mit 500 nM Calcein-AM gefärbt und in einer Dichte von 2,5x10<sup>4</sup> Zellen/200 µl phenolfreiem AIM V in einer schwarzen 96-Well-Platte mit durchsichtigem Boden ausgesät. Zur Gegenfärbung nekrotischer Zellen wurde dem Medium 400 ng/ml Propidiumiodid (PI) zugefügt. Nach Absitzen der Zielzellen wurden die CD8<sup>+</sup> T-Zellen in einem Effektor:Zielzell-Verhältnis von 2:1 in 50 µl phenolfreiem AIM V + 2 µg/ml anti-CD3ε-Antikörper vorsichtig hinzugegeben. Die Bildaufnahme erfolgte alle 2 min über 2h bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> mit einem 20x Objektiv. Für die Quantifizierung der Zielzelllyse wurde

ImageJ verwendet. Dazu wurden 50 Zellen pro aufgenommenem Ausschnitt zufällig ausgewählt und auf den Zeitpunkt des Kontakts mit einer CD8<sup>+</sup> T-Zelle, den Verlust der Calcein-Fluoreszenz und die Zunahme der PI-Fluoreszenz analysiert. Zielzellen ohne Kontakt mit einer CD8<sup>+</sup> T-Zelle wurden nicht in die Quantifizierung einbezogen. Die Analyse der Daten erfolgte durch Lea Kaschek.

### 2.2.4.2 pCasper-basierte Einzelzell-Analysen

Für die Charakterisierung der antigenspezifischen Zytotoxizität von OT-I CD8<sup>+</sup> T-Zellen wurden die zuvor generierten EG.7 pCasper Zellen (siehe 2.2.2.4) verwendet. Diese wurden in einer Dichte von  $2,5 \times 10^4$  Zellen/200  $\mu$ l in phenolfreiem AIM V resuspendiert und in einer schwarzen 96-Well-Platte mit durchsichtigem Boden ausgesät. Nach Absitzen der Zielzellen wurden die OT-I CD8<sup>+</sup> T-Zellen in einem Effektor:Zielzell-Verhältnis von 2:1 in 50  $\mu$ l phenolfreiem AIM V vorsichtig hinzugegeben. Die Bildaufnahme erfolgte alle 2 min über 4h bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> mit einem 20x Objektiv. Für die Quantifizierung der zytotoxischen Aktivität wurde ImageJ verwendet. Die quantitative Analyse des Zielzelltodes wurde, wie zuvor von Backes et al. etabliert (Backes et al., 2018), durch Lea Kaschek durchgeführt.

### **2.2.5 Durchflusszytometrische Analysen**

Im Rahmen dieser Arbeit wurden murine T-Zellen aus OT-I und C57BL/6J Wildtyp-Mäusen anhand verschiedener Protokolle mit Fluorochrom-gekoppelten Antikörpern markiert und durchflusszytometrisch analysiert. Dafür wurden jeweils  $0,5-1 \times 10^6$  Zellen mit 1 ml PBS + 0,5% BSA gewaschen (4 min, 400g) und in 100  $\mu$ l PBS + 0,5% BSA resuspendiert. Nach Zugabe der jeweiligen Antikörper (Tabelle 11-15) und 20-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur im Dunkeln wurden die Zellen erneut einmal gewaschen und in 200  $\mu$ l PBS + 0,5% BSA aufgenommen. Die durchflusszytometrische Analyse erfolgte mittels FACSVerser und der dazugehörigen FACSSuite Software (BD). Bei überlappenden Emissionsspektren durch Mehrfachfärbungen wurde eine Software-gestützte Kompensation durchgeführt. Die Bestimmung der Positiv-Populationen erfolgte anhand entsprechender “FMO (*Fluorescence Minus One*)”- und Einzelfärbungen. Die quantitative Analyse der generierten Daten wurde mittels FlowJo Version 10 (FlowJo, LLC) durchgeführt.

#### 2.2.5.1 Subtypenverteilung von CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen

Der Differenzierungsstatus von CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen geht mit der Expression charakteristischer Oberflächenmoleküle einher, die eine Unterscheidung von Gedächtnis- und Effektor-Populationen ermöglicht. Für die Analyse dieser T-Zell-Subtypen wurden Splenozyten, unstimulierte und stimulierte CD8<sup>+</sup> T-Zellen mit Fluorochrom-gekoppelten Antikörpern gegen CD3, CD4, CD8, CD44 und CD62L

(Tabelle 11) gefärbt und die prozentuale Verteilung von naiven ( $T_N$ :  $CD62^+ CD44^-$ ), zentralen Gedächtnis-T-Zellen ( $T_{CM}$ :  $CD62L^+ CD44^+$ ) und Effektor-Gedächtnis-T-Zellen ( $T_{EM}$ :  $CD62L^- CD44^+$ ) analysiert.

Tabelle 11. Antikörper zur Analyse der Subtypenverteilung in  $CD4^+$  und  $CD8^+$  T-Zellen

Antikörper	Fluorochrom	Volumen in 100 $\mu$ l
CD3	PerCP	2,5 $\mu$ l
CD4	Pacific Blue	1 $\mu$ l
CD8	FITC	2 $\mu$ l
CD44	PE	3 $\mu$ l
CD62L	APC	2,5 $\mu$ l

#### 2.2.5.2 Expression von CD49d in $CD8^+$ Gedächtnis-T-Zellen

Für die durchflusszytometrische Quantifizierung Antigen-unerfahrener Gedächtnis-T-Zellen („*virtual memory*“ T-Zellen;  $T_{VM}$ :  $CD49d^+$ ) wurden unstimulierte und stimulierte  $CD8^+$  T-Zellen aus C57BL/6J Wildtyp-Mäusen mit Fluorochrom-gekoppelten Antikörpern gegen CD8, CD44, CD62L und CD49d (Tabelle 12) gefärbt. Aus der  $CD8^+$  Gedächtnis- ( $CD44^+$ ) und der zentralen Gedächtnis-Population ( $CD44^+ CD62L^+$ ) wurde der prozentuale Anteil an  $T_{VM}$  ermittelt.

Tabelle 12. Antikörper zur Quantifizierung von CD49d in  $CD8^+$  Gedächtnis-T-Zellen

Antikörper	Fluorochrom	Volumen in 100 $\mu$ l
CD8	FITC	2 $\mu$ l
CD44	PerCP	3 $\mu$ l
CD62L	APC	2,5 $\mu$ l
CD49d	PE	4 $\mu$ l

#### 2.2.5.3 Verteilung der variablen TZR-Regionen $V_{\alpha}2$ - und $V_{\beta}5$ auf OT-I $CD8^+$ T-Zellen

Die Quantifizierung der variablen  $\alpha$ -Kettenregion 2 ( $V_{\alpha}2$ ) und  $\beta$ -Kettenregion 5 ( $V_{\beta}5$ ) von T-Zell-Rezeptoren auf  $CD8^+$  T-Zellen erfolgte durch Färbung der Zellen mit Fluorochrom-gekoppelten Antikörpern gegen CD8, CD44, CD62L, TCR- $V_{\alpha}2$  und TCR- $V_{\beta}5$  (Tabelle 13).

Für die Quantifizierung der transgenen  $V_{\alpha}2^+ V_{\beta}5^+$ -TZR-Expression, wurden unstimulierte  $CD8^+$  T-Zellen aus homo- und heterozygoten OT-I Mäusen auf den prozentualen Anteil doppelpositiver Populationen analysiert. Als Kontrolle dienten unstimulierte  $CD8^+$  T-Zellen aus C57BL/6J Wildtyp-Mäusen.

Tabelle 13. Antikörper zur Quantifizierung von TCR-V $\alpha$ 2 und -V $\beta$ 5 auf CD8<sup>+</sup> T-Zellen

Antikörper	Fluorochrom	Volumen in 100 $\mu$ l
CD8	FITC	2 $\mu$ l
CD44	PerCP	3 $\mu$ l
CD62L	APC	2,5 $\mu$ l
TCR V $\beta$ 5	PE	4 $\mu$ l
TCR V $\alpha$ 2	BV 421	4 $\mu$ l

#### 2.2.5.4 CFSE Proliferationsassay

Die durchflusszytometrische Analyse der Proliferation erfolgte mittels „CellTrace™ CFSE Cell Proliferation“ Kit (ThermoFisher) gemäß den Herstellerangaben. Dabei wurden unstimulierte CD8<sup>+</sup> T-Zellen aus C57BL/6J Wildtyp-Mäusen mit dem Fluoreszenzfarbstoff CFSE markiert und mit anti-CD3/CD28-Beads (ThermoFisher) in einem 0,8:1 Bead-zu-Zell-Verhältnis in AIM V + 100 U/ml IL-2 stimuliert. CFSE-markierte Splenozyten aus OT-I Mäusen wurden entsprechend mit bestrahlten E.G7-Zellen in einem Verhältnis von 1:1 in AIM V + 100 U/ml IL-2 stimuliert. Nach 48h wurden die Zellen mit 3  $\mu$ l PerCP-gekoppelten anti-CD8 Antikörper in 100  $\mu$ l PBS + 0,5% BSA gefärbt und die Proliferation anhand des abnehmenden CFSE-Fluoreszenzsignals nach Zellteilung der CD8<sup>+</sup> T-Zellen analysiert.

#### 2.2.5.5 Degranulationsassay

Die Granula-Exozytose-vermittelte Zytotoxizität von CD8<sup>+</sup> T-Zellen aus C57BL/6J Wildtyp-Mäusen wurde anhand des Membranproteins CD107a (Lysosomal-associated membrane protein 1, LAMP-1) quantifiziert, das nach Fusion der zytolytischen Granula mit der Zellmembran, extrazellulär detektiert werden kann. Dafür wurden pro Ansatz  $3 \times 10^5$  CD8<sup>+</sup> T-Zellen mit P815-Zellen in einem Verhältnis von 1:1 und unter Zugabe von 8  $\mu$ l anti-CD107a-BV421-Antikörper in 200  $\mu$ l AIM V + 10% FCS + 2  $\mu$ g/ml anti-CD3 $\epsilon$ -Antikörper bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Nach 0h, 1,5h und 3h wurden die Zellen mit Antikörpern gegen CD8, CD44 und CD62L (Tabelle 15) gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Die Quantifizierung der CD107a-Mobilisation erfolgte anhand der mittleren Fluoreszenzintensität (MFI) in CD8<sup>+</sup> Gedächtnis-T-Zellen (T<sub>CM</sub> + T<sub>EM</sub>).

Tabelle 14. Antikörper für Degranulationsassay

Antikörper	Fluorochrom	Volumen in 100 $\mu$ l
CD107a	BV421	4 $\mu$ l (im Degranulationsassay)
CD8	FITC	2 $\mu$ l
CD44	PerCP	3 $\mu$ l
CD62L	APC	2,5 $\mu$ l

#### 2.2.5.6 Bead-basierter Multiplex-Assay (LEGENDplex™)

Für die Analyse der Sekretion pro- und anti-inflammatorischer Zytokine in CD8<sup>+</sup> T-Zellen wurde das “LEGENDplex™ MU Th Cytokine Panel” (Biolegend) verwendet. Dieser Bead-basierte Immunoassay ermöglicht eine simultane Quantifizierung von 12 verschiedenen Zytokinen. Zur Charakterisierung des Zytokinprofils von 3-Tage stimulierten CD8<sup>+</sup> T-Zellen aus OT-I Mäusen wurden 60  $\mu$ l des Zellkultur-Mediums abgenommen und bei 14.000 g für 10 min zentrifugiert. Nach Abnahme des Überstandes wurden die Proben bis zur weiteren Verwendung bei -80°C eingefroren. Die Durchführung des Immunoassays erfolgte gemäß den Protokollangaben des Herstellers. Für die quantitative Analyse der Zytokin-Sekretion wurde die von Biolegend zur Verfügung gestellte “LEGENDplex™ Data Analysis Software” verwendet.

#### **2.2.6 Durchflusszytometrische Sortierung**

Die durchflusszytometrische Sortierung der naiven (T<sub>N</sub>), zentralen Gedächtnis (T<sub>CM</sub>)- und Effektor-Gedächtnis-T-Zellen (T<sub>EM</sub>) aus Splenozyten und stimulierten CD8<sup>+</sup> T-Zellen erfolgte unter Verwendung des FACSAria™III (BD) mit einer 70  $\mu$ M Nozzle.

##### 2.2.6.1 Sortierung muriner Splenozyten aus C57BL/6J Wildtyp-Mäusen

Nach Isolation der Splenozyten wurden ca.  $100 \times 10^6$  Zellen in 1,5 ml PBS + 0,5% BSA resuspendiert und mit 90  $\mu$ l anti-CD8-FITC und 100  $\mu$ l anti-CD44-PE Antikörpern für 20 min bei Raumtemperatur lichtgeschützt auf einem Schüttler inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen mit 3 ml PBS + 0,5% BSA gewaschen (200g, 10 min) und in 4 ml PBS + 0,5% BSA aufgenommen. Die sortierten T<sub>N</sub> und T<sub>CM</sub>/T<sub>EM</sub> wurden in einer Dichte von  $1 \times 10^6$  Zellen/ml für 3 Tage mit CD3/CD28-Beads und 100 U/ml IL-2 in AIM V +10% FCS/ +50  $\mu$ M  $\beta$ -ME stimuliert.

### 2.2.6.2 Sortierung stimulierter CD8<sup>+</sup> T-Zellen

Für die Sortierung der T<sub>CM</sub> und T<sub>EM</sub> aus 3-Tage stimulierten CD8<sup>+</sup> T-Zellen wurden ca. 50x10<sup>6</sup> Zellen 1x gewaschen (200g, 10 min) und in 1 ml PBS + 0,5% BSA resuspendiert. Nach Zugabe von 50 µl anti-CD44-PE und 40 µl anti-CD62L-APC Antikörpern wurden die Zellen für 20 min bei Raumtemperatur lichtgeschützt auf einem Schüttler inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen mit 3 ml PBS + 0,5% BSA gewaschen und in 2 ml PBS + 0,5% BSA aufgenommen. Die sortierten T<sub>CM</sub> und T<sub>EM</sub> wurden in einer Dichte von 2x10<sup>6</sup> Zellen/ml in AIM V + 10% FCS/ + 100 U IL-2/ml aufgenommen und bis zur Verwendung im Zytotoxizitätsassay für 4h bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> ruhen gelassen.

### **2.2.7 Interne Totalreflexionsfluoreszenzmikroskopie (TIRFM)**

Die Analyse der Fusion lytischer Granula auf Einzelzellebene erfolgte mittels TIRFM. Alle TIRFM-Experimente wurden in Kooperation mit der AG Rettig (Zelluläre Neurophysiologie, CIPMM) von Keerthana Ravichandran durchgeführt. Stimulierte CD8<sup>+</sup> T-Zellen aus C57BL/6J Wildtyp-Mäusen wurden mittels “Mouse T cell Nucleofector” Kits (Lonza) gemäß den Herstellerangaben mit einem pMAX-GranzymB-mCherry Konstrukt transfiziert. 12h nach Transfektion wurden 0,2x10<sup>6</sup> Zellen in 40 µl einer extrazellulären Lösung (2 mM HEPES, 140 mM NaCl, 4.5 mM KCl, and 2 mM MgCl<sub>2</sub>) resuspendiert und auf anti-CD3ε-Antikörper (30 µg/ml) - beschichtete Deckgläser gegeben. Die Detektion der Fusionsereignisse erfolgte unter Perfusion der Zellen mit extrazellulärer Lösung + 10 mM Ca<sup>2+</sup> unter Verwendung eines 100x Plan-Apochromat Objektives (Zöphel et al., 2022). Für die Quantifizierung der Vesikel-Fusionen wurde Fiji v1.46 verwendet. Dabei wurde ein plötzlicher Abfall der GranzymeB-mCherry-Fluoreszenz innerhalb von 0,3 s als Fusionsereignis definiert.

### **2.2.8 Immunzytochemie und SIM (*Structured Illumination Microscopy*)**

Alle immunzytochemischen Versuche wurden in Zusammenarbeit mit Keerthana Ravichandran (Zelluläre Neurophysiologie, CIPMM) durchgeführt. Für die intrazelluläre GrzB-Färbung wurden 3-Tage stimulierte CD8<sup>+</sup> T-Zellen zunächst 1x mit 350 µl PBS gewaschen (900 rpm, 5 min) und in 100 µl anti-CD8-FITC-Antikörperlösung (1:100 in PBS) resuspendiert. Nach 15 min Inkubation auf Eis (lichtgeschützt) wurden die Zellen 1x in PBS gewaschen und auf 0,01% Polyornithin-beschichtete Deckgläser gegeben (ca. 100 µl). Im Anschluss wurden die Zellen für 20 min mit 500 µl 4% PFA-Lösung fixiert und 3x mit 500 µl PBS gewaschen. Nach Permeabilisierung durch 500 µl 0,1% Triton X-100 in PBS und anschließender Blockierung mit 500 µl 0,1% Triton X-100 in PBS + 0,5% BSA wurden die Zellen für 45 min in 50 µl anti-GrzB-Alexa647-Antikörperlösung (1:200 in 0,1% Triton X-100 in PBS + 0,5% BSA) gefärbt. Die SIM-Analyse erfolgte an einem ELYRA PS.1 Mikroskop unter Verwendung der Zen2012 software (Zeiss) und einem 63x Plan-Apochromat Objektiv. Für die Quantifizierung GrzB-positiver Vesikel wurde Fiji v1.46 verwendet.

### 2.2.9 qRT-PCR

Die Isolation der Gesamt-RNA aus unstimulierten und stimulierten CD8<sup>+</sup> T-Zellen erfolgte mittels TRIzol™ Reagenz (Thermo Fisher Scientific) nach Protokollangaben des Herstellers. Die isolierte RNA wurde in 10 µl DEPC-behandelten Wasser (DEPC-H<sub>2</sub>O) aufgenommen und die Konzentration und Reinheit mit dem NanoDrop™ one (Thermo Fisher Scientific) bestimmt. Für die Reverse Transkription wurden 0,8 µg RNA + 0,5 µg/ml + 10 mM dNTPs in 12 µl DEPC-H<sub>2</sub>O für 5 min bei 65°C im Thermocycler T-Personal (Biometra) inkubiert. Nach Zugabe von 4 µl 5-fach Erststrang-Puffer (Invitrogen™), 2 µl 0,1M DTT (Sigma Aldrich) und 1 µl RNase out (Invitrogen™) folgte eine weitere Inkubation für 2 min bei 42°C und die Zugabe von 1 µl Superscript II (Thermo Fisher Scientific). Nach 50 min Inkubation bei 42°C und anschließender 15-minütiger Inkubation bei 70°C wurde die cDNA bis zur weiteren Verwendung bei 4°C bzw. -20°C gelagert. Die qRT-PCR wurde unter Verwendung der jeweiligen QuantiTect Primer (Tabelle 5) und des „QuantiTect SYBR Green PCR“ Kits (Qiagen) nach Protokollangaben des Herstellers in einem CFX96™ Real-Time System C1000™ Thermal Cycler (BioRad) durchgeführt. Wenn nicht anders angegeben, wurden Relative Expressionslevel mittels  $\Delta Cq$ -Methode ( $2^{-\Delta Cq}$ ) berechnet. Als Referenzgene dienten dabei HPRT1 (Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase 1) und TBP (TATA-Box-Bindungsprotein). Die Generierung der qRT-PCR Daten erfolgte in Zusammenarbeit mit Sandra Janku.

### 2.2.10 Statistische Auswertung

Für die statistische Auswertung wurde GraphPad Prism 8 verwendet. Bei Normalverteilung der Daten wurde ein ungepaarter T-Test durchgeführt. Lag keine Normalverteilung vor, wurden die Daten mittels nicht-parametrischem Mann-Whitney-Test analysiert. Signifikanzen wurden als \* $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$  und \*\*\*\*  $p < 0,0001$  definiert. Sofern nicht anders angegeben, wurden Daten als Mittelwert  $\pm$  SEM (n = Anzahl der Experimente) dargestellt.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Phänotypische und funktionelle Charakterisierung zytotoxischer CD8<sup>+</sup> T-Zellen aus jungen und alten C57BL/6J Mäusen

Immunoseneszenz ist ein multifaktorielles Phänomen und beeinträchtigt die Immunantwort von CD8<sup>+</sup> T-Zellen auf unterschiedliche Weise. Die komplexe Wechselwirkung durch altersbedingte Alterationen einzelner Immunzellen erschwert die Abgrenzung zelleigener Defekte von dem Einfluss des veränderten Mikromilieus. Die Identifizierung intrinsisch erhaltener Fähigkeiten ist jedoch mit Blick auf neue immuntherapeutische Ansätze von zentraler Bedeutung. Der Fokus dieser Arbeit liegt daher in der Aufklärung zellintrinsischer Alterationen von CD8<sup>+</sup> T-Zellen im Alter und deren direkten Einfluss auf die zytotoxische Effektorfunktion. Dafür wurden zunächst CD8<sup>+</sup> T-Zellen aus der Milz von jungen (12-26 Wochen) und alten (75-102 Wochen) weiblichen C57BL/6J Mäusen isoliert und anschließend *in vitro* polyklonal stimuliert.

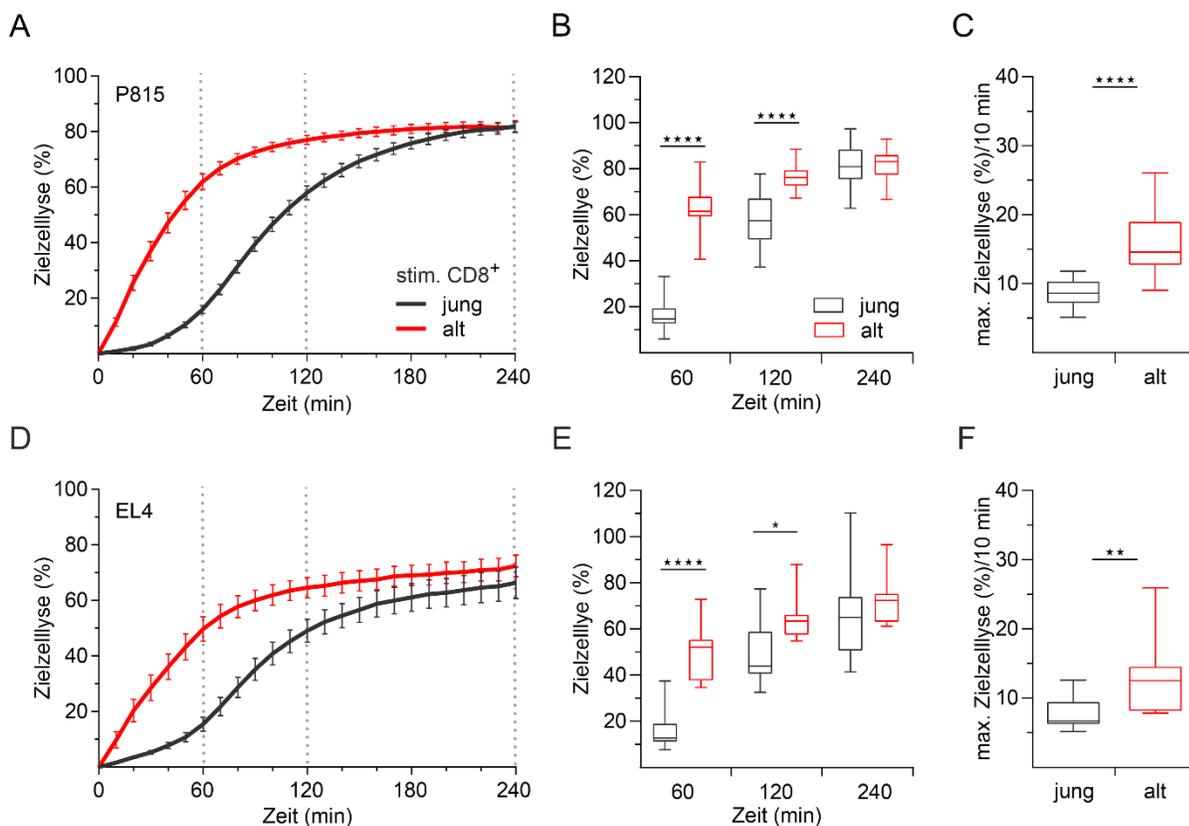
##### 3.1.1 CD8<sup>+</sup> T-Zellen aus alten Mäusen zeigen eine schnellere Zytotoxizität gegen verschiedene Tumorzelllinien

Trotz eindeutiger Hinweise auf eine insgesamt beeinträchtigte T-Zell-Immunität ist über die zytotoxische Funktion von CD8<sup>+</sup> T-Zellen im Verlauf des Alterns überraschend wenig bekannt. Anhand eines in unserem Labor etablierten fluoreszenzbasierten Zytotoxizitätsassays (Kummerow et al., 2014) haben wir die Möglichkeit die Kinetik der Zielzellyse in Echtzeit zu bestimmen, was eine weitaus detailliertere Charakterisierung des zytotoxischen Verhaltens erlaubt als herkömmliche Endpunktmessungen. Dafür werden die Tumorzellen mit Calcein-AM beladen und die Abnahme der Fluoreszenz bei Lyse der Zellen über einen Zeitraum von 4 Stunden quantifiziert. Die Analyse der zytotoxischen Aktivität von CD8<sup>+</sup> T-Zellen aus jungen und alten Mäusen erfolgte zunächst nach dreitägiger Stimulation mit anti-CD3/CD28 Beads und 100 U IL-2. Zu diesem Zeitpunkt haben sich die Zellen von den Beads gelöst, sind proliferiert und weisen somit eine hinreichende Aktivierung und zytolytisches Verhalten auf.

In Übereinstimmung mit früheren Beobachtungen (Kummerow et al., 2014), zeigten CD8<sup>+</sup> T-Zellen junger Mäuse einen sigmoidalen Verlauf der Lyse von murinen P815 Mastrozytom-Zellen, mit einer verzögerten Zytotoxizität innerhalb der ersten 60 min (Abbildung 3A). Im Gegensatz dazu, lysierten CD8<sup>+</sup> T-Zellen aus alten Mäusen ihre Zielzellen signifikant schneller, gekennzeichnet durch einen deutlich steileren Kurvenverlauf (Abbildung 3A und B). Bei der hier eingesetzten Effektor:Zielzell-Ratio von 20:1 betrug die Differenz der Zielzellyse nach 60 min 46% und nach 120 min 19%. Nach 240 min war der prozentuale Anteil lysierter Zellen in beiden Altersgruppen vergleichbar. Die Analyse der maximalen Zielzellyse pro 10-min Intervall stellt einen sensiblen Parameter zur Quantifizierung der

Lysekapazität dar und zeigte eine 1,8-fach höhere Lyserate von CD8<sup>+</sup> T-Zellen aus alten Mäusen (Abbildung 3C).

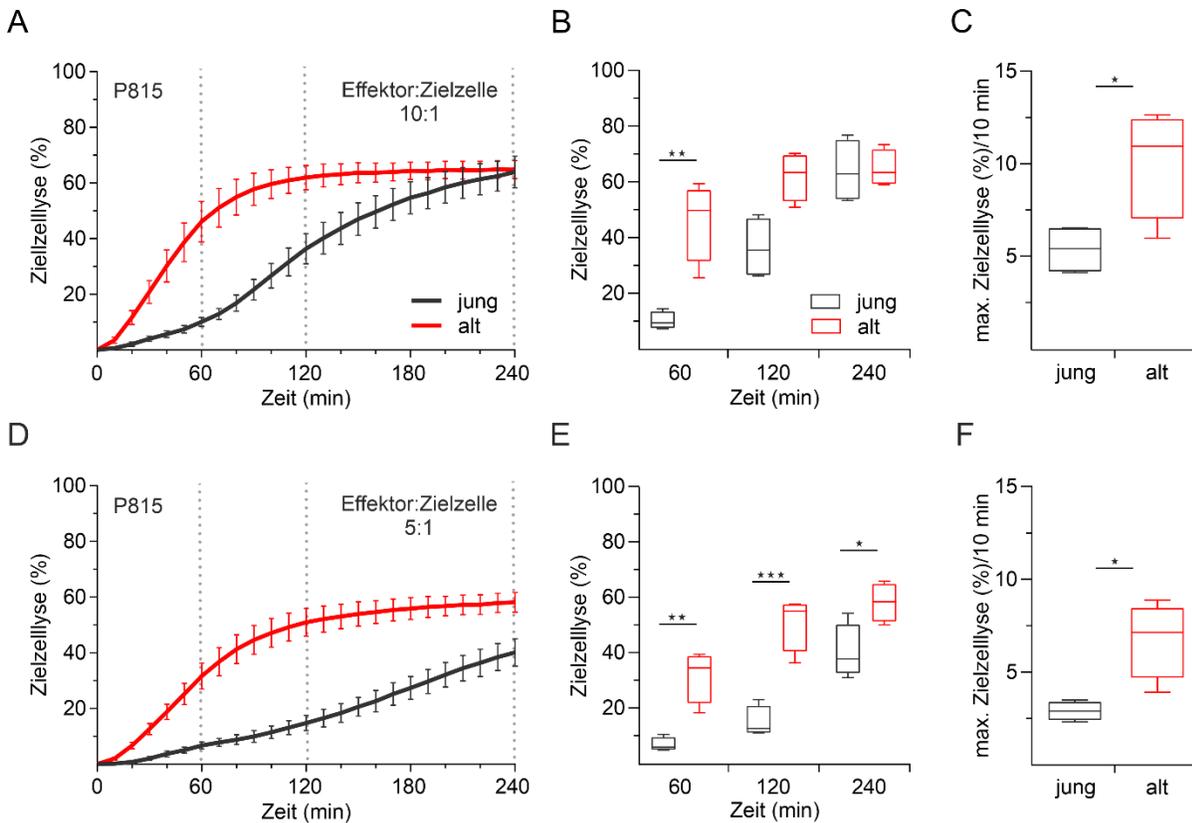
Um auszuschließen, dass es sich bei der erhöhten zytotoxischen Aktivität im Alter um ein Zielzell-spezifisches Phänomen handelt, wurden die Versuche mit der murinen Lymphom-Zelllinie EL4 wiederholt. Auch hier zeigte sich eine signifikant schnellere Zielzelllyse durch CD8<sup>+</sup> T-Zellen aus alten Mäusen mit einer Differenz von 34% nach 60 min, 15% nach 120 min und vergleichbarer Endpunktllyse (Abbildung 3D und E). CD8<sup>+</sup> T-Zellen alter Mäuse erzielten eine 1,7-fach höhere Lyserate pro 10-min Intervall im Vergleich zu CD8<sup>+</sup> T-Zellen aus jungen Mäusen (Abbildung 3F).



**Abbildung 3. Schnellere Zielzelllyse durch CD8<sup>+</sup> T-Zellen aus alten Mäusen.** Fluoreszenzbasierte Echtzeit-Zytotoxizitätsassays mit 3-Tage stimulierten CD8<sup>+</sup> T-Zellen aus jungen (n=11-18) und alten (n=8-16) C57BL/6J Mäusen. Als Zielzellen dienen die Tumorzelllinien P815 (A) und EL4 (D) in einer Effektor:Zielzell-Ratio von 20:1. Boxplots repräsentieren die durchschnittliche Zielzelllyse nach 60, 120 und 240 min (B, E) und die maximale Lysekapazität/10 min (C, F). Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM. Modifiziert aus Zöphel et al., 2022.

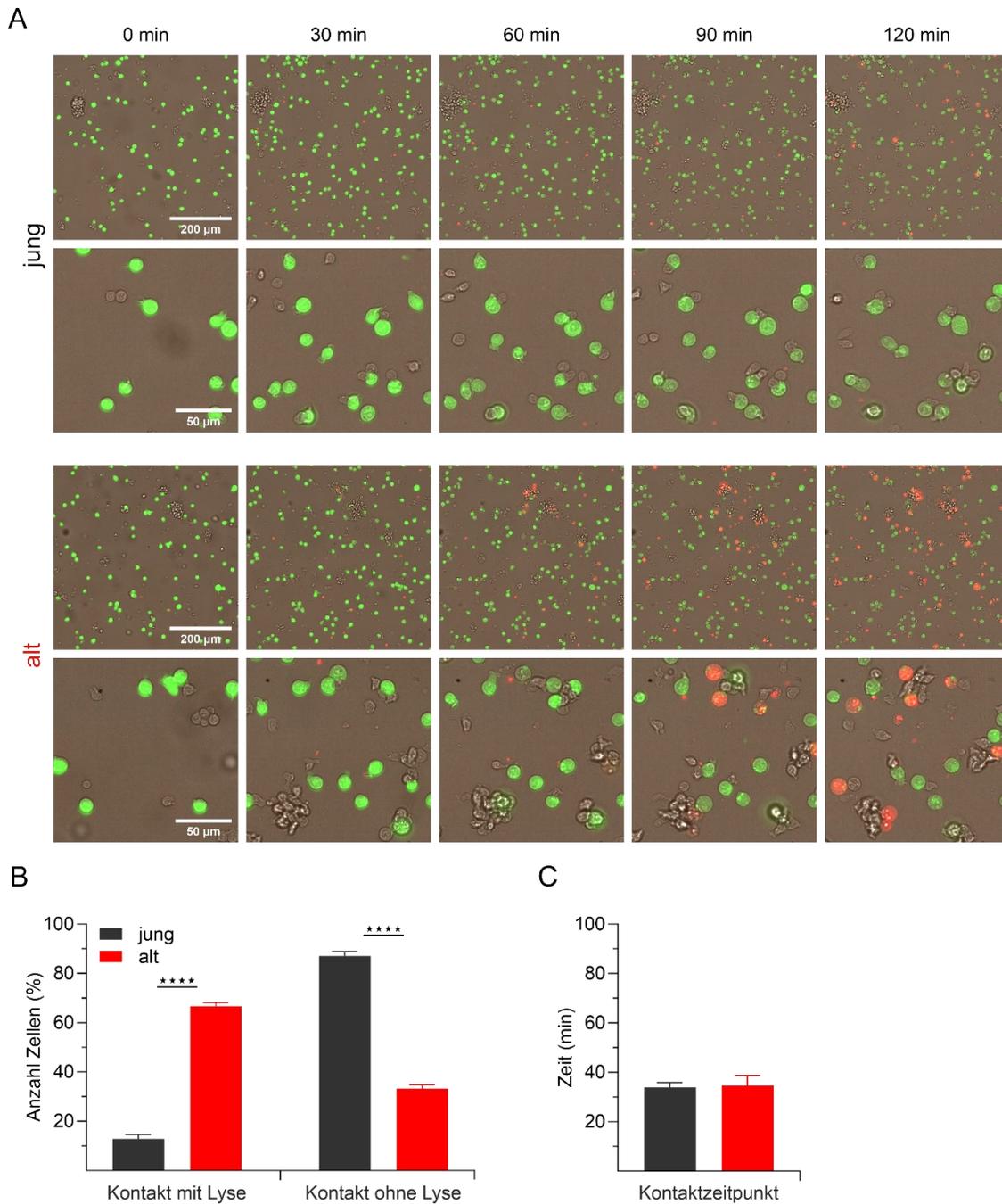
Die Anzahl der in einem Zytotoxizitätsassay eingesetzten Effektorzellen bestimmt die prozentuale Lyse der Zielzellen maßgeblich und nimmt somit entsprechend Einfluss auf die Kinetik der zytotoxischen

Aktivität. Aus diesem Grund wurde die Lyse der P815-Zellen bei einer auf 10:1 und 5:1 verringerten Effektor:Zielzell-Ratio quantifiziert (Abbildung 4).



**Abbildung 4. Unterschiede in der Lyse-Kinetik sind unabhängig von der Effektor:Zielzell-Ratio.** Fluoreszenzbasierte Echtzeit-Zytotoxizitätsassays mit 3-Tage stimulierten CD8<sup>+</sup> T-Zellen aus jungen und alten C57BL/6J Mäusen. Als Zielzellen diente die Mastozytom-Zelllinie P815 in einer Effektor:Zielzell-Ratio von 10:1 (**A**) und 5:1 (**D**). Boxplots repräsentieren die durchschnittliche Zielzelllyse nach 60, 120 und 240 min (**B**, **E**) und die maximale Lysekapazität/10 min (**C**, **F**). Dargestellt sind die Mittelwerte ± SEM, n=4. Modifiziert aus Zöphel et al., 2022.

In beiden Fällen nahm die Zielzelllyse insgesamt ab, die signifikanten Unterschiede in der Kinetik blieben jedoch erhalten (Abbildung 4A-E). Durch den verringerten Anteil an Effektorzellen wurde die effizientere Zytotoxizität von CD8<sup>+</sup> T-Zellen aus alten Mäusen noch deutlicher (Abbildung 4C und D), mit einer Erhöhung der maximalen Lyserate um das 1,9- (10:1) und 2,3-fache (5:1). Während bei einer Effektor:Zielzell-Ratio von 20:1 und 10:1 der prozentuale Anteil lysierter Zellen am Endpunkt zwischen beiden Altersgruppen vergleichbar war, zeigten CD8<sup>+</sup> T-Zellen aus alten Mäusen bei einer 5:1 Ratio eine signifikant höhere Endpunktllyse (Abbildung 3A und B, 4A-E).



**Abbildung 5. Fluoreszenzmikroskopische Einzelzell-Analysen bestätigen die schnelle Zielzellyse durch CD8<sup>+</sup> T-Zellen aus alten Mäusen.** Einzelzell-Analyse Calcein-beladener P815-Zellen nach Zugabe stimulierter CD8<sup>+</sup> T-Zellen aus jungen und alten C57BL/6J Mäusen in einer 2:1 Effektor;Zielzell-Ratio. Gegenfärbung lysierter Zellen durch Propidiumiodid (PI) im Medium. Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme der Zellen alle 2 min über einen Zeitraum von 2h. (A) Repräsentative *Overlays* von Hellfeld, Calcein (grün) und PI (rot) zu den dargestellten Zeitpunkten. Quantifizierung der Zellkontakte mit und ohne Zielzellyse (B) und des Kontaktzeitpunkts (C). Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM, n=3. Die Analyse der Daten erfolgte durch Lea Kaschek. Modifiziert aus Zöphel et al., 2022.

Für eine umfassendere Charakterisierung der in den Zytotoxizitätsassays beobachteten altersbedingten Unterschiede in der Lyse-Kinetik, wurde das zytotoxische Verhalten von CD8<sup>+</sup> T-Zellen junger und alter Mäuse fluoreszenzmikroskopisch auf Einzelzellebene analysiert. Dafür wurden P815-Zellen mit Calcein-AM beladen und der Kontaktzeitpunkt zwischen Effektor- und Zielzelle sowie der Anteil daraus resultierender Zielzelllysen quantifiziert. Um lysierte Zielzellen besser sichtbar zu machen, wurde dem Medium Propidiumiodid hinzugefügt (Abbildung 5).

Den Ergebnissen des Populations-Zytotoxizitätsassays entsprechend, führte der Kontakt mit CD8<sup>+</sup> T-Zellen aus alten Mäusen in den ersten 120 min zu einem signifikant höheren Anteil lysierter Zielzellen (Abbildung 5A und B). Interessanterweise zeigte sich, dass CD8<sup>+</sup> T-Zellen aus jungen Mäusen ebenfalls stabile Zielzellkontakte bilden, diese jedoch weitaus seltener zur Lyse der Zelle führen. Die Analyse des ersten Kontaktzeitpunktes, der Rückschlüsse auf das Migrationsverhalten der CD8<sup>+</sup> T-Zellen ermöglichen könnte, zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen den Altersgruppen (Abbildung 5B und C).

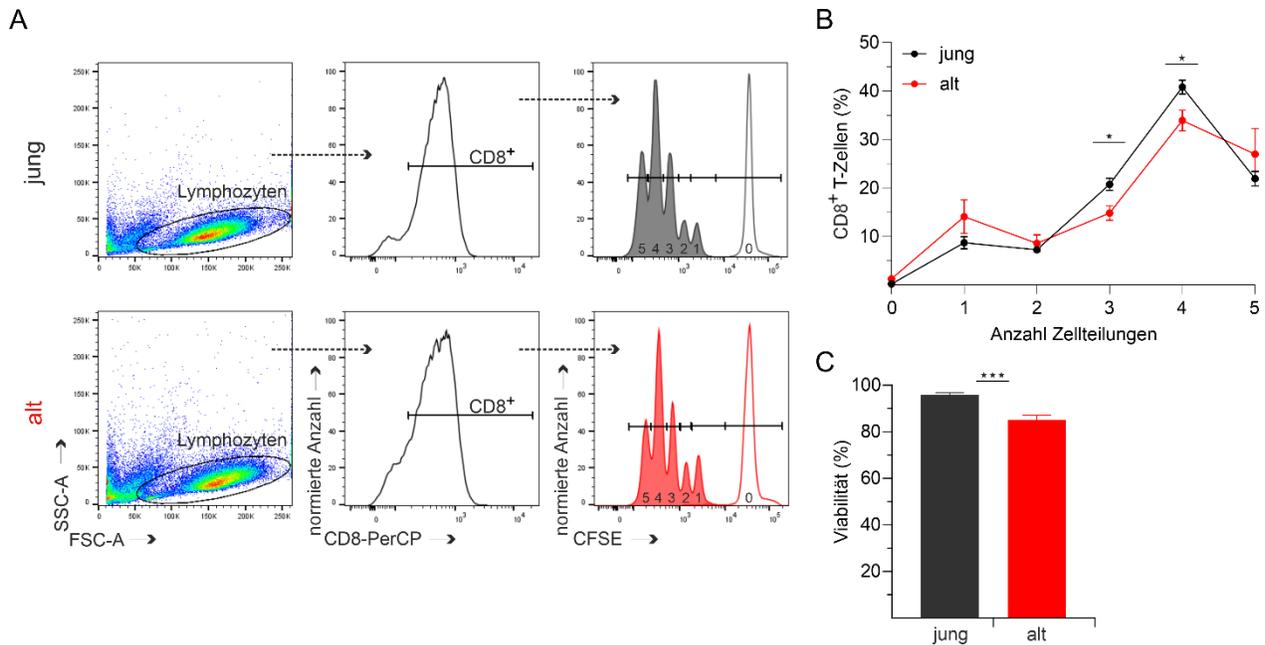
Diese Ergebnisse legen nahe, dass die schnelle zytotoxische Aktivität von CD8<sup>+</sup> Zellen im Alter nicht auf zeitliche Unterschiede im Zielzellkontakt zurückzuführen ist, sondern vielmehr Veränderungen in der zytolytischen Effektorfunktion zugrunde liegen.

### **3.1.2 Verringerte Proliferation und Viabilität von CD8<sup>+</sup> T-Zellen aus alten Mäusen**

Die Stimulation des T-Zell-Rezeptors hat die Initiation von Proliferation und Differenzierung zur Folge, was einen wesentlichen Einfluss auf die Expression von Effektormolekülen hat (Willinger et al., 2005). Um auszuschließen, dass Unterschiede in der zytotoxischen Funktion durch eine veränderte Proliferationsfähigkeit und Viabilität von CD8<sup>+</sup> T-Zellen junger Mäuse begründet sind, wurden unstimulierte CD8<sup>+</sup> T-Zellen mit dem Fluoreszenzfarbstoff CFSE markiert und die Anzahl der Zellteilungen nach Zugabe von anti-CD3/CD28 Beads und 100 U IL-2 durchflusszytometrisch analysiert (Abbildung 6A).

Nach 48h haben CD8<sup>+</sup> T-Zellen aus jungen Mäusen signifikant mehr Zellteilungen durchlaufen, was auf eine, wenn auch geringfügig, verringerte Proliferationsfähigkeit im Alter schließen lässt (Abbildung 6B). Darüber hinaus war die Viabilität der CD8<sup>+</sup> T-Zellen aus alten Mäusen am Tag der Zytotoxizitätsassays (3 Tage nach Stimulation) signifikant geringer (Abbildung 6C).

Somit kann weder eine eingeschränkte Proliferation noch eine verminderte Viabilität die verzögerte Lyse-Kinetik von CD8<sup>+</sup> T-Zellen aus jungen Mäusen erklären.



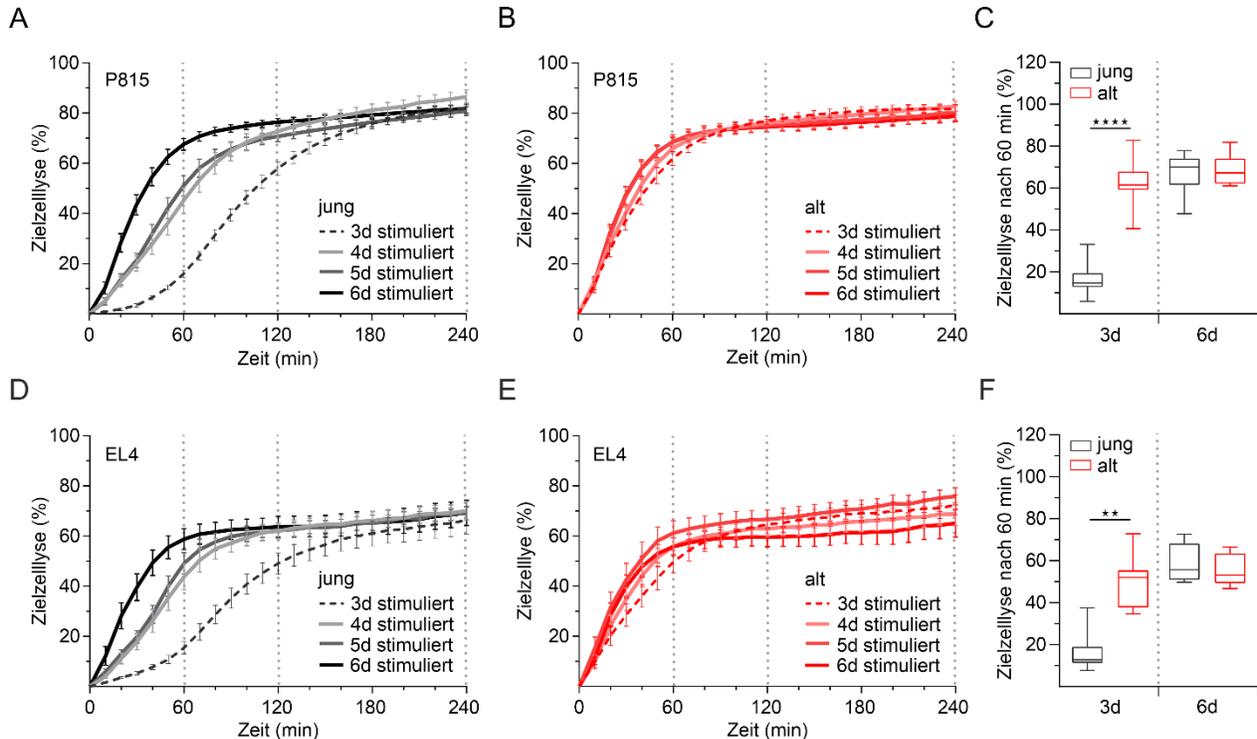
**Abbildung 6. Verminderte Proliferationsfähigkeit und Viabilität von CD8<sup>+</sup> T-Zellen im Alter.** CFSE-basierter Proliferationsassay mit stimulierten CD8<sup>+</sup> T-Zellen aus jungen und alten C57BL/6J Mäusen. (A) Repräsentative Gating-Strategie der durchflusszytometrischen Analyse und (B) Quantifizierung der Zellteilungen durch Verdünnung des zytoplasmatischen Fluoreszenzfarbstoffs CFSE 48h nach Stimulation (n=6). (C) Analyse der Viabilität durch Färbung der 3-Tage stimulierten CD8<sup>+</sup> T-Zellen mit Acridinorange/Propidiumiodid und Verwendung eines automatisierten Fluoreszenz-Zellzählers (n=8). Dargestellt sind die Mittelwerte ± SEM. Modifiziert aus Zöphel et al., 2022.

### 3.1.3 Die Lyse-Kinetik von CD8<sup>+</sup> T-Zellen junger Mäuse verändert sich mit zunehmender Stimulationsdauer

Im Laufe der *in vitro* Stimulation verändert sich der Differenzierungsstatus einer T-Zelle und bestimmt folglich deren Effektorfunktion (Knörck et al., 2022; Pieren et al., 2019; Sallusto et al., 1999). Daher wurde die zytotoxische Aktivität der CD8<sup>+</sup> T-Zellen aus jungen und alten Mäusen in einem zeitlichen Verlauf von drei bis sechs Tagen analysiert (Abbildung 7).

Die zytotoxische Effizienz der CD8<sup>+</sup> T-Zellen aus alten Mäusen blieb über die Dauer der Kultivierung nahezu konstant, die Zytotoxizität von CD8<sup>+</sup> T-Zellen junger Mäuse nimmt hingegen mit zunehmender Stimulationsdauer zu (Abbildung 7A und B). Bereits an Tag vier zeigte sich eine deutlich schnellere Lyse-Kinetik gegen P815 Mastozytom-Zellen, die an Tag sechs das Niveau von CD8<sup>+</sup> T-Zellen alter Mäuse erreichte. Während nach dreitägiger Stimulation die Differenz der Zielzellyse zwischen den Altersgruppen nach 60 min 46% betrug, konnten an Tag sechs keine signifikanten Unterschiede beobachtet werden (Abbildung 7C).

Die Analyse der Zytotoxizität gegen EL4 Lymphoma-Zellen lieferte vergleichbare Ergebnisse (Abbildung 7D-F) und bestätigt nochmals die Zielzell-unabhängigen Unterschiede der Lyse-Kinetik von CD8<sup>+</sup> T-Zellen im Alter.

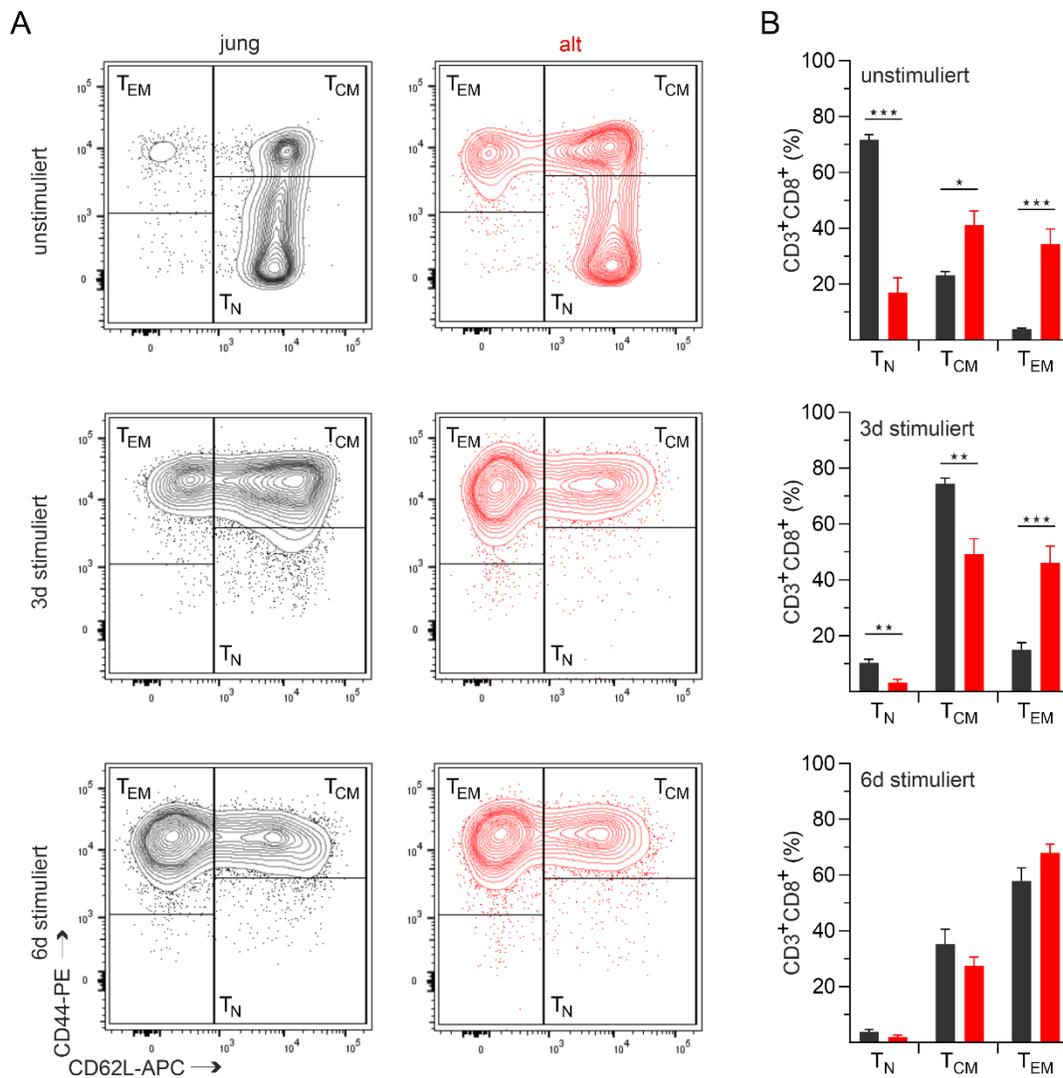


**Abbildung 7. Einfluss der Stimulationsdauer auf die Lyse-Kinetik von CD8<sup>+</sup> T-Zellen aus jungen und alten Mäusen.** Fluoreszenzbasierte Echtzeit-Zytotoxizitätsassays nach 3-6 Tagen Stimulation von CD8<sup>+</sup> T-Zellen aus jungen (A, D) und alten (B, E) C57BL/6J Mäusen. Als Zielzellen dienten die Tumorzelllinien P815 (n=7-18) und EL4 (n=3-11) in einer Effektor:Zielzell-Ratio von 20:1. Boxplots repräsentieren die durchschnittliche Zielzelllyse von drei- und sechs-Tage stimulierten CD8<sup>+</sup> T-Zellen nach 60 min (C, F). Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM.

### 3.1.4 Altersbedingte Veränderungen in der CD8<sup>+</sup> T-Zell-Subtypenverteilung

Nach Antigen-Kontakt expandieren naive T-Zellen ( $T_N$ ) klonal, differenzieren zu Effektorzellen und anschließend zu Gedächtnis-T-Zellen, die sich allgemein in Zentrale Gedächtnis- ( $T_{CM}$ ) und Effektor-Gedächtnis-T-Zellen ( $T_{EM}$ ) unterteilen lassen (Nikolich-Zugich, 2008; Sallusto et al., 1999). Der fortschreitende Rückgang des naiven T-Zell-Pools und die Akkumulation von Gedächtnis-T-Zellen gehören sicher zu den bedeutendsten Veränderungen des adaptiven Immunsystems während des Alterns. Die Verteilung der Subtypen von CD8<sup>+</sup> T-Zellen aus jungen und alten Mäusen im Verlauf der *in vitro* Stimulation wurde durchflusszytometrisch anhand der Oberflächenmarker CD44 und CD62L analysiert (Abbildung 8A). Erwartungsgemäß weisen unstimulierte CD8<sup>+</sup> T-Zellen junger Mäuse mit 72% einen hohen Anteil naiver T-Zellen ( $CD62L^+CD44^-$ ) auf. Die Gedächtnispopulation besteht aus 23%  $T_{CM}$

(CD62L<sup>+</sup> CD44<sup>+</sup>) und 4% T<sub>EM</sub> (CD62L<sup>-</sup> CD44<sup>+</sup>). Im Gegensatz dazu machen T<sub>N</sub> im Alter mit 17% den geringsten Anteil aus. 41% der unstimulierten CD8<sup>+</sup> T-Zellen aus alten Mäusen sind T<sub>CM</sub> und 34% T<sub>EM</sub>. Die Stimulation der Zellen führte in beiden Altersgruppen zu einer deutlichen Abnahme der naiven T-Zell-Population einhergehend mit der Differenzierung von T<sub>N</sub> zu T<sub>CM</sub> und T<sub>CM</sub> zu T<sub>EM</sub> (Abbildung 8A und B).



**Abbildung 8. Einfluss der Stimulationsdauer auf die Subtypenverteilung von CD8<sup>+</sup> T-Zellen aus jungen und alten Mäusen.**

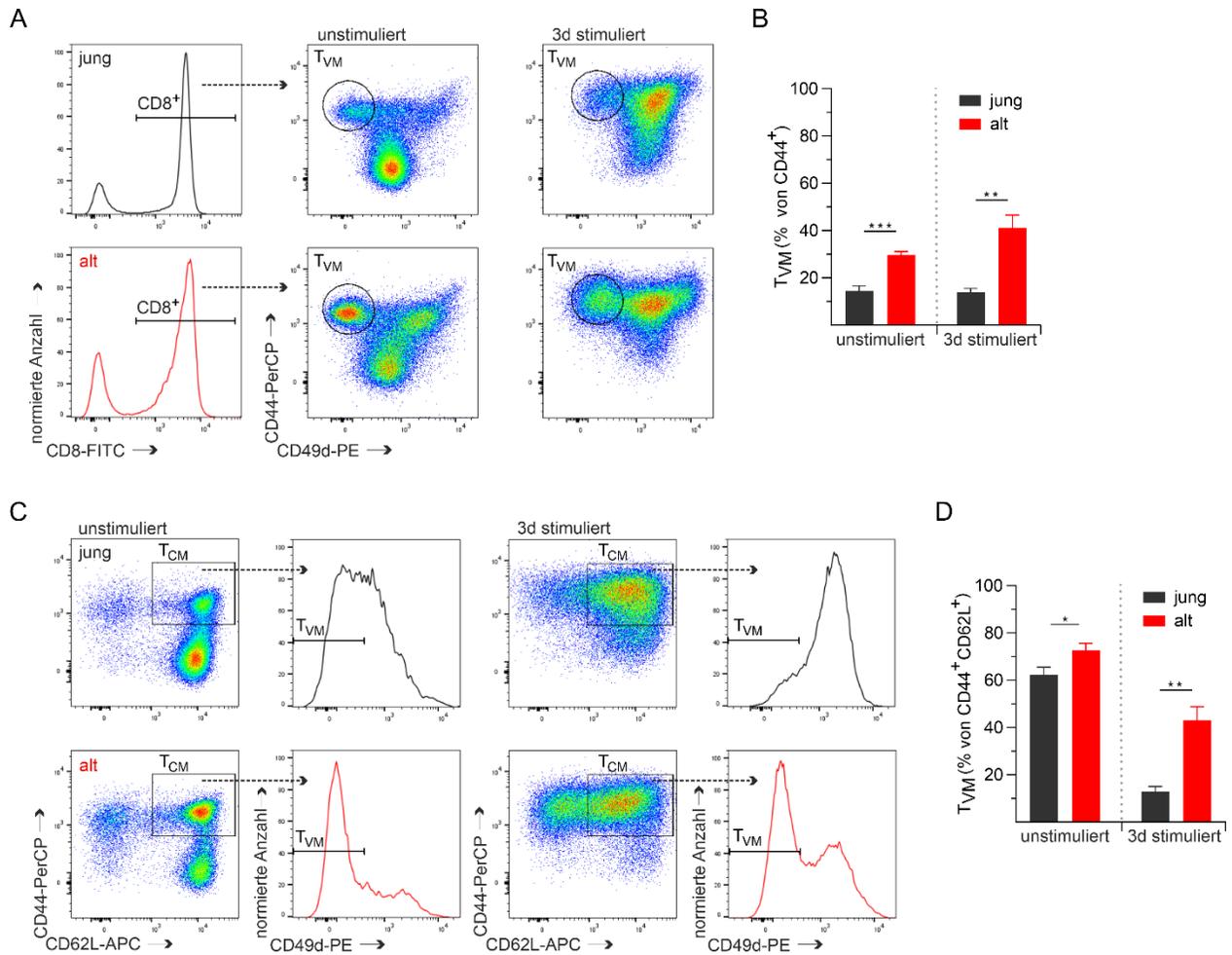
Durchflusszytometrische Analyse von CD8<sup>+</sup> T-Zellen aus jungen und alten C57BL/6J Mäusen. Unstimulierte (n=8) und stimulierte (n=6-9) CD8<sup>+</sup> T-Zellen wurden anhand der CD62L- und CD44-Oberflächenexpression in T<sub>N</sub>: CD62L<sup>+</sup> CD44<sup>-</sup>, T<sub>CM</sub>: CD62L<sup>+</sup> CD44<sup>+</sup> and T<sub>EM</sub>: CD62L<sup>-</sup> CD44<sup>+</sup> unterteilt. Repräsentative Konturplots (A) und Quantifizierung (B) der Subtypenverteilung im Verlauf der *in vitro* Stimulation. Dargestellt sind die Mittelwerte ± SEM.

Nach dreitägiger Stimulation war der überwiegende Anteil an CD8<sup>+</sup> T-Zellen junger Mäuse T<sub>CM</sub> (74%). CD8<sup>+</sup> T-Zellen aus alten Mäusen wiesen hingegen signifikant weniger T<sub>CM</sub> und mehr T<sub>EM</sub> auf. Diese altersbedingten Unterschiede konnten sechs Tage nach Stimulation nicht mehr beobachtet werden. Mit 35% vs. 27% (T<sub>CM</sub>) und 58% vs. 68% (T<sub>EM</sub>) war die Verteilung der Subtypen in beiden Altersgruppen ähnlich (Abbildung 8B). Die stetige Zunahme an T<sub>EM</sub> in CD8<sup>+</sup> T-Zellen junger Mäuse korreliert hierbei erstaunlich gut mit der beobachteten schnelleren Lyse-Kinetik im Verlauf der *in vitro* Stimulation.

Neben der klassischen Differenzierung von naiven T-Zellen zu Gedächtnis-T-Zellen nach Antigen-Kontakt, machen zahlreiche Studien in den vergangenen Jahren deutlich, dass CD8<sup>+</sup> T-Zellen auch unabhängig der Exposition fremder Antigene in der Lage sind einen T<sub>CM</sub>-ähnlichen Phänotyp zu entwickeln (Akue et al., 2012; Lee et al., 2013; White et al., 2016). Diese Antigen-unerfahrenen Gedächtnis-T-Zellen werden als T<sub>VM</sub> (*virtual memory T cells*) definiert und zeichnen sich durch eine schnelle Initiation der Effektorfunktionen nach TZR-Stimulation aus (Hussain & Quinn, 2019). Sowohl in murinen als auch humanen CD8<sup>+</sup> T-Zellen ist eine Akkumulation der T<sub>VM</sub> im Alter beschrieben (Chiu et al., 2013; Quinn et al., 2018). Daher wurde der Anteil Antigen-unerfahrener T<sub>VM</sub> in den T-Zell-Gedächtnispopulationen von unstimulierten und stimulierten CD8<sup>+</sup> T-Zellen aus jungen und alten Mäusen durchflusszytometrisch quantifiziert (Abbildung 9). T<sub>VM</sub> exprimieren die Oberflächenmarker CD44 und CD62L, können aber durch die fehlende Expression von CD49d von klassischen T<sub>CM</sub> unterschieden werden (Hussain & Quinn, 2019).

In unstimulierten und stimulierten CD8<sup>+</sup> T-Zellen aus jungen Mäusen betrug der Anteil an T<sub>VM</sub> etwa 14% der Gesamt-Gedächtnispopulation (CD44<sup>+</sup>). Wie vermutet, nimmt die Anzahl an T<sub>VM</sub> im Alter zu und war mit 30% in unstimulierten und 41% in stimulierten CD8<sup>+</sup> T-Zellen aus alten Mäusen signifikant höher (Abbildung 9A und B). Entsprechend zeigte die Quantifizierung des T<sub>VM</sub>-Anteils innerhalb der T<sub>CM</sub>-Population (CD44<sup>+</sup> CD62L<sup>+</sup>) ebenfalls eine signifikante Erhöhung im Alter (Abbildung 9C und D). Vor Stimulation waren 62% der CD44<sup>+</sup> CD62L<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T-Zellen aus jungen Mäusen und 73% der Zellen aus alten Mäusen T<sub>VM</sub>. Nach dreitägiger Stimulation reduzierte sich der Anteil in beiden Altersgruppen auf 13% (jung) und 43% (alt).

T<sub>VM</sub> werden als Zellen mit hoher Zytotoxizität beschrieben, aber auch antigenspezifische T<sub>CM</sub> weisen nach TZR-Stimulation eine zytotoxische Aktivität auf. Inwieweit der Anteil an T<sub>VM</sub> das zytotoxische Potential der T<sub>CM</sub>-Population beeinflusst, ist bisher unklar.



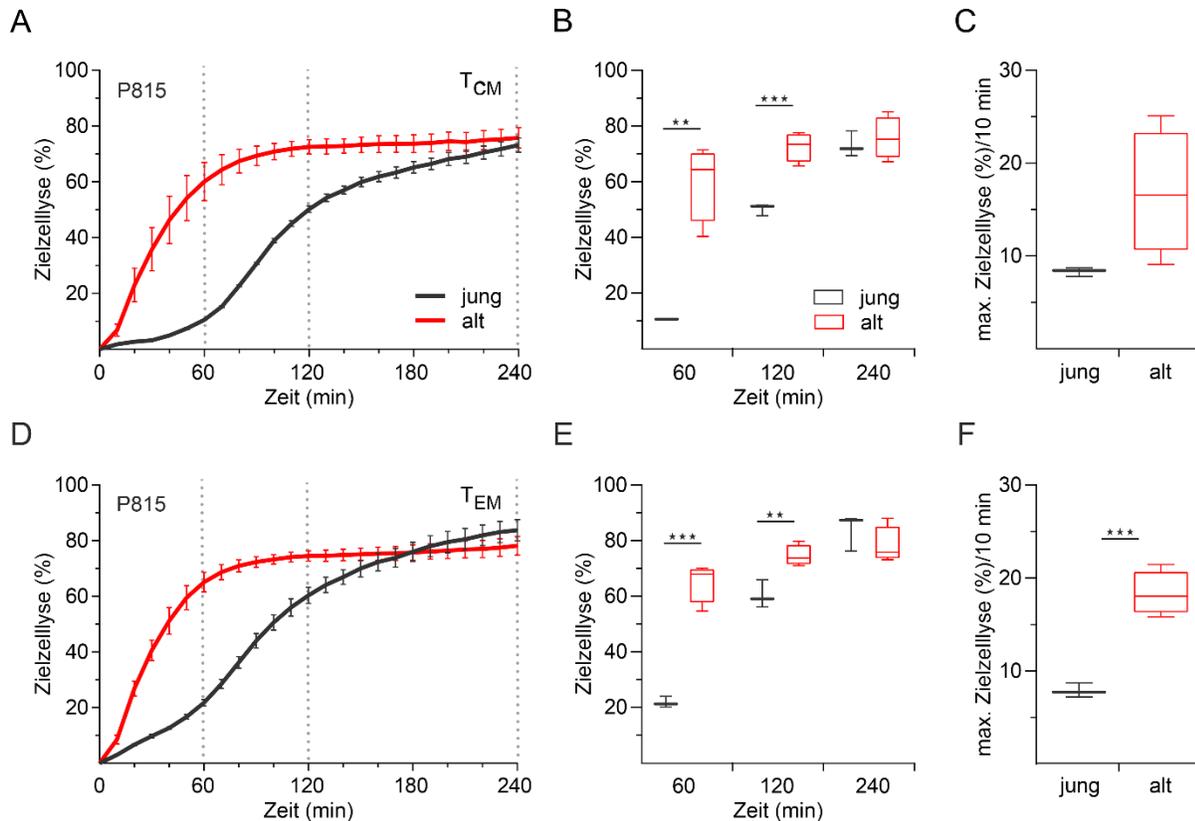
**Abbildung 9. Vermehrter Anteil an Antigen-unerfahrenen „T<sub>VM</sub>“-Gedächtnis-T-Zellen in CD8<sup>+</sup> T-Zellen aus alten Mäusen.** Durchflusszytometrische Analyse von CD49d<sup>-</sup> T<sub>VM</sub> (*virtual memory T cells*) in unstimulierten und stimulierten CD8<sup>+</sup> T-Zellen aus jungen und alten C57BL/6J Mäusen. (A) Repräsentative Gating-Strategie und (B) Quantifizierung der T<sub>VM</sub> innerhalb der CD44<sup>+</sup> T-Zell-Gedächtnispopulationen. (C) Repräsentative Gating-Strategie und (D) Quantifizierung der T<sub>VM</sub> innerhalb der CD44<sup>+</sup> CD62L<sup>+</sup> zentralen Gedächtnispopulation (T<sub>CM</sub>). Dargestellt sind die Mittelwerte ± SEM, n=4-7.

### 3.1.5 Veränderungen in der CD8<sup>+</sup> T-Zell-Subtypenverteilung tragen nicht maßgeblich

#### zur schnelleren Lyse-Kinetik im Alter bei

Obwohl beide CD8<sup>+</sup> T-Zell-Gedächtnispopulationen eine zytotoxische Aktivität aufweisen, wird den Effektor-Gedächtnis-Zellen aufgrund der hohen Expression von Effektormolekülen eine höherer Zytotoxizität zugeschrieben (Knörck et al., 2022). Die altersabhängige Anzahl von T<sub>N</sub>, T<sub>CM</sub> und T<sub>EM</sub> sowie die zunehmend schnellere Lyse-Kinetik junger CD8<sup>+</sup> T-Zellen bei steigendem T<sub>EM</sub>-Anteil im Verlauf der Kultivierung, ließ vermuten, dass die effiziente Zytotoxizität im Alter in erster Linie auf die unterschiedliche Verteilung der CD8<sup>+</sup> T-Zell-Subtypen zurückzuführen ist.

Um diese Hypothese zu bestätigen, wurden die Echtzeit-Zytotoxizitätsassays nach durchflusszytometrischer Sortierung der  $T_{CM}$ - und  $T_{EM}$ -Populationen aus drei Tage stimulierten  $CD8^+$  T-Zellen junger und alter Mäuse wiederholt (Abbildung 10).



**Abbildung 10. Schnelle Lyse-Kinetik in den  $T_{CM}$ - und  $T_{EM}$ -Gedächtnispopulationen von  $CD8^+$  T-Zellen aus alten Mäusen.**

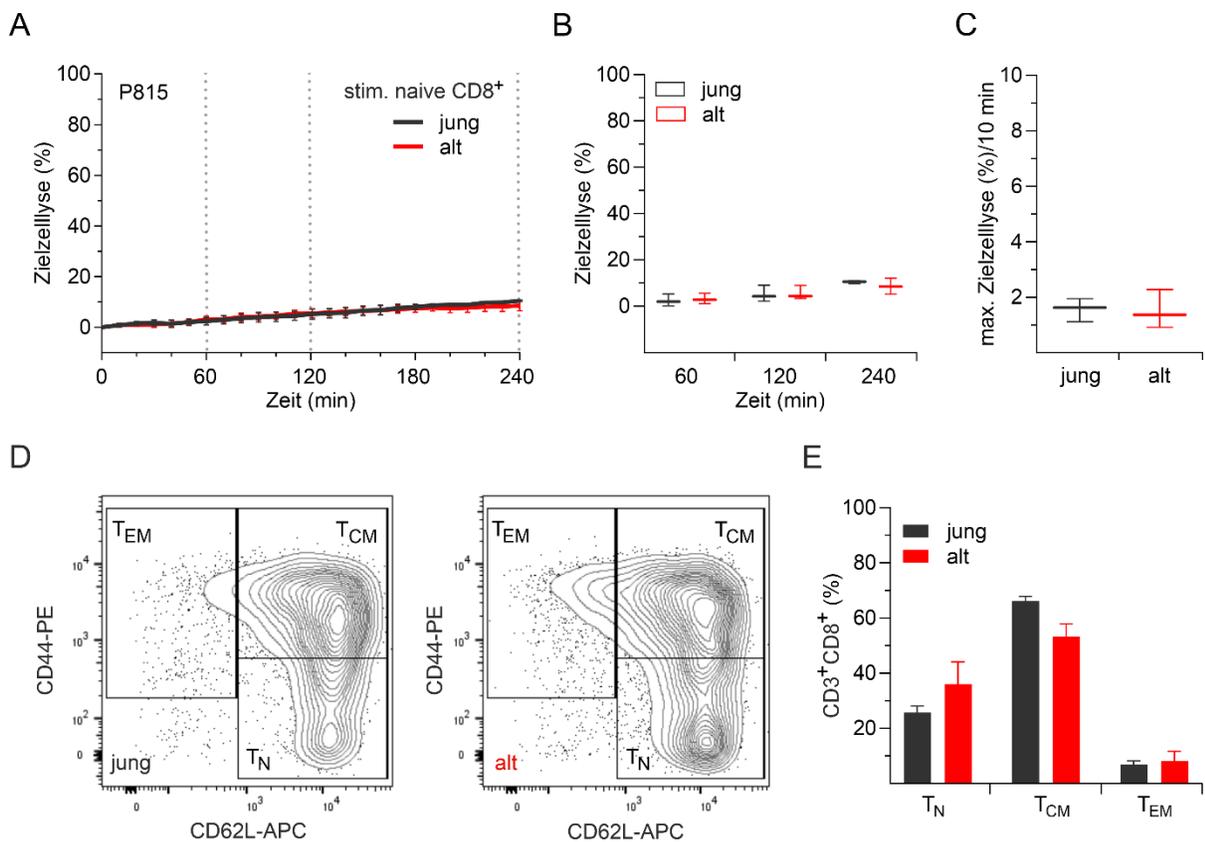
Echtzeit-Zytotoxizitätsassays nach durchflusszytometrischer Sortierung der  $T_{CM}$ - (A) und  $T_{EM}$ - (B) Gedächtnis-T-Zell-Population aus drei Tage stimulierten  $CD8^+$  T-Zellen junger (n=3) und alter (n=4) C57BL/6J Mäuse. Als Zielzellen diente die Mastozytom-Zelllinie P815 in einer Effektor:Zielzell-Ratio von 20:1. Boxplots repräsentieren die durchschnittliche Zielzelllyse nach 60, 120 und 240 min (B, E) und die maximale Lysekapazität/10 min (C, F). Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM. Modifiziert aus Zöphel et al., 2022.

Überraschenderweise war in beiden Gedächtnis-Populationen ( $T_{CM}$  und  $T_{EM}$ ) von  $CD8^+$  T-Zellen aus alten Mäusen eine nahezu identisch schnelle Lyse-Kinetik von P815-Zellen zu beobachten (Abbildung 10A, B und D, E). In  $CD8^+$  T-Zellen junger Mäuse konnte die bereits beschriebene, tendenziell höhere Zytotoxizität von  $T_{EM}$  hingegen bestätigt werden, gekennzeichnet durch eine etwas schnellere Lyse-Kinetik und höhere Endpunktlyse im Vergleich zu  $T_{CM}$ . Dennoch zeigten beide Gedächtnis-Populationen eine im Vergleich zu alten Mäusen signifikant verzögerte zytotoxische Aktivität innerhalb der ersten 120 min (Abbildung 10B und E). Die Quantifizierung der maximalen Zielzelllyse pro

10-min Intervall zeigte eine 2-fach ( $T_{CM}$ ) und 2,3-fach ( $T_{EM}$ ) höhere Lyserate durch  $CD8^+$  Gedächtnis-T-Zellen aus alten Mäusen (Abbildung 10C und F).

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass es im Alter zu Alterationen innerhalb beider Gedächtnispopulationen kommt, die mit einer erhöhten zytotoxischen Funktion einhergehen.

Verglichen mit naiven T-Zellen, zeichnen sich Gedächtnis-T-Zellen nach erneuter TZR-Stimulation durch eine schnellere Initiation der zytotoxischen Effektorfunktion aus (Berard & Tough, 2002). Angesichts des hohen Anteils naiver  $CD8^+$  T-Zellen in jungen Mäusen wurde die zytotoxische Aktivität der zuvor aus Splenozyten isolierten  $T_N$ -Populationen von jungen und alten Mäusen untersucht (Abbildung 11).

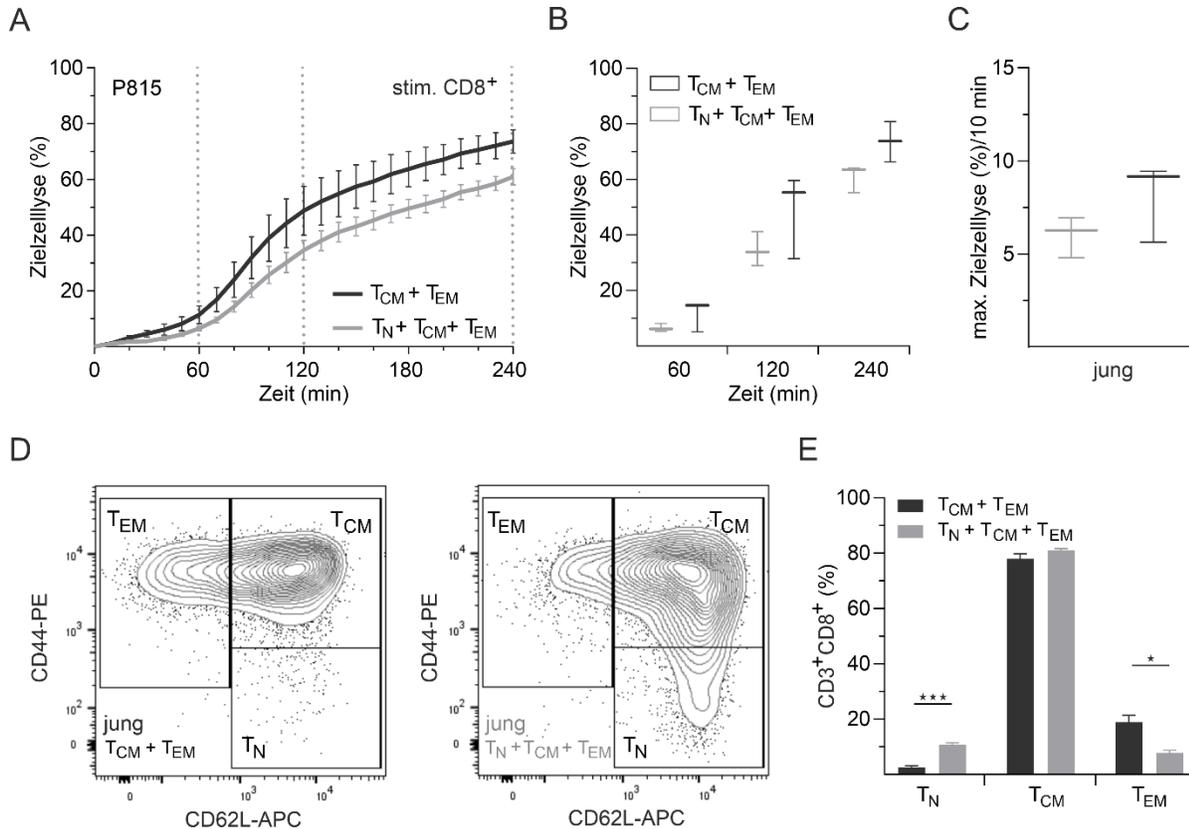


**Abbildung 11. Naive  $CD8^+$  T-Zellen aus jungen und alten Mäusen zeigen nach Stimulation keine zytotoxische Aktivität.**

(A) Echtzeit-Zytotoxizitätsassays mit naiven  $CD8^+$  T-Zellen aus jungen und alten C57BL/6J Mäusen, drei Tage nach polyklonaler *in vitro* Stimulation. Als Zielzellen diente die P815 Mastrozytom-Zelllinie in einer Effektor:Zielzell-Ratio von 10:1. Boxplots repräsentieren die durchschnittliche Zielzelllyse nach 60, 120 und 240 min (B) und die maximale Lysekapazität/10 min (C). Repräsentative Konturplots (D) und Quantifizierung (E) der Subtypenverteilung nach dreitägiger Stimulation. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM,  $n=3$ . Die Generierung der Daten erfolgte in Zusammenarbeit mit Chantal Hof. Modifiziert aus Zöphel et al., 2022.

In beiden Altersgruppen ließ sich nach dreitägiger Stimulation keine Zytotoxizität gegenüber P815-Zellen feststellen (Abbildung 11A-C). Zu diesem Zeitpunkt sind 66% der  $T_N$  aus jungen Mäusen und 53% der  $T_N$  aus alten Mäusen zu  $T_{CM}$  differenziert, 7% (jung) bzw. 8% (alt) zu  $T_{EM}$  (Abbildung 11D und E).

Ein signifikanter Unterschied in der Anzahl an  $T_N$ ,  $T_{CM}$  und  $T_{EM}$  konnte nicht beobachtet werden, was vermuten lässt, dass das zellintrinsische Differenzierungspotenzial von naiven T-Zellen im Alter weitgehend unverändert bleibt.



**Abbildung 12. Die Lyse-Kinetik von  $CD8^+$  T-Zellen junger Mäuse wird nicht durch den Anteil naiver Zellen bestimmt.**

(A) Echtzeit-Zytotoxizitätsassays mit sortierten naiven und Gedächtnis-T-Zellen aus jungen C57BL/6J Mäusen, drei Tage nach polyklonaler *in vitro* Stimulation. Sortierte  $T_{CM} + T_{EM}$  wurden entweder ohne oder mit sortierten  $T_N$  in einem Verhältnis von 60:40% ( $T_N:T_{CM}+T_{EM}$ ) stimuliert. Als Zielzellen diente die Mastozytom-Zelllinie P815 in einer Effektor:Zielzell-Ratio von 20:1. Boxplots repräsentieren die durchschnittliche Zielzelllyse nach 60, 120 und 240 min (B) und die maximale Lysekapazität/10 min (C). Repräsentative Konturplots (D) und Quantifizierung (E) der Subtypenverteilung nach dreitägiger Stimulation. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM,  $n=3$ . Modifiziert aus Zöphel et al., 2022.

Aufgrund der Tatsache, dass naive T-Zellen nach Stimulation zwar zu  $T_{CM}$  differenzieren, diese Population jedoch keine Zytotoxizität aufweist, stellte sich die Frage, welchen Einfluss der hohe Anteil an  $T_N$  in unstimulierten Zellen auf die Lyse-Kinetik der  $CD8^+$  T-Zellen junger Mäuse hat. Daher wurden

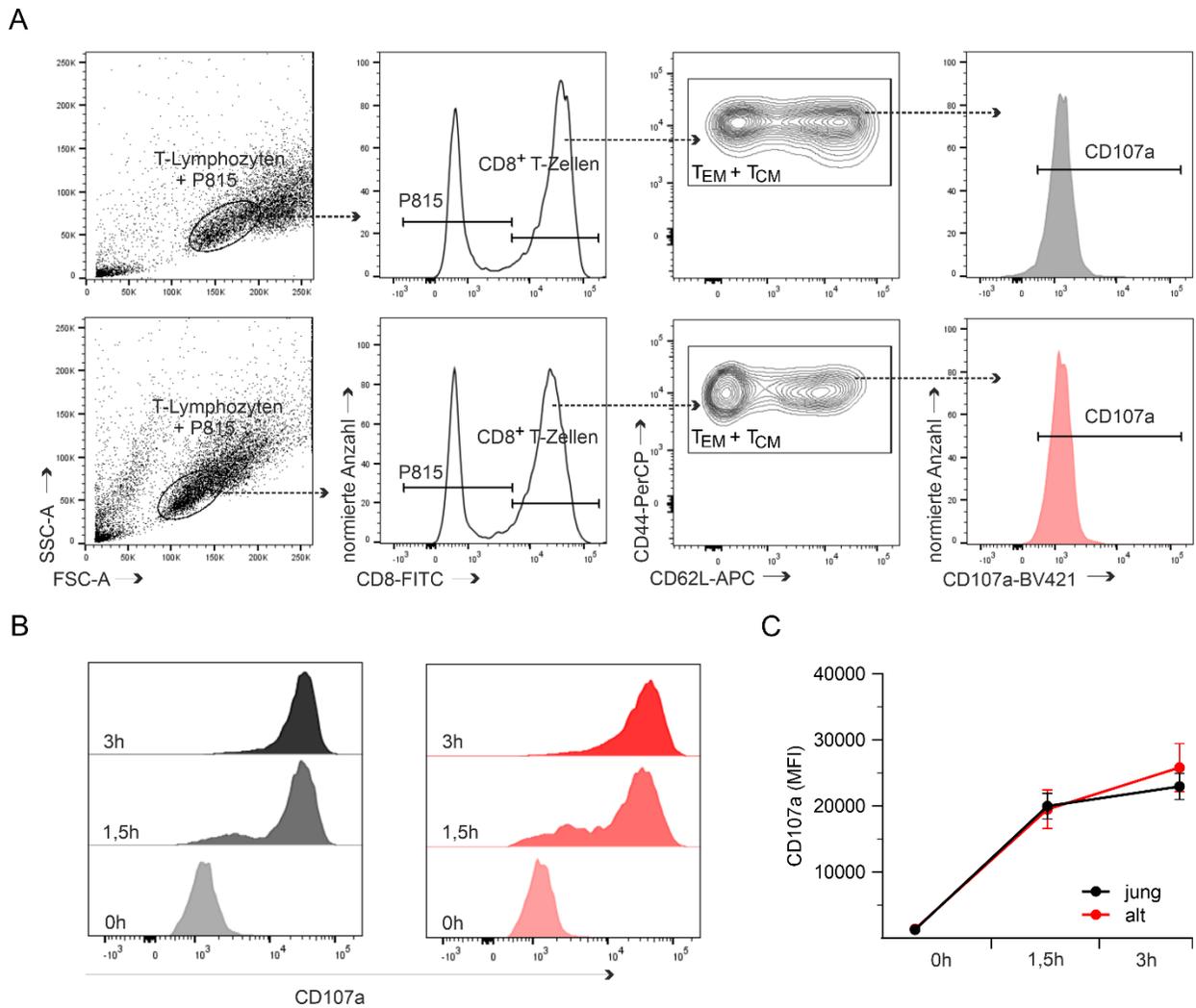
naive CD8<sup>+</sup> T-Zellen sowie die CD8<sup>+</sup> Gedächtnis-Populationen aus Splenozyten junger Mäuse sortiert und T<sub>CM</sub>+T<sub>EM</sub> in Abwesenheit von T<sub>N</sub> und zusammen mit T<sub>N</sub> in einem Verhältnis von 60:40% (T<sub>N</sub>:T<sub>CM</sub>+T<sub>EM</sub>) stimuliert. Das gewählte Verhältnis zwischen naiven und Gedächtnis-T-Zellen entspricht dabei in etwa der üblicherweise in jungen Mäusen vorkommenden Verteilung dieser CD8<sup>+</sup> Populationen. Der Echtzeit-Zytotoxizitätsassay nach dreitägiger Stimulation zeigte in beiden Fällen, die für junge Mäuse typische, verzögerte Zielzelllyse von P815 Mastozytom-Zellen (Abbildung 12A). Obwohl die Abwesenheit naiver T-Zellen insgesamt zu einer etwas höheren Zytotoxizität führte, konnten im Vergleich zur Gesamt-Population keine signifikanten Unterschiede in der Lyse-Kinetik und maximalen Lyserate beobachtet werden (Abbildung 12B und C). Die durchflusszytometrische Analyse der Subtypenverteilung zeigte bei Stimulation in Anwesenheit naiver T-Zellen nach drei Tagen eine vergleichbare Anzahl an T<sub>CM</sub> aber signifikant weniger T<sub>EM</sub> (Abbildung 12D und E).

Insgesamt zeigten die Ergebnisse, dass weder der geringe Anteil naiver T-Zellen, noch die Verteilung der CD8<sup>+</sup> Gedächtnispopulationen ausschlaggebend für die schnelle Zytotoxizität im Alter sind.

### 3.1.6 Die zelleigene Fähigkeit zur Degranulation lytischer Granula ist im Alter unverändert

Die verzögerte zytotoxische Funktion beider CD8<sup>+</sup> Gedächtnispopulationen aus jungen Mäusen und die im Gegensatz dazu erhöhte Zytotoxizität von T<sub>CM</sub> und T<sub>EM</sub> im Alter legen grundsätzliche, altersabhängige Unterschiede in den Zytotoxizitätsmechanismen nahe.

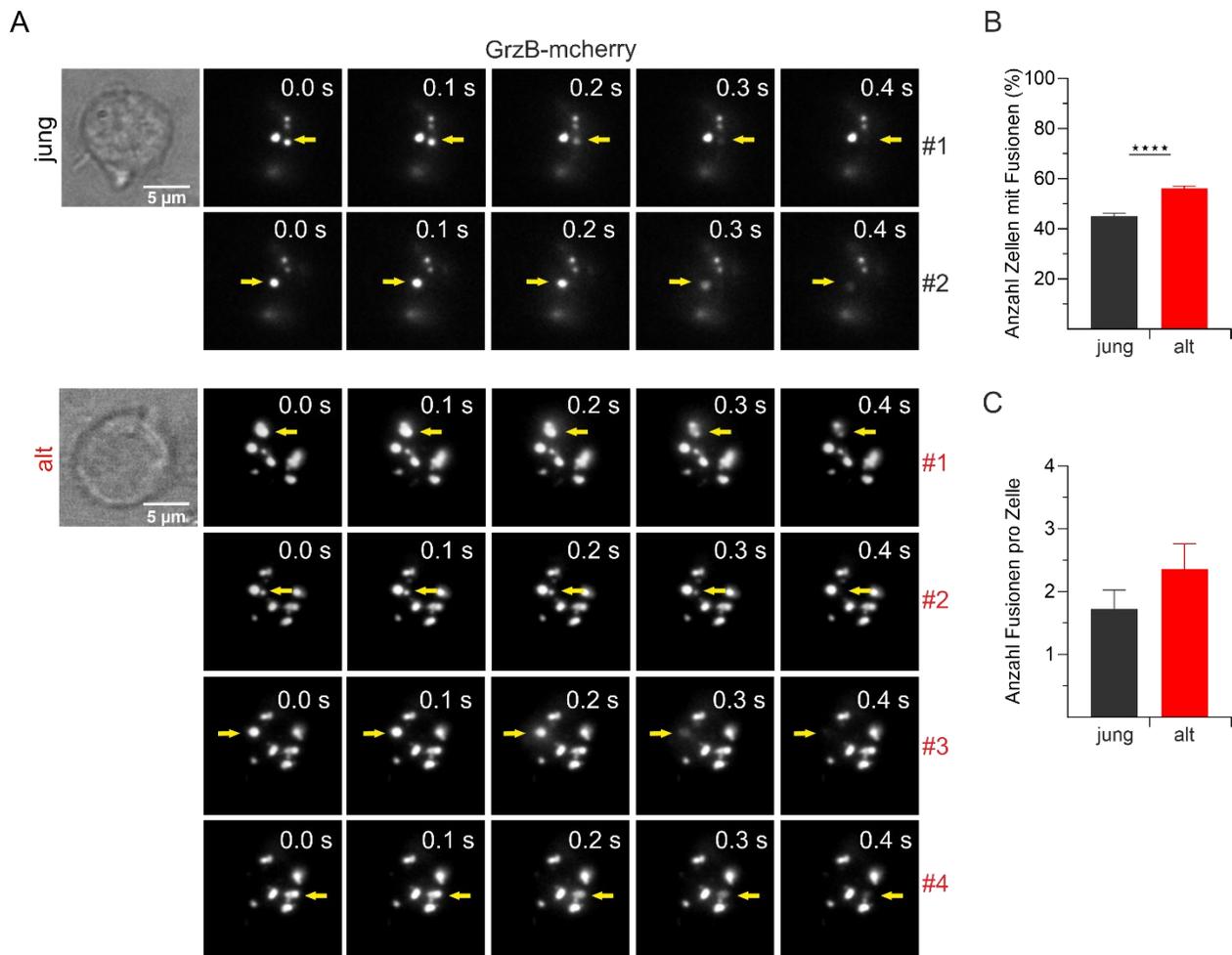
Die Freisetzung lytischer Granula ist ein wesentlicher Mechanismus zur schnellen Abtötung von Zielzellen. Die Vesikel tragen das Lysosom-assoziierte Membranprotein-1 (LAMP-1, CD107a) auf der Oberfläche, dass bei Fusion der Granula an der Plasmamembran detektiert werden kann. Dies ermöglicht eine durchflusszytometrische Analyse des Degranulationsverhaltens von CD8<sup>+</sup> T-Zellen nach Zielzellkontakt (Rubio et al., 2003). Um mögliche altersbedingte Veränderungen der Granula-Exozytose-vermittelten Zytotoxizität zu untersuchen, wurden drei Tage stimulierte CD8<sup>+</sup> T-Zellen aus jungen und alten Mäusen mit P815 Mastozytom-Zellen und einem anti-CD107a-Antikörper inkubiert. Nach 0h, 1,5h und 3h wurde die CD107a-Expression in den CD8<sup>+</sup> Gedächtnispopulationen T<sub>CM</sub> und T<sub>EM</sub> durchflusszytometrisch analysiert (Abbildung 13A). Die deutliche Erhöhung von CD107a auf der Zelloberfläche nach 1,5h und 3h bestätigte die Degranulation lytischer Granula nach Zielzellkontakt in beiden Altersgruppen (Abbildung 13B). Ein signifikanter Unterschied in der mittleren Fluoreszenzintensität (MFI) konnte jedoch zu keinem der analysierten Zeitpunkte festgestellt werden (Abbildung 13C).



**Abbildung 13.** CD8<sup>+</sup> Zellen aus jungen und alten Mäusen zeigen eine vergleichbare Degranulation der lytischen Granula. CD107a-basierter Degranulationsassay mit stimulierten CD8<sup>+</sup> T-Zellen aus jungen und alten C57BL/6J Mäusen nach Inkubation mit P815 Mastozytom-Zellen in einer 1:1 Effektor:Ziel-Ratio. (A) Repräsentative Gating-Strategie zur Analyse der CD107a-Expression in den CD8<sup>+</sup> T<sub>CM</sub> und T<sub>EM</sub>-Gedächtnispopulationen. Repräsentative Histogramme der CD107a-Mobilisation (B) und Quantifizierung der mittleren Fluoreszenzintensität (MFI) (C) zu den verschiedenen Zeitpunkten nach Zielzellkontakt. Dargestellt sind die Mittelwerte ± SEM, n=6. Modifiziert aus Zöphel et al., 2022.

Zur Bestätigung dieser Ergebnisse wurde in Kooperation mit der AG Rettig (zelluläre Neurophysiologie, CIPMM) eine detailliertere Analyse der Vesikel-Fusionen auf Einzelzellebene durchgeführt. Dafür wurden stimulierte CD8<sup>+</sup> T-Zellen aus jungen und alten Mäusen mit einem pMAX-GranzymB-mCherry-Konstrukt transfiziert und die Anzahl der Fusionen nach Bindung der Zellen an einen immobilisierten anti-CD3ε-Antikörper mittels TIRF-Mikroskopie analysiert (Abbildung 14A). Die Anzahl der CD8<sup>+</sup> T-Zellen mit detektierten Vesikel-Fusionen war im Alter signifikant erhöht (Abbildung 14B),

allerdings zeigte sich mit durchschnittlich 1,7 (jung) und 2,3 (alt) Fusionen pro Zelle, kein signifikanter Unterschied in der zelleigenen Degranulationsfähigkeit (Abbildung 14C).

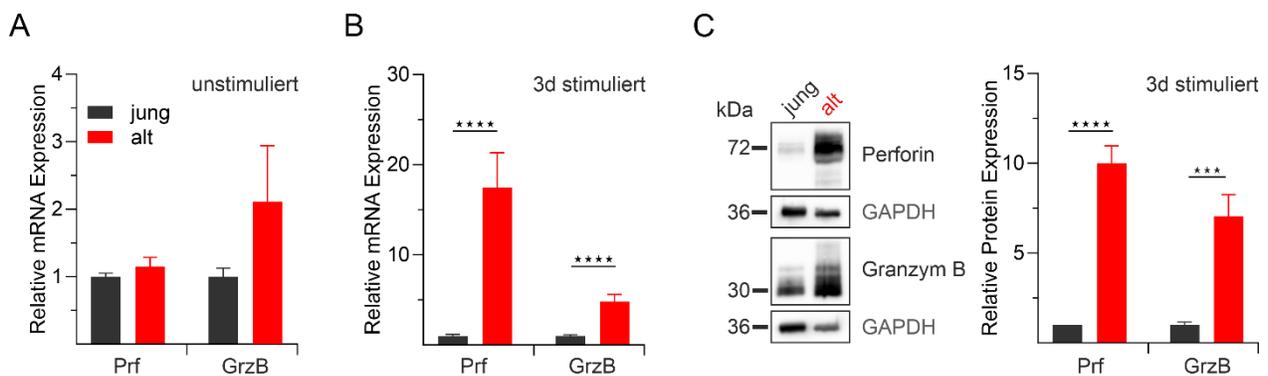


**Abbildung 14. Erhöhte Anzahl von CD8<sup>+</sup> T-Zellen mit Vesikel-Fusionen bei unveränderter zelleigener Degranulationsfähigkeit im Alter.** Interne Totalreflexionsfluoreszenzmikroskopie (TIRFM) 12h nach Transfektion stimulierter CD8<sup>+</sup> T-Zellen aus jungen und alten C57BL/6J Mäusen mit pMAX-GranzymB-mCherry. (A) Repräsentative TIRF-Aufnahmen nach Bindung der Zellen an immobilisierte anti-CD3 $\epsilon$ -Antikörper. Dargestellt sind die einzelnen Vesikel-Fusionen innerhalb einer Zelle (den Zahlen rechts entsprechend). Der plötzliche Abfall der GranzymB-mCherry-Fluoreszenz innerhalb von 0,3 s wurde als Fusionsereignis definiert und ist durch die jeweiligen Pfeile gekennzeichnet. Die Diagramme zeigen den prozentualen Anteil an CD8<sup>+</sup> T-Zellen mit Vesikel-Fusionen (B) und die durchschnittliche Anzahl detektierter Fusionen innerhalb einer Zelle (C). Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM, n=5. Die Generierung der Daten erfolgte durch Keerthana Ravichandran (Kooperation AG Rettig). Modifiziert aus Zöphel et al., 2022.

In Übereinstimmung mit den Ergebnissen der durchflusszytometrischen Analyse, scheint die schnelle Zytotoxizität im Alter somit nicht auf einer vermehrten Degranulation lytischer Granula zu beruhen.

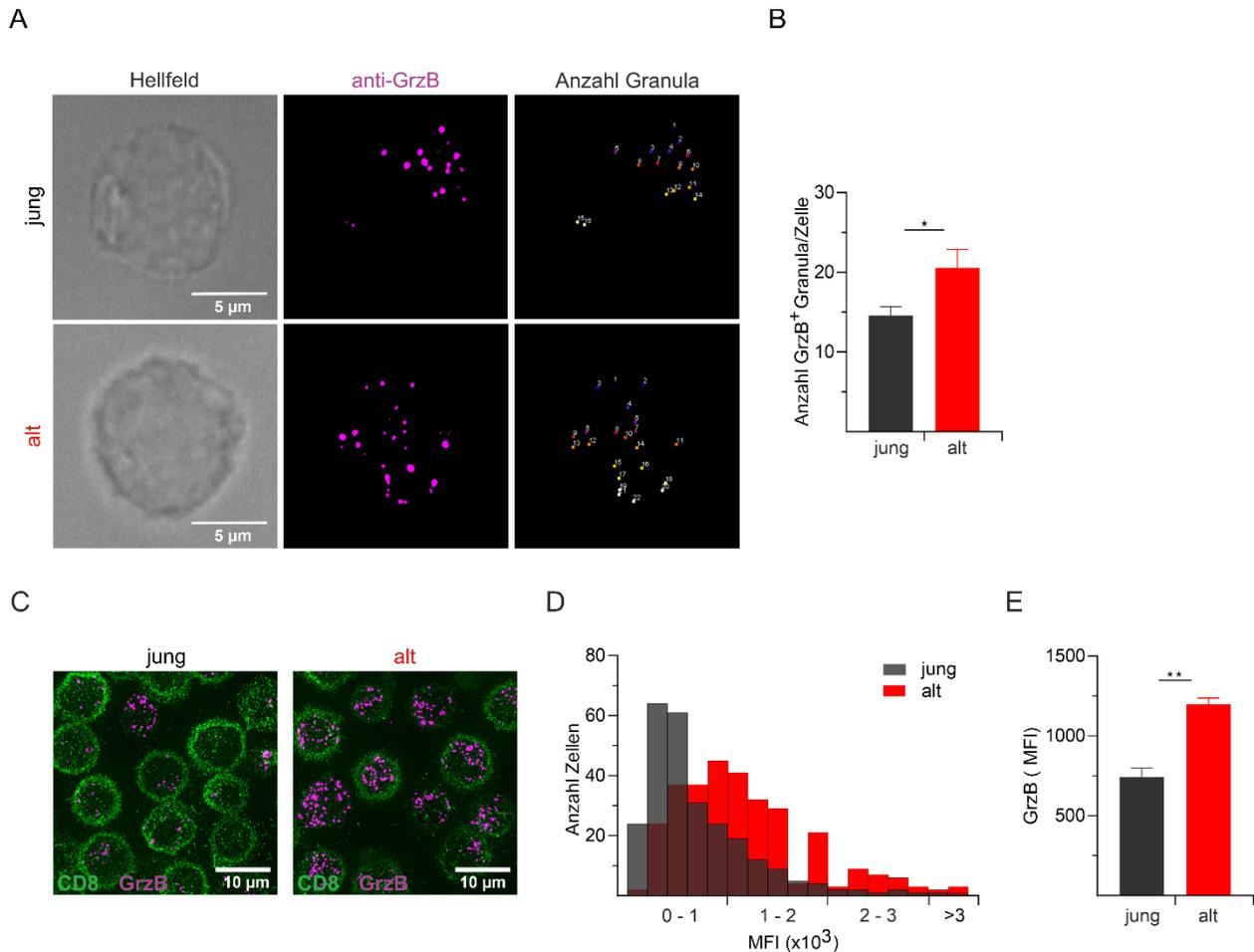
### 3.1.7 Erhöhte Expression von Granzym B und Perforin in CD8<sup>+</sup> T-Zellen aus alten Mäusen

Da die vermutete, schnelle Granula-Exozytose-vermittelte Zytotoxizität im Alter nicht durch Veränderungen im Degranulationsverhalten erklärt werden konnte, wurde im nächsten Schritt die Expression der in den lytischen Granula enthaltenen Effektormoleküle Perforin und Granzym B quantifiziert. Dafür wurden qPCR- und Westernblot-Analysen in unstimulierten und stimulierten CD8<sup>+</sup> T-Zellen aus jungen und alten Mäusen durchgeführt. Die entsprechenden Expressionslevel in CD8<sup>+</sup> T-Zellen aus alten Mäusen wurden auf Referenzgene normiert und relativ zum normierten Expressionslevel junger Mäuse quantifiziert (Abbildung 15). Erwartungsgemäß führte die Stimulation der Zellen zu einer starken Erhöhung der mRNA-Expression von Perforin und Granzym B. Während bei unstimulierten CD8<sup>+</sup> T-Zellen keine signifikanten Unterschiede zwischen den Altersgruppen festgestellt werden konnte, zeigten CD8<sup>+</sup> T-Zellen aus alten Mäusen nach dreitägiger Stimulation eine signifikant, um das 5-fach erhöhte Expression von Granzym B und eine um das 19-fach erhöhte Expression von Perforin (Abbildung 15A und B). Die densitometrische Analyse der durchgeführten Westernblots bestätigte die signifikant höhere Expression von Granzym B und Perforin im Alter (Abbildung 15C).



**Abbildung 15. Erhöhte Expression der Effektormoleküle Perforin und Granzym B im Alter.** Normalisierte mRNA-Expression von Perforin (Prf) und Granzym B (GrzB) in unstimulierten (A) und drei Tage stimulierten (B) CD8<sup>+</sup> T-Zellen aus jungen (n=8-13) und alten (n=7-8) C57BL/6J Mäusen. Die Expressionslevel wurden auf die Referenzgene Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase 1 (HPRT1) und TATA-Box-Bindungsprotein (TBP) normalisiert und sind relativ zur Expression von CD8<sup>+</sup> T-Zellen junger Mäuse angegeben. (C) Repräsentativer Westernblot und densitometrische Quantifizierung der Perforin- und Granzym B-Proteinexpression in drei Tage stimulierten CD8<sup>+</sup> T-Zellen mit Hypoxanthin-Guanin-Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) als Referenzprotein (n=5-6). Dargestellt sind die Mittelwerte ± SEM. Die Generierung der qPCR- und Westernblot-Daten erfolgte in Zusammenarbeit mit Sandra Janku. Modifiziert aus Zöphel et al., 2022.

Für eine umfassendere Beurteilung der Expression lytischer Effektormoleküle auf Einzelzellebene wurden stimulierte  $CD8^+$  T-Zellen aus jungen und alten Mäusen mit einem anti-Granzym B-Antikörper intrazellulär gefärbt und mittels strukturierter Beleuchtungsmikroskopie (SIM; *Structured Illumination Microscopy*) analysiert (Abbildung 16A). Dabei zeigte sich, dass  $CD8^+$  T-Zellen im Alter eine signifikant höhere Anzahl Granzym B-positiver Granula pro Zelle aufweisen (Abbildung 16B).



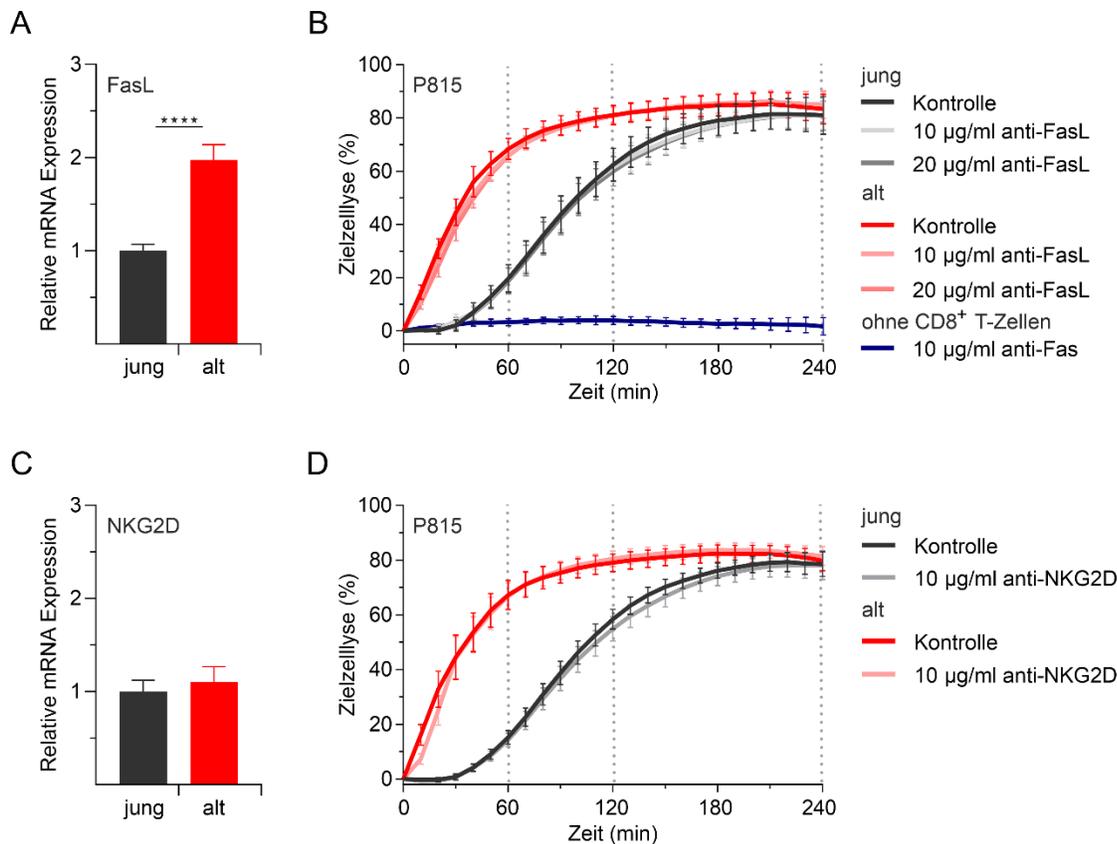
**Abbildung 16. Altersbedingte Unterschiede in der Anzahl Granzym B-positiver lytischer Granula.** Doppel-Immunfluoreszenzfärbung mit Antikörpern gegen CD8 und Granzym B (GrzB) in drei Tage stimulierten  $CD8^+$  T-Zellen aus jungen und alten C57BL/6J Mäusen. Repräsentative SIM-Aufnahmen der detektierten Granula innerhalb einer  $CD8^+$  T-Zelle (A) und Quantifizierung (B) der Anzahl GrzB-positiver Granula pro Zelle. (C) Repräsentative SIM-Aufnahmen der Verteilung GrzB-positiver Granula innerhalb der  $CD8^+$  T-Zell-Population von jungen und alten Mäusen. (D) Histogramm der mittleren Fluoreszenzintensität (Bin-Breite 200) und Quantifizierung der Gesamt-MFI von Granzym B in  $CD8^+$  T-Zellen (E). Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM,  $n=5-7$ . Die Generierung der Daten erfolgte in Zusammenarbeit mit Keerthana Ravichandran (Kooperation AG Rettig). Modifiziert aus Zöphel et al., 2022.

In CD8<sup>+</sup> T-Zellen aus jungen Mäusen ließ sich in einem erheblichen Anteil der Zellen überhaupt kein oder nur sehr wenig Granzym B nachweisen (Abbildung 16C). Die Quantifizierung der mittleren Fluoreszenzintensität bestätigte die unterschiedliche Verteilung von Granzym B innerhalb der CD8<sup>+</sup> T-Zell-Populationen, wobei viele CD8<sup>+</sup> T-Zellen aus jungen Mäusen eine niedrige MFI und nur sehr wenige Zellen eine hohe MFI aufweisen (Abbildung 16D). Die Gesamt-MFI von Granzym B ist in CD8<sup>+</sup> T-Zellen aus alten Mäusen signifikant um das 1,6-fache erhöht (Abbildung 16E).

Diese Ergebnisse lieferten erstmals eine mögliche Erklärung für die altersbedingten Unterschiede in der Kinetik der Zielzellyse von CD8<sup>+</sup> T-Zellen, schließen eine mögliche Beteiligung andere Zytotoxizitätsmechanismen jedoch nicht aus.

Um dieser Frage nachzugehen erfolgte eine nähere Charakterisierung der zwei für die zytotoxische Funktion von CD8<sup>+</sup> T-Zellen relevanten Rezeptor-vermittelten Signalwege über Fas/FasL und NKG2D (Strasser et al., 2009; Verneris et al., 2004). Dafür wurden sowohl mögliche altersbedingte Unterschiede in der mRNA-Expression von NKG2D und FasL als auch deren direkten Einfluss auf die Lyse-Kinetik der CD8<sup>+</sup> T-Zellen untersucht (Abbildung 17). CD8<sup>+</sup> T-Zellen aus alten Mäusen zeigten nach dreitägiger Stimulation eine signifikante, um das 2-fache erhöhte Expression von FasL (Abbildung 17A). Ein Einfluss des Fas/FasL-Signalweges auf die Zytotoxizität gegen P815 Mastozytom-Zellen konnte jedoch nicht festgestellt werden. Die Antikörper-vermittelte Blockierung des Fas-Liganden im Echtzeit-Zytotoxizitätsassay führte in beiden Altersgruppen zu keinerlei Veränderung in der Lyse-Kinetik (Abbildung 17B). Durch die Antikörper-induzierte Aktivierung des Fas-Rezeptors auf den Zielzellen konnte ebenfalls keine Zytolyse detektiert werden, was darauf hindeutet, dass dieser Zytotoxizitätsmechanismus entweder sehr spät nachweisbar ist oder auf Grund der geringen Fas-Expression auf P815-Zellen (Saxena & Adler, 1999), wenn überhaupt, nur eine untergeordnete Rolle spielt. Die Analyse der mRNA-Expression von NKG2D zeigte keine altersbedingten Unterschiede (Abbildung 17C). Auch hier konnte in beiden Altersgruppen keine Veränderung der Lyse-Kinetik nach Rezeptor-Blockierung beobachtet werden (Abbildung 17D).

Zusammengenommen erlauben diese Ergebnisse die Schlussfolgerung, dass die schnelle Zytotoxizität im Alter weniger durch Alterationen in Rezeptor-vermittelten Signalwegen, sondern vielmehr durch die erhöhte Expression der lytischen Effektormoleküle Granzym B und Perforin bedingt ist.



**Abbildung 17. Die schnelle Lyse-Kinetik von CD8<sup>+</sup> T-Zellen im Alter ist unabhängig von der FasL- und NKG2D-vermittelten Zytotoxizität.** Normalisierte mRNA-Expression von FasL (A) und NKG2D (C) in drei Tage stimulierten CD8<sup>+</sup> T-Zellen aus jungen (n=7-8) und alten (n=4-6) C57BL/6J Mäusen. Die Expressionslevel wurden auf die Referenzgene Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase 1 (HPRT1) und TATA-Box-Bindungsprotein (TBP) normalisiert und sind relativ zur Expression von CD8<sup>+</sup> T-Zellen junger Mäuse angegeben. Echtzeit-Zytotoxizitätsassays nach Zugabe eines aktivierenden anti-Fas-Antiköpers (ohne CD8<sup>+</sup> T-Zellen) oder Behandlung der CD8<sup>+</sup> T-Zellen mit blockierenden Antikörpern gegen FasL (B) und NKG2D (D). Als Zielzellen diente die Mastozytom-Zelllinie P815 in einer Effektor:Zielzell-Ratio von 20:1 (n=4-5). Dargestellt sind die Mittelwerte ± SEM. Die Generierung der qPCR-Daten erfolgte in Zusammenarbeit mit Sandra Janku. Modifiziert aus Zöphel et al., 2022.

### 3.1.8 Einfluss variierender Interleukin-2 Konzentrationen auf die Zytotoxizität von CD8<sup>+</sup> T-Zellen aus jungen und alten Mäusen

Neben der initialen T-Zell-Rezeptor-Aktivierung durch anti-CD3/CD28 Beads, werden CD8<sup>+</sup> T-Zellen während der *in vitro* Kultivierung standardmäßig mit Interleukin-2 (IL-2) stimuliert. Während das für eine hinreichende Stimulation notwendige Verhältnis von Aktivierungs-Beads und CD8<sup>+</sup> T-Zellen vom Hersteller klar definiert ist, variieren die in der Literatur angegebenen Konzentrationen an IL-2, abhängig vom Studiendesign, zum Teil erheblich. Zudem liefern Studien über Veränderungen der IL-2-Sekretion im Alter mitunter widersprüchliche Ergebnisse (Effros & Walford, 1983; Engwerda et al., 1996; Pieren et al., 2019; Van Epps et al., 2014). Da IL-2 neben seiner Beteiligung an Proliferation und Differenzierung,

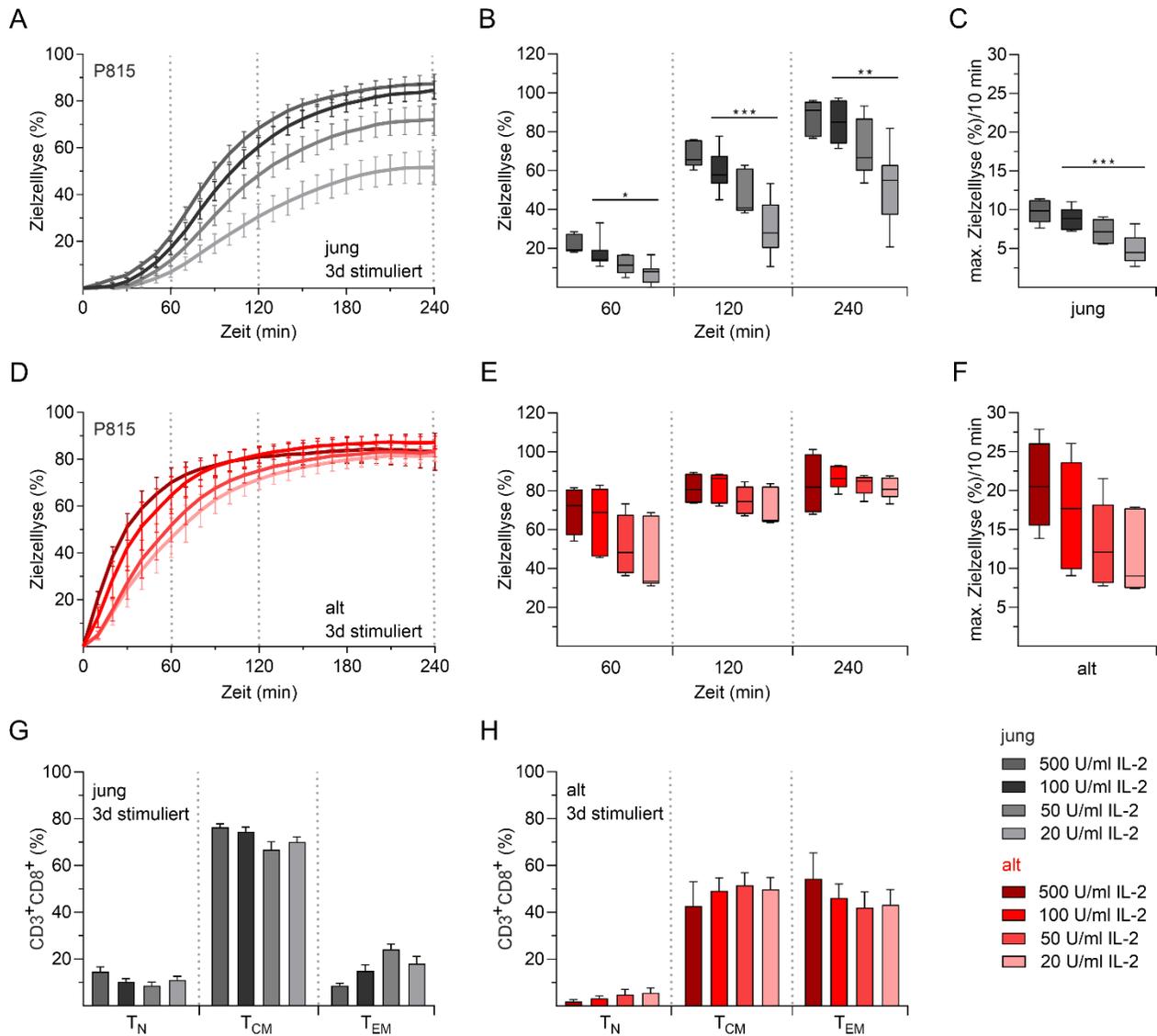
ebenfalls direkten Einfluss auf die Expression von Granzym B und Perforin nimmt (Janas et al., 2005; Zhang et al., 1999), wurde die Differenzierung und zytotoxische Funktion der CD8<sup>+</sup> T-Zellen bei hoher (500 U/ml) und geringer (50 und 20 U/ml) IL-2 Konzentration untersucht.

Die dreitägige Stimulation mit 500 und 50 U/ml IL-2 führte zu keiner signifikanten Veränderung der zytotoxischen Aktivität von CD8<sup>+</sup> T-Zellen aus jungen Mäusen (Abbildung 18A). Die Reduktion auf 20 U/ml hatte jedoch im Vergleich zur Stimulation mit 100 U/ml eine signifikant geringere Zytotoxizität zur Folge, mit einer Differenz der Zielzellyse von 10% nach 60 min, 30% nach 120 min und 33% nach 240 min (Abbildung 18B). Die Quantifizierung der maximalen Zielzellyse pro 10-min Intervall zeigte eine 1,9-fach verringerte Lyserate bei Stimulation der CD8<sup>+</sup> T-Zellen mit 20 U/ml IL-2 (Abbildung 18C). Überraschenderweise hatte die Reduktion der IL-2 Konzentration jedoch kaum Einfluss auf die zytotoxische Funktion der CD8<sup>+</sup> T-Zellen aus alten Mäusen (Abbildung 18D). Die verringerte IL-2 Konzentration in den ersten drei Tagen führte zwar auch hier zu einer leicht verzögerten Zytotoxizität, die Unterschiede in der Zielzellyse waren jedoch zu keinem Zeitpunkt signifikant (Abbildung 18E und F). Die durchflusszytometrische Analyse der CD8<sup>+</sup> Subtypenverteilung zeigte in beiden Altersgruppen keine signifikanten Unterschiede zwischen den variierenden IL-2 Konzentrationen (Abbildung 18G und H).

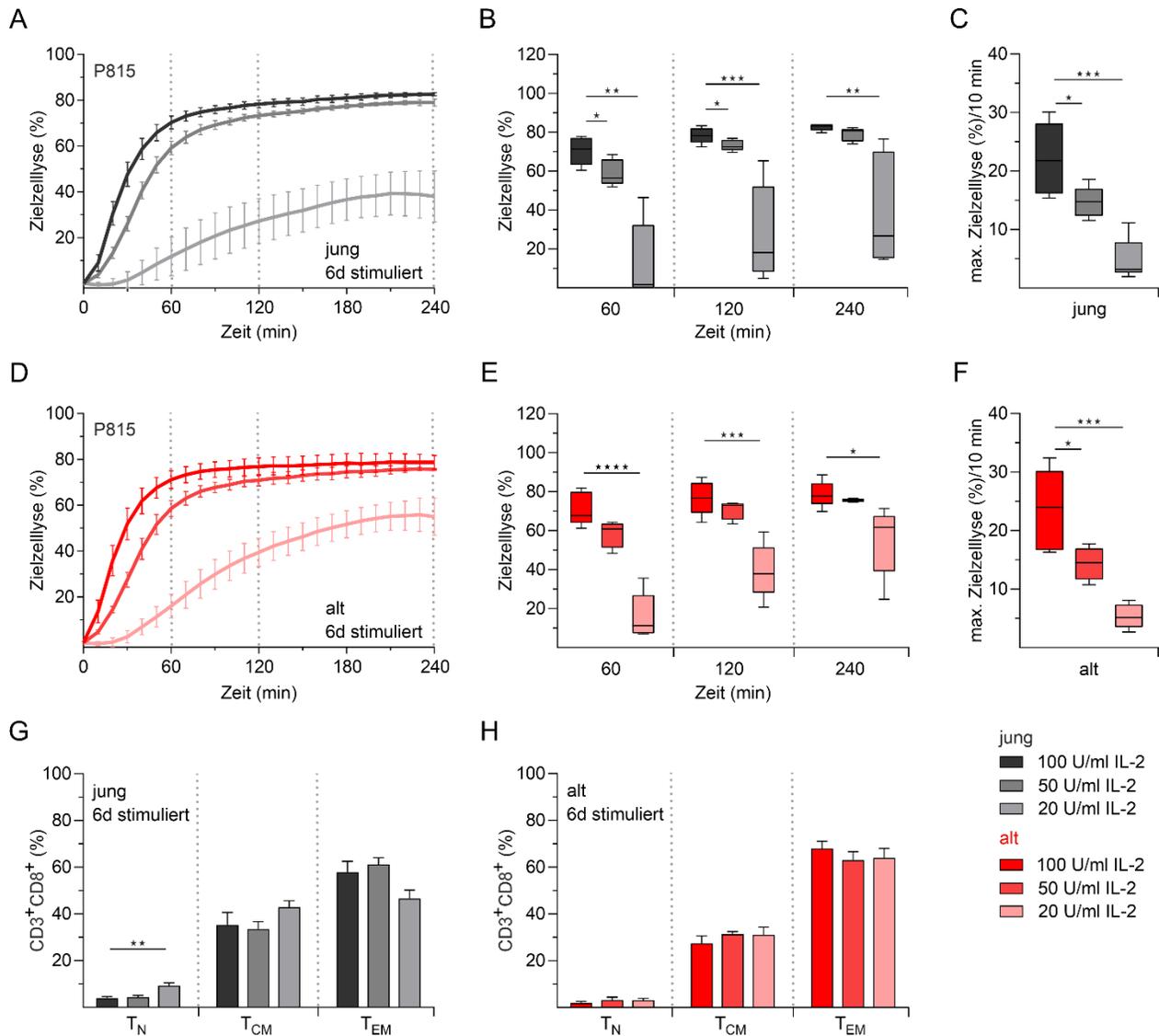
Nach sechstägiger Stimulation der CD8<sup>+</sup> T-Zellen mit reduzierten IL-2 Konzentrationen waren in beiden Altersgruppen signifikante Unterschiede in der Zytotoxizität zu beobachten (Abbildung 19). Während die Stimulation mit 50 U/ml IL-2 zu einer leichten Abnahme der Zytotoxizität führte, zeigte sich bei Reduktion der IL-2 Konzentration auf 20 U/ml in beiden Fällen eine deutliche Verzögerung der Lyse-Kinetik (Abbildung 19A, B und D, E) und einer Differenz der Endpunkt-Lyse von 45% (jung) und 24% (alt). Die maximale Lyserate pro 10 min-Intervall war im Vergleich zur Stimulation mit 100 U/ml IL-2 sowohl bei 50 als auch bei 20 U/ml signifikant verringert (Abbildung 19C und F).

Entgegen der Erwartung konnte im Verlauf der Stimulation kein wesentlicher Einfluss der reduzierten IL-2 Konzentration auf die Differenzierung der CD8<sup>+</sup> T-Zellen festgestellt werden (Abbildung 19G und H). CD8<sup>+</sup> T-Zellen junger Mäuse zeigten bei 20 U/ml IL-2 nach 6 Tagen einen etwas höheren Anteil an T<sub>N</sub> und T<sub>CM</sub> bei verringertem Anteil an T<sub>EM</sub> verglichen mit der Zugabe von 50 und 100 U/ml IL-2. Die Unterschiede waren jedoch gering. Die Subtypenverteilung in CD8<sup>+</sup> T-Zellen aus alten Mäusen war bei allen eingesetzten IL-2 Konzentrationen vergleichbar.

Insgesamt zeigte sich, dass CD8<sup>+</sup> T-Zellen im Alter auch bei niedrigen IL-2 Spiegeln eine hohe zytotoxische Effizienz aufweisen. Ein Mangel dieses Zytokins im Verlauf der Stimulation führt jedoch trotz adäquater Differenzierung zu einer deutlichen Abnahme der Zytotoxizität.



**Abbildung 18. Einfluss variierender IL-2 Konzentrationen auf die Zytotoxizität und Differenzierung von CD8<sup>+</sup> T-Zellen aus jungen und alten Mäusen nach dreitägiger Stimulation.** Echtzeit-Zytotoxizitätsassays mit CD8<sup>+</sup> T-Zellen aus jungen (A) und alten (B) C57BL/6J Mäusen nach dreitägiger Stimulation mit unterschiedlichen Interleukin-2 (IL-2) Konzentrationen. Als Zielzellen diente die Mastozytom-Zelllinie P815 in einer Effektor:Zielzell-Ratio von 20:1. Boxplots repräsentieren die durchschnittliche Zielzellyse nach 60, 120 und 240 min (B, E) und die maximale Lysekapazität/10 min (C, F). Durchflusszytometrische Analyse der Subtypenverteilung von CD8<sup>+</sup> T-Zellen aus jungen (G) und alten (H) Mäusen nach dreitägiger Stimulation mit unterschiedlichen IL-2 Konzentrationen. Dargestellt sind die Mittelwerte ± SEM, n=4-7. A-F modifiziert aus Zöphel et al., 2022.



**Abbildung 19. Einfluss variierender IL-2 Konzentrationen auf die Zytotoxizität und Differenzierung von CD8<sup>+</sup> T-Zellen aus jungen und alten Mäusen nach sechstägiger Stimulation.** Echtzeit-Zytotoxizitätsassays mit CD8<sup>+</sup> T-Zellen aus jungen (A) und alten (B) C57BL/6J Mäusen nach sechstägiger Stimulation mit unterschiedlichen Interleukin-2 (IL-2) Konzentrationen. Als Zielzellen diente die Mastozytom-Zelllinie P815 in einer Effektor:Zielzell-Ratio von 20:1. Boxplots repräsentieren die durchschnittliche Zielzelllyse nach 60, 120 und 240 min (B, E) und die maximale Lysekapazität/10 min (C, F). Durchflusszytometrische Analyse der Subtypenverteilung von CD8<sup>+</sup> T-Zellen aus jungen (G) und alten (H) Mäusen nach sechstägiger Stimulation mit unterschiedlichen IL-2 Konzentrationen. Dargestellt sind die Mittelwerte ± SEM, n=4-6.

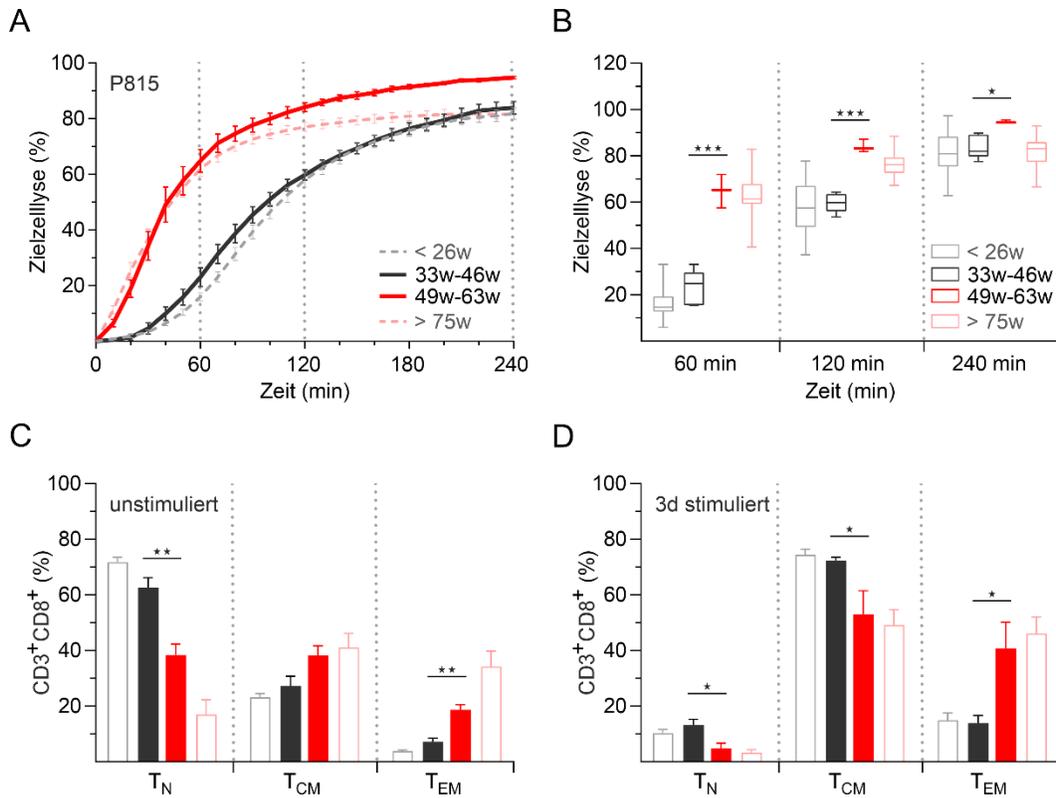
### 3.1.9 Die erhöhte zytotoxische Aktivität muriner CD8<sup>+</sup> T-Zellen beginnt im mittleren Lebensalter

Die bisherigen Ergebnisse legen nahe, dass die zytotoxische Effektorfunktion von CD8<sup>+</sup> T-Zellen durch zellintrinsische Alterationen im Alter erheblich beeinflusst wird. Entsprechend stellte sich die Frage in welchem zeitlichem Verlauf und Ausmaß diese Veränderungen im Prozess des Alterns auftreten. Daher wurde die Kinetik der Zielzelllyse von CD8<sup>+</sup> T-Zellen aus Mäusen in einer Alterspanne von 33 bis 63 Wochen untersucht. Interessanterweise zeigte sich, dass die Lyse-Kinetik mit zunehmenden Alter nicht sukzessive schneller wird. Stattdessen lies sich eine sprunghafte Steigerung der Zytotoxizität ab einem Alter von 49 Wochen beobachten (Abbildung 20). Während CD8<sup>+</sup> T-Zellen aus Mäusen zwischen 33 und 46 Wochen eine zur jungen Altersgruppe (< 26 Wochen) nahezu identische, verzögerte Lyse-Kinetik aufwiesen, zeigten CD8<sup>+</sup> T-Zellen aus Mäusen zwischen 49 und 63 Wochen eine schnelle zytotoxische Aktivität wie sie der alter Mäuse (> 75 Wochen) entspricht (Abbildung 20A und B). Innerhalb dieser 3-wöchigen Altersspanne (46w-49w) erhöhte sich die Zielzelllyse signifikant mit einer Differenz von 40% nach 60 min und 24% nach 120 min. Anders als bei CD8<sup>+</sup> T-Zellen alter Mäuse beobachtet, lag die Endpunkt-Lyse bei einer Effektor:Zielzell-Ratio von 20:1 in der Altersgruppe 49-63 Wochen signifikant höher als bei den 33-46 Wochen alten Mäusen (Abbildung 20B).

Auch wenn die Verteilung der CD8<sup>+</sup> T-Zell-Subtypen keinen wesentlichen Einfluss auf die Lyse-Kinetik im Alter hat (Abbildung 10 und 12), zeigte sich überraschenderweise ebenfalls ein signifikante Verschiebung der Subpopulationen zwischen den beiden mittleren Altersgruppen (Abbildung 20C und D). Dabei sinkt der Anteil der naiven T-Zell-Population in unstimulierten CD8<sup>+</sup> T-Zellen von 63% (33-46 Wochen) auf 38% (49-63 Wochen).

In stimulierten CD8<sup>+</sup> T-Zellen ist der Anteil an Effektor-Gedächtnis-T-Zellen in der Altersgruppe ab 49 Wochen signifikant erhöht und vergleichbar mit dem Anteil an T<sub>EM</sub> in alten Mäusen (>75 Wochen). Der Anteil an T<sub>EM</sub> in CD8<sup>+</sup> T-Zellen von Mäusen unter 46 Wochen entspricht dagegen in etwa dem der jungen Altersgruppe (< 26 Wochen).

Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass es bereits im mittleren Lebensalter zu einer umfassenden Remodellierung der T-Zell-Immunität kommt, was in der Folge zu einer gesteigerten zytotoxischen Effektorfunktion der CD8<sup>+</sup> T-Zellen führt.



**Abbildung 20. Schnelle Lyse-Kinetik von CD8<sup>+</sup> T-Zellen ab dem mittleren Lebensalter.** (A) Echtzeit-Zytotoxizitätsassays mit 3-Tage stimulierten CD8<sup>+</sup> T-Zellen aus C57BL/6J Mäusen in einem Alter von 33-46 und 49-63 Wochen (n=8). Als Zielzellen diente die Mastozytom-Zelllinie P815 in einer Effektor:Zielzell-Ratio von 20:1. Boxplots repräsentieren die durchschnittliche Zielzelllyse nach 60, 120 und 240 min (B). Die Daten von Mäusen der jungen (< 26 Wochen) und alten (>75 Wochen) Kohorte sind hier zum Vergleich erneut aufgeführt und matt dargestellt. Durchflusszytometrische Analyse der Subtypenverteilung von unstimulierten (C) und stimulierten (D) CD8<sup>+</sup> T-Zellen aus Mäusen der entsprechenden Altersgruppe (n=7). Dargestellt sind die Mittelwerte ± SEM.

Zusammenfassend brachte die im ersten Teil der Arbeit durchgeführte Charakterisierung *in vitro* stimulierter CD8<sup>+</sup> T-Zellen aus alten C57BL/6J Wildtyp-Mäusen erstaunliche Unterschiede im zytotoxischen Verhalten der Zellen hervor. Beide CD8<sup>+</sup> Gedächtnispopulationen weisen im Alter eine schnellere Kinetik in der Lyse von Tumorzellen auf. Im Gegensatz zu CD8<sup>+</sup> T-Zellen aus jungen Mäusen, bleibt die zytotoxische Kapazität nach initialer Aktivierung auch bei niedrigen externen IL-2-Konzentrationen unverändert. Die hohe zytotoxische Effizienz der CD8<sup>+</sup> T-Zellen ist weder durch altersbedingte Alterationen in Rezeptor-vermittelten Signalwegen noch durch eine veränderte Degranulation lytischer Granula bedingt. Stattdessen scheint eine erhöhte Expression der in den Granula enthaltenen Effektormoleküle Granzym B und Perforin ursächlich für die schnelle Eliminierung von Zielzellen im Alter zu sein. Die hier dargestellten Ergebnisse wurden in Teilen bereits publiziert (Zöphel et al., 2022).

### **3.2 Etablierung eines heterozygoten OT-I Mausmodells zur Untersuchung der antigenspezifischen Immunantwort von CD8<sup>+</sup> T-Zellen im Alter**

Die Daten aus den Versuchen mit gealterten Wildtyp-Mäusen liefern deutliche Hinweise darauf, dass zellintrinsische Alterationen den Phänotyp zytotoxischer CD8<sup>+</sup> T-Zellen im Alter wesentlich verändern können. Unklar ist jedoch welchen Einfluss die antigenunspezifische Stimulation des T-Zell-Rezeptors mittels anti-CD3/CD28 Beads auf die Initiation der Effektorfunktionen hat. Die Bestätigung der physiologischen Relevanz der Ergebnisse erforderte daher eine Untersuchung des zytotoxischen Verhaltens nach antigenspezifischer Aktivierung. Die TZR-transgene OT-I Linie ist eines der am häufigsten verwendeten Mausmodelle für die Untersuchung antigenspezifischer Immunantworten von CD8<sup>+</sup> T-Zellen (Pritchard et al., 2016). OT-I Mäuse exprimieren T-Zell-Rezeptoren auf CD8<sup>+</sup> T-Zellen die spezifisch das über den MHC-I Komplex präsentierte Peptid OVA<sub>257-264</sub> (SIINFEKL) des Modellantigens Ovalbumin erkennen. Der daraus resultierenden immundefiziente Phänotyp reduziert die Lebenserwartung homozygoter OT-I Mäuse jedoch erheblich, wodurch sie für den Einsatz in Alterungsstudien weitgehend ungeeignet sind. Um diese Einschränkung zu umgehen, wurde im Rahmen dieser Arbeit eine heterozygote OT-I Linie etabliert. Die Generierung der verwendeten F1-Generationen (OT-I<sup>+/-</sup>) erfolgte durch Verpaarung weiblicher C57BL/6J und männlicher OT-I<sup>+/+</sup> Mäuse. Zur Überprüfung der Anwendbarkeit des heterozygoten Systems wurden phänotypische und funktionelle Eigenschaften von jungen OT-I<sup>+/+</sup> und OT-I<sup>+/-</sup> Mäusen gegenübergestellt. Darauf aufbauend, erfolgte der Vergleich der antigenspezifischen Immunantwort von CD8<sup>+</sup> T-Zellen aus jungen (12-26 Wochen) und alten (70-102 Wochen) OT-I<sup>+/-</sup> Mäusen.

#### **3.2.1 Verringerte Inzidenz von Splenomegalien in OT-I<sup>+/-</sup> Mäusen**

Das Milzgewicht nimmt im Alter zu (Angenendt et al., 2020; Menees et al., 2021) und Splenomegalien sind ein häufiger Befund bei Nekropsien älterer Mäuse (Pettan-Brewer & M. Treuting, 2011). Da die zugrundeliegenden Ursachen für die Entwicklung einer Splenomegalie vielfältig sein können, werden diese Tiere in unseren Studien grundsätzlich ausgeschlossen. Die Expression des transgenen T-Zell-Rezeptors auf CD8<sup>+</sup> T-Zellen von OT-I Mäusen hat eine unzureichende Immunantwort gegen andere Antigene zur Folge. Diese Immundefizienz führt bereits bei jungen OT-I<sup>+/+</sup> Mäusen häufig zu Splenomegalien und einer deutlich erhöhten Sterblichkeit.

In jungen OT-I<sup>+/-</sup> Mäusen traten Splenomegalien hingegen nur sporadisch auf und im Vergleich zu jungen OT-I<sup>+/+</sup> Mäusen reduzierte sich das Milzgewicht um durchschnittlich 55g bei männlichen und 42g bei weiblichen Mäusen (Tabelle 15). Ein höheres Milzgewicht in weiblichen C57BL/6J Mäusen wurde bereits beschrieben (Menees et al., 2021) und ließ sich ebenfalls bei OT-I<sup>+/+</sup> und OT-I<sup>+/-</sup> Mäusen feststellen. Zudem zeigte sich eine höhere Inzidenz von Splenomegalien bei weiblichen im Vergleich zu männlichen OT-I Mäusen.

OT-I<sup>+/-</sup> Mäuse zeigten im Alter eine durchschnittliche Zunahme ihres Körpergewichts von 2-4g und eine Zunahme des Milzgewichts um 25g (männlich) und 32g (weiblich). Das durchschnittliche Milzgewicht von alten OT-I<sup>+/-</sup> Mäusen war dennoch niedriger als von jungen OT-I<sup>+/+</sup> Mäusen (Tabelle 15).

Tabelle 15. Körper- und Milzgewicht von OT-I<sup>+/+</sup> (n=9-10) und OT-I<sup>+/-</sup> (n=11-20) Mäusen ± SEM

	OT-I <sup>+/+</sup> jung	OT-I <sup>+/-</sup> jung	OT-I <sup>+/-</sup> alt	
Körpergewicht (g)	31.52 (±1.07)	30.36 (±0.38)	32.56 (±0.71)	♂
Milzgewicht (mg)	155.67 (±13.54)	107.23 (±5.05)	151.15 (±23.10)	
	OT-I <sup>+/+</sup> jung	OT-I <sup>+/-</sup> jung	OT-I <sup>+/-</sup> alt	
Körpergewicht (g)	22.29 (±0.53)	24.12 (±0.45)	26.25 (±0.42)	♀
Milzgewicht (mg)	179.10 (±19.64)	140.82 (±12.22)	166.07 (±23.76)	

Die Generierung eines heterozygoten OT-I Modells führte zu einer deutlichen Reduktion der Inzidenz von Splenomegalien und verlängerte die Lebenserwartung der Mäuse. Dies ermöglichte erstmals eine Charakterisierung antigenspezifischer CD8<sup>+</sup> T-Zellen aus gealterten transgenen Mäusen.

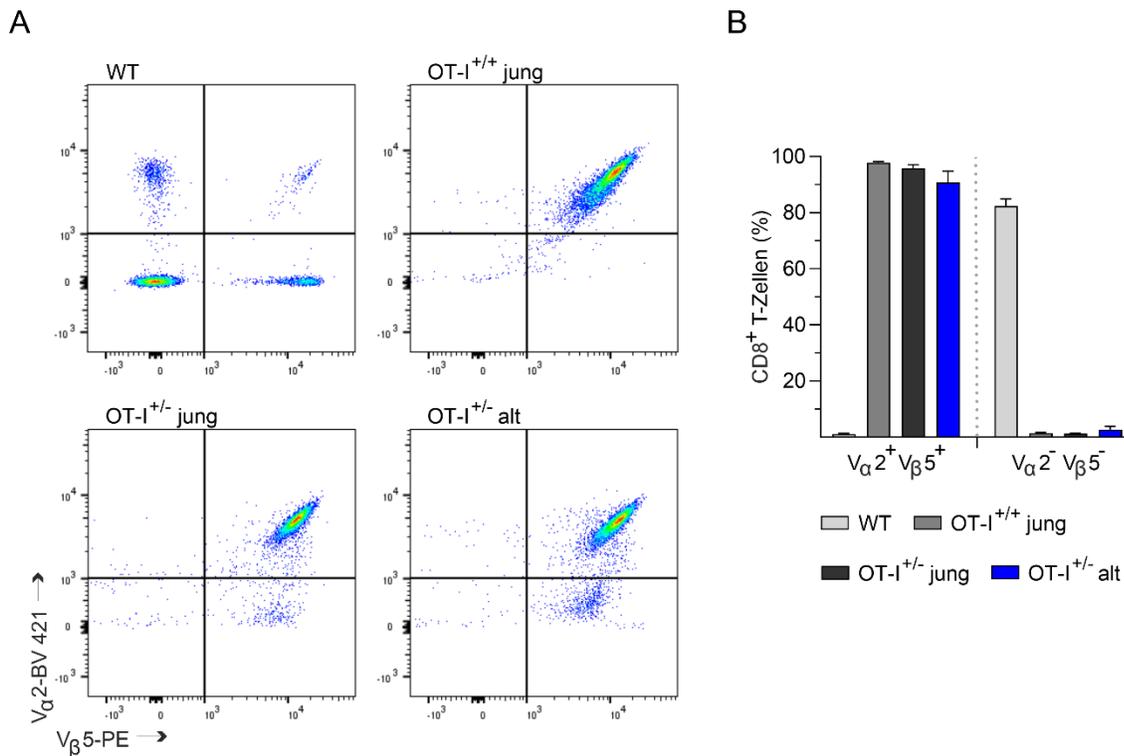
### 3.2.2 Die Expression des transgenen T-Zell-Rezeptors bleibt in alten OT-I<sup>+/-</sup> Mäusen erhalten

Der von OT-I CD8<sup>+</sup> T-Zellen exprimierte transgene T-Zell-Rezeptor stammt ursprünglich von einem OVA<sub>257-268</sub>-spezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellklon und besteht aus einer rekombinierten V<sub>α</sub>2 und V<sub>β</sub>5 Kette, die über ein einzelnes Transgen vererbt wird (Hogquist et al., 1994). Das Vorhandensein eines funktionellen TZR-Proteins führt zu allelischer Exklusion und Unterbindung weiterer endogener TZR-Gen-Rekombinationen (Lacorazza & Nikolich-Zugich, 2004; Sant'Angelo et al., 2001; Uematsu et al., 1988). Daher ist anzunehmen, dass auch der überwiegende Teil der CD8<sup>+</sup> T-Zellen in OT-I<sup>+/-</sup> Mäusen den transgenen TZR V<sub>α</sub>2/V<sub>β</sub>5 exprimiert. Allerdings gibt es bisher keine bekannten Studien zur Verteilung transgener T-Zell-Rezeptoren in heterozygoten Mäusen und dem Einfluss des Alterns auf die Expression des transgenen TZR. Zudem wurde in einzelnen OT-I<sup>+/+</sup> Linien ein spontaner partieller Verlust der V<sub>α</sub>2- oder V<sub>β</sub>5-Kette beobachtet (Pritchard et al., 2016).

Aus diesem Grund wurde zunächst die Expression von V<sub>α</sub>2 und V<sub>β</sub>5 auf CD8<sup>+</sup> T-Zellen von OT-I<sup>+/+</sup>, OT-I<sup>+/-</sup> und C57BL/6J Mäusen quantifiziert. Die durchflusszytometrische Analyse ergab keine signifikanten Unterschiede zwischen OT-I<sup>+/+</sup>, OT-I<sup>+/-</sup> und dem Alter der Mäuse (Abbildung 21). 98% der CD8<sup>+</sup> T-Zellen von OT-I<sup>+/+</sup> und 95% der CD8<sup>+</sup> T-Zellen von OT-I<sup>+/-</sup> Mäusen tragen den V<sub>α</sub>2/V<sub>β</sub>5-transgenen TZR. Im Gegensatz dazu, exprimieren nur 1% der CD8<sup>+</sup> T-Zellen aus C57BL/6J Mäusen endogen rekombinierte V<sub>α</sub>2/V<sub>β</sub>5-TZR (Abbildung 21A und B). Im Alter tragen 90% der

CD8<sup>+</sup> T-Zellen aus OT-I<sup>+/-</sup> Mäusen V<sub>α</sub>2/V<sub>β</sub>5 TZR, 5% der CD8<sup>+</sup> T-Zellen exprimieren nur die V<sub>β</sub>5-Kette. Da bis zu 10% der CD8<sup>+</sup> T-Zellen aus C57BL/6J Mäusen die V<sub>β</sub>5-Kette für die TZR-Rekombination verwenden (Abbildung 21A), ist unklar, ob die geringfügige Abnahme des V<sub>α</sub>2/V<sub>β</sub>5-TZR im Alter durch vermehrte endogene TZR-Rekombination oder einem zunehmenden spontanen Verlust der transgenen V<sub>α</sub>2-Kette verursacht wird.

Insgesamt zeigen die Ergebnisse, dass der überwiegende Teil der CD8<sup>+</sup> T-Zellen aus OT-I<sup>+/-</sup> Mäusen den OVA<sub>257-268</sub>-spezifischen T-Zell-Rezeptor tragen, dessen Oberflächenexpression auch im Alter weitestgehend erhalten bleibt.

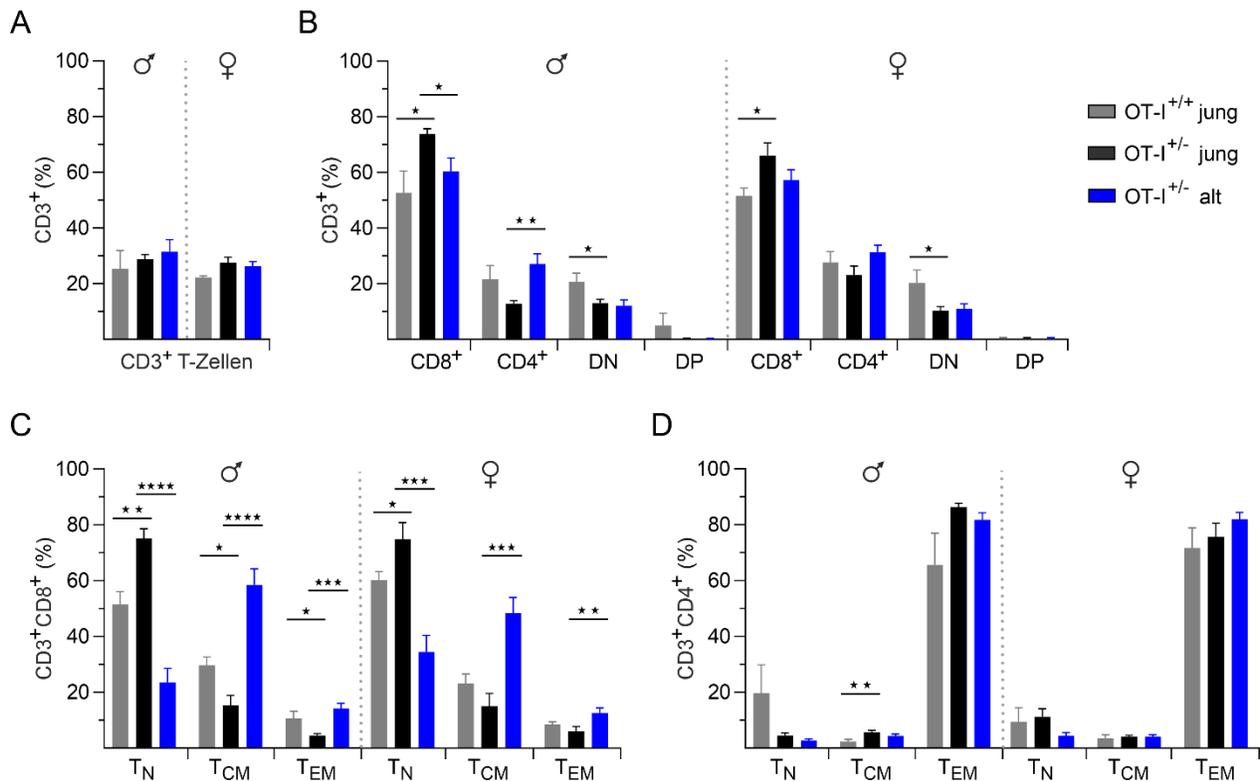


**Abbildung 21. Expression des transgenen V<sub>α</sub>2/V<sub>β</sub>5-T-Zell-Rezeptors auf CD8<sup>+</sup> T-Zellen von jungen und alten OT-I<sup>+/-</sup> Mäusen.** (A) Repräsentative Verteilung der V<sub>α</sub>2- und V<sub>β</sub>5-Ketten auf CD8<sup>+</sup> T-Zellen von OT-I<sup>+/+</sup>, OT-I<sup>+/-</sup> und C57BL/6J (WT) Mäusen. (B) Durchflusszytometrische Quantifizierung des prozentualen Anteils V<sub>α</sub>2<sup>+</sup>V<sub>β</sub>5<sup>+</sup> und V<sub>α</sub>2<sup>-</sup>V<sub>β</sub>5<sup>-</sup> Zellen innerhalb der CD8<sup>+</sup> T-Zell-Populationen. Dargestellt sind die Mittelwerte ± SEM, n=4-5. Modifiziert aus Zöphel et al., 2023.

### 3.2.3 Verteilung der T-Zell-Populationen in Splenozyten von jungen und alten OT-I<sup>+/-</sup> Mäusen

Eine Verschiebung des CD4/CD8-Verhältnisses und ein damit verbundener, überproportionaler Anteil von peripheren CD8<sup>+</sup> T-Zellen ist ein bekannter Phänotyp von homozygoten OT-I Mäusen (Clarke et al., 2000; Kaye et al., 1992). Hingegen zählt eine reduzierte Anzahl an CD8<sup>+</sup> T-Zellen zu den typischen Merkmalen der Immunoseneszenz. Die Verteilung der T-Zell-Populationen in Splenozyten junger OT-I<sup>+/+</sup> und

OT-I<sup>+/-</sup> Mäuse und deren Veränderung im Alter wurde durchflusszytometrisch analysiert (Abbildung 22). Angesichts der bereits beschriebenen geschlechtsspezifischen Unterschiede von T-Zell-Subtypen und Immunantworten, nicht nur im Alter (Dakup et al., 2020; Klein & Flanagan, 2016; Menees et al., 2021), wurden männliche und weibliche Mäuse getrennt charakterisiert.



**Abbildung 22. Verteilung der T-Zell-Populationen in Splenozyten aus männlichen und weiblichen OT-I<sup>+/+</sup> und OT-I<sup>+/-</sup> Mäusen.** Durchflusszytometrische Analyse der T-Zell-Populationen bei jungen und alten OT-I<sup>+/-</sup> (n=8-11) im Vergleich zu jungen OT-I<sup>+/+</sup> Mäusen (n=6). (A) Prozentualer Anteil der CD3<sup>+</sup> Gesamt-T-Zellpopulation in isolierten Splenozyten. (B) Prozentuale Verteilung von CD8<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>, doppelt negativen (DN) und doppelt positiven (DP) Zellen innerhalb der CD3<sup>+</sup> T-Zell-Population. Verteilung der naiven (T<sub>N</sub>)-, zentralen Gedächtnis (T<sub>CM</sub>)- und Effektor-Gedächtnis (T<sub>EM</sub>)-Populationen innerhalb der CD8<sup>+</sup> (C) und CD4<sup>+</sup> (D) T-Zellen anhand der Oberflächenexpression von CD44 und CD62L. T<sub>N</sub>: CD62L<sup>+</sup>CD44<sup>-</sup>, T<sub>CM</sub>: CD62L<sup>+</sup>CD44<sup>+</sup>, T<sub>EM</sub>: CD62L<sup>-</sup>CD44<sup>+</sup>. Dargestellt sind die Mittelwerte ± SEM. Modifiziert aus Zöphel et al., 2023.

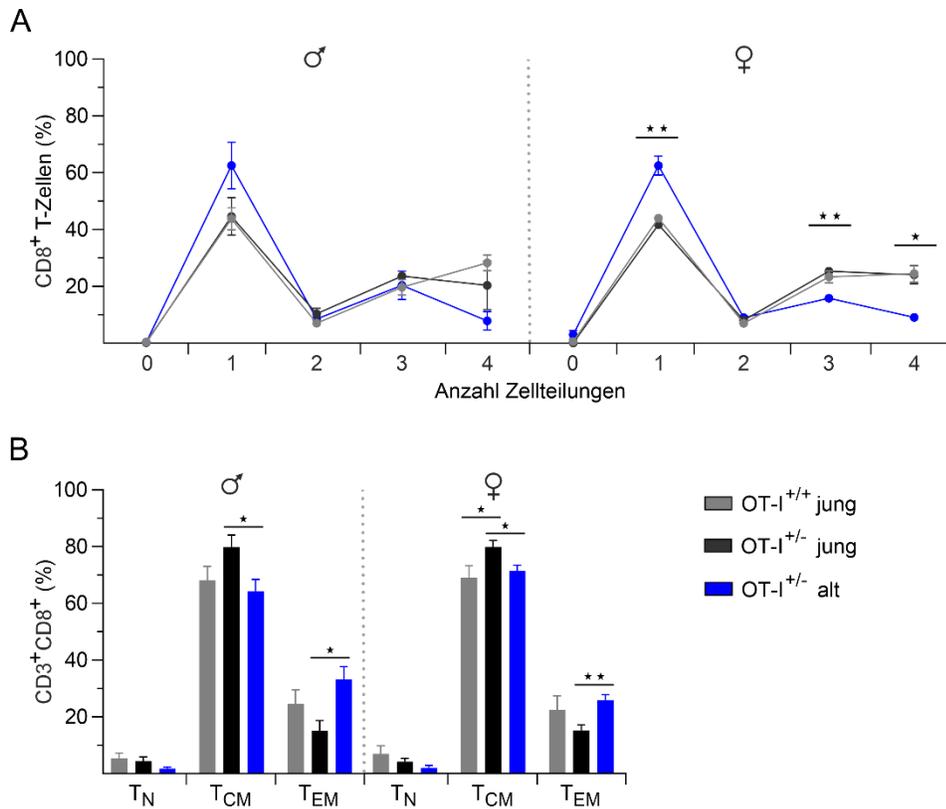
Während der Anteil an CD3<sup>+</sup> T-Zellen mit ca. 20-30% in allen OT-I Kohorten vergleichbar ist (Abbildung 22A), weisen junge OT-I<sup>+/-</sup> im Vergleich zu OT-I<sup>+/+</sup> Mäusen mit 53% vs. 74% (männlich) und 52% vs. 66% (weiblich) signifikant mehr CD8<sup>+</sup> T-Zellen auf. In alten OT-I<sup>+/-</sup> Mäusen verringert sich der Anteil der CD8<sup>+</sup> T-Zellpopulation auf 60% (männlich) und 57% (weiblich), der Anteil an CD4<sup>+</sup> T-Zellen nimmt zu (Abbildung 22B).

Während des Alterns kommt es zu einer fortschreitenden Abnahme naiver T-Zellen und einer Akkumulation von Gedächtnis-T-Zellen. Der durchflusszytometrischen Analyse mit  $CD8^+$  T-Zellen aus C57BL/6J Wildtyp-Mäusen entsprechend (Abbildung 8), wurde die Verteilung der  $CD8^+$  und  $CD4^+$  T-Zell-Subtypen in Splenozyten aus jungen und alten OT-I Mäusen anhand der Oberflächenmarker  $CD44$  und  $CD62L$  bestimmt (Abbildung 22C und D). Der Anteil naiver  $CD8^+$  T-Zellen aus jungen OT-I<sup>+/-</sup> Mäusen ist im Vergleich zu OT-I<sup>+/+</sup> bei beiden Geschlechtern mit jeweils 75% vs. 52% (männlich) und 60% (weiblich) signifikant höher. In alten OT-I<sup>+/-</sup> Mäusen nimmt der Anteil naiver  $CD8^+$  T-Zellen signifikant ab und zentrale Gedächtnis-T-Zellen nehmen mit 58% (männlich) und 48% (weiblich) den größten Anteil innerhalb der  $CD8^+$  T-Zellen ein (Abbildung 22C). In allen OT-I Kohorten zeigt die Mehrheit (66-86%) der  $CD4^+$  T-Zellen hingegen phänotypische Eigenschaften von Effektor-Gedächtnis-T-Zellen (Abbildung 22D).

### **3.2.4 Proliferation und Differenzierung von $CD8^+$ T-Zellen aus jungen und alten OT-I<sup>+/-</sup> Mäusen nach antigenspezifischer Aktivierung**

Die Proliferation und Differenzierung von naiven zu Gedächtnis-T-Zellen liefert erste Rückschlüsse über die Immunantwort von  $CD8^+$  T-Zellen nach TZR-Aktivierung. Um die adäquate OVA-spezifische Aktivierung der  $CD8^+$  T-Zellen aus OT-I<sup>+/-</sup> Mäusen zu bestätigen und mögliche altersbedingte Veränderungen in der antigenspezifischen T-Zell-Antwort zu beurteilen, wurden Splenozyten aus OT-I<sup>+/+</sup> und OT-I<sup>+/-</sup> Mäusen für drei Tage mit der zuvor bestrahlten Lymphom-Zelllinie E.G7-OVA inkubiert. Die Analyse der Proliferation erfolgte durch Markierung der Zellen mit CFSE und anschließender Färbung mit einem anti- $CD8$  Antikörper (Abbildung 23A).  $CD8^+$  T-Zellen aus jungen OT-I<sup>+/+</sup> und OT-I<sup>+/-</sup> Mäusen zeigen ein nahezu identisches Proliferationsverhalten. Der überwiegende Anteil der Zellen (40-45%) hat sich zu diesem Zeitpunkt einmal geteilt, einige haben drei bis vier Zellteilungen durchlaufen (jeweils 20-25%). Bei alten OT-I<sup>+/-</sup> Mäusen konnten im Durchschnitt 20% mehr  $CD8^+$  T-Zellen nach einer und weniger mit 3-4 Zellteilungen beobachtet werden, was auf eine Abnahme der zelleigenen Proliferationsfähigkeit im Alter hindeutet (Abbildung 23A).

Die durchflusszytometrische Analyse der Subtypenverteilung bestätigte die OVA-spezifische Aktivierung der  $CD8^+$  T-Zellen aus OT-I<sup>+/-</sup> Mäusen. Nach dreitägiger Stimulation zeigte sich in allen OT-I Kohorten eine deutliche Abnahme der naiven T-Zell-Population (unter 20%) und eine Differenzierung von  $T_N$  zu  $T_{CM}$  und  $T_{CM}$  zu  $T_{EM}$ . Die altersbedingten Unterschiede in der Subtypenverteilung blieben jedoch auch weiterhin signifikant (Abbildung 23B).



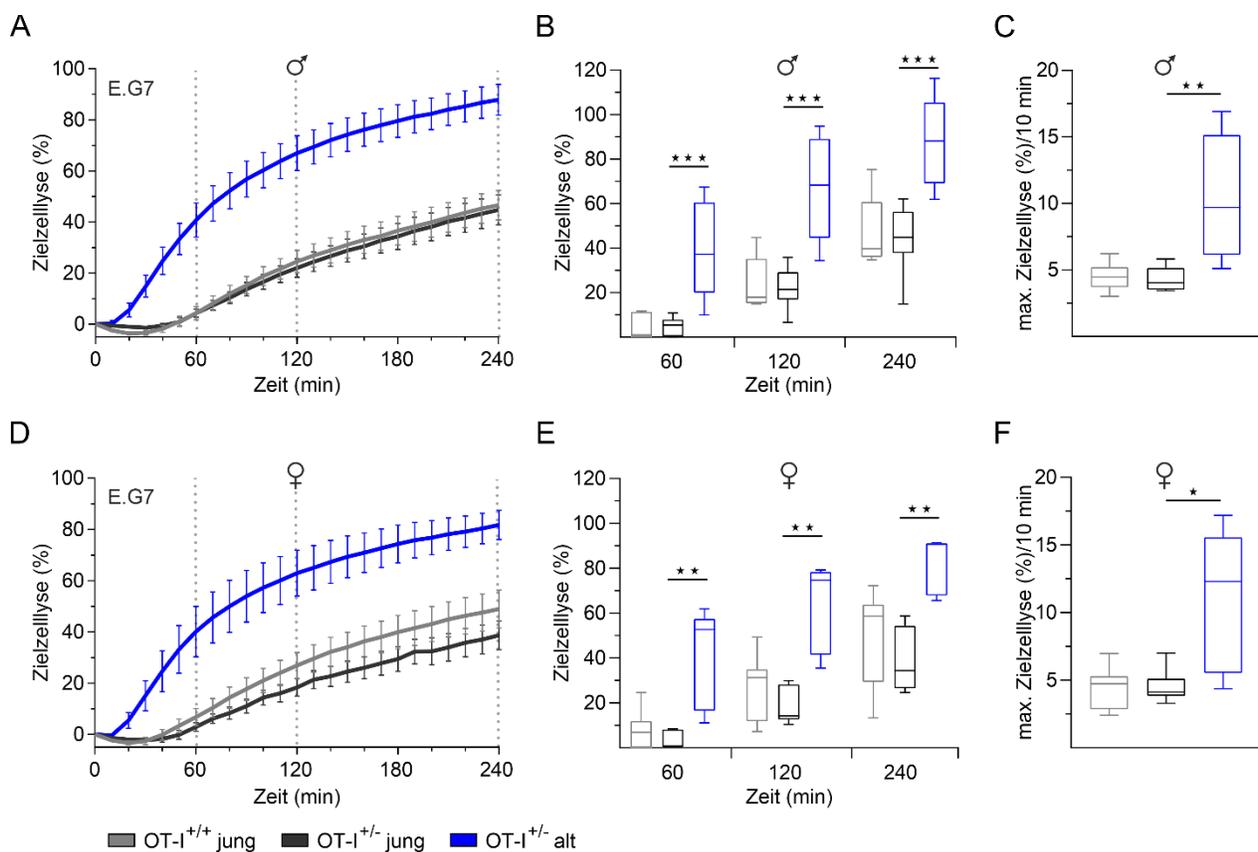
**Abbildung 23. Proliferation und Differenzierung von OT-I CD8<sup>+</sup> T-Zellen nach antigenspezifischer Aktivierung.** (A) CFSE-basierter Proliferationsassay mit stimulierten CD8<sup>+</sup> T-Zellen aus männlichen und weiblichen OT-I<sup>+/+</sup> und OT-I<sup>-/-</sup> Mäusen. Aktivierung der OT-I CD8<sup>+</sup> T-Zellen mit der zuvor bestrahlten E.G7-OVA Lymphom-Zelllinie und anschließende durchflusszytometrische Quantifizierung der Zellteilungen durch Verdünnung des zytoplasmatischen Fluoreszenzfarbstoffs CFSE nach 48h Stimulation. (B) Durchflusszytometrische Analyse der Subtypenverteilung von CD8<sup>+</sup> T-Zellen nach dreitägiger antigenspezifischer Aktivierung. T<sub>N</sub>: CD62L<sup>+</sup>CD44<sup>-</sup>, T<sub>CM</sub>: CD62L<sup>+</sup>CD44<sup>+</sup>, T<sub>EM</sub>: CD62L<sup>-</sup>CD44<sup>+</sup>. Dargestellt sind die Mittelwerte ± SEM, n=3-5. Modifiziert aus Zöphel et al., 2023.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse, dass CD8<sup>+</sup> T-Zellen aus jungen OT-I<sup>+/+</sup> und OT-I<sup>-/-</sup> Mäusen phänotypisch ähnlich sind und nach antigenspezifischer Aktivierung im gleichen Maße proliferieren und differenzieren. Die altersbedingt charakteristischen Veränderungen von CD8<sup>+</sup> T-Zellen wie die Abnahme des naiven T-Zell-Pools, die Akkumulation von Gedächtnis-T-Zellen und eine verringerte Proliferationsfähigkeit treten ebenso bei alten OT-I<sup>-/-</sup> Mäusen auf. Somit bietet das OT-I<sup>-/-</sup> Modell eine breite Anwendbarkeit für die Untersuchung antigenspezifischer Immunantworten von CD8<sup>+</sup> T-Zellen im Alter.

### 3.2.5 OT-I<sup>+/-</sup> Modell bestätigt altersbedingte Veränderungen in der zytotoxischen Effektorfunktion von CD8<sup>+</sup> T-Zellen

Die Generierung der heterozygoten OT-I Linie ermöglichte erstmals die Untersuchung altersbedingter Unterschiede der zytotoxischen Funktion von CD8<sup>+</sup> T-Zellen in einem antigenspezifischen *in vitro* Modell.

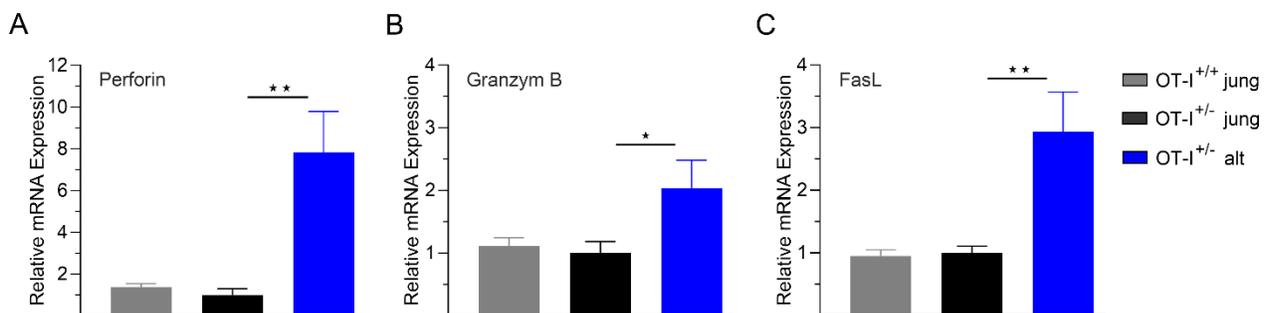
Dafür wurden isolierte CD8<sup>+</sup> T-Zellen aus jungen und alten OT-I Mäusen zunächst für drei Tage mit bestrahlten E.G7-OVA-Zellen und 100 U/ml IL-2 aktiviert. Die Analyse der zytotoxischen Aktivität gegen E.G7-OVA-Zellen erfolgte mittels Echtzeit-Zytotoxizitätsassay bei einer Effektor:Zielzell-Ratio von 10:1 (Abbildung 24).



**Abbildung 24. Schnellere Zielzelllyse durch CD8<sup>+</sup> T-Zellen aus alten männlichen und weiblichen OT-I<sup>+/-</sup> Mäusen.** Echtzeit-Zytotoxizitätsassays mit CD8<sup>+</sup> T-Zellen aus männlichen (A) und weiblichen (D) OT-I<sup>+/+</sup> und OT-I<sup>+/-</sup> Mäusen nach dreitägiger Aktivierung durch bestrahlte E.G7-OVA-Lymphomzellen. Als Zielzellen dienten E.G7-OVA-Zellen in einer Effektor-Zielzell-Ratio von 10:1. Boxplots repräsentieren die durchschnittliche Zielzelllyse nach 60, 120 und 240 min (B, E) und die maximale Lysekapazität/10 min (C, F). Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM, n=5-11. Modifiziert aus Zöphel et al., 2023.

CD8<sup>+</sup> T-Zellen von jungen männlichen und weiblichen OT-I<sup>+/+</sup> und OT-I<sup>+/-</sup> Mäusen zeigten nach 240 min eine Zielzelllyse von 40-45%, ohne signifikante Unterschiede in der Lyse-Kinetik (Abbildung 24A und D). In Übereinstimmung mit den Ergebnissen von C57BL/6J Wildtyp-Mäusen (Abbildung 3), wiesen CD8<sup>+</sup> T-Zellen aus allen jungen OT-I Kohorten eine verzögerte zytotoxische Aktivität innerhalb der ersten 60 min auf. Im Gegensatz dazu, zeigten CD8<sup>+</sup> T-Zellen aus alten OT-I<sup>+/-</sup> Mäusen eine signifikant schnellere und effizientere Zytotoxizität, mit 40% Zielzelllyse nach 60 min und 80% nach 240 min (Abbildung 24A, B, D und E). Die Quantifizierung der maximalen Zielzelllyse pro 10-min Intervall zeigte eine 2,5-fach höhere Lyserate von CD8<sup>+</sup> T-Zellen aus alten OT-I<sup>+/-</sup> Mäusen (Abbildung 24C und F).

Die in C57BL/6J Wildtyp-Mäusen beobachtete erhöhte Expression lytischer Effektormoleküle (Abbildung 15-17) zeigte einen möglichen Mechanismus für die schnelle Lyse-Kinetik von CD8<sup>+</sup> T-Zellen im Alter. Um diese Vermutung zu bestätigen, wurde die mRNA-Expression von Perforin, Granzym B und FasL nach antigenspezifischer Aktivierung von CD8<sup>+</sup> T-Zellen aus jungen und alten OT-I Mäusen analysiert. Die jeweiligen Expressionslevel von jungen OT-I<sup>+/+</sup> und alten OT-I<sup>+/-</sup> Mäusen wurden auf Referenzgene normiert und relativ zum normierten Expressionslevel junger OT-I<sup>+/-</sup> Mäuse quantifiziert. CD8<sup>+</sup> T-Zellen aus jungen OT-I<sup>+/+</sup> und OT-I<sup>+/-</sup> Mäusen wiesen eine vergleichbare mRNA-Expression aller drei untersuchten Gene auf. CD8<sup>+</sup> T-Zellen aus alten OT-I<sup>+/-</sup> Mäusen zeigten hingegen eine signifikant um das 2-3-fach erhöhte Expression von FasL und Granzym B und eine um das 9-fache erhöhte Expression von Perforin (Abbildung 25A-C).



**Abbildung 25. Erhöhte Expression von Perforin, Granzym B und FasL in CD8<sup>+</sup> T-Zellen aus alten OT-I<sup>+/-</sup> Mäusen.** Normalisierte mRNA-Expression von Perforin (A), Granzym B (B) und FasL (C) in CD8<sup>+</sup> T-Zellen aus OT-I<sup>+/+</sup> und OT-I<sup>+/-</sup> Mäusen drei Tage nach antigenspezifischer Aktivierung. Die Expressionslevel wurden auf die Referenzgene Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase 1 (HPRT1) und TATA-Box-Bindungsprotein (TBP) normalisiert. Die normierten Expressionslevel von jungen OT-I<sup>+/+</sup> und alten OT-I<sup>+/-</sup> Mäusen sind relativ zur Expression von CD8<sup>+</sup> T-Zellen junger OT-I<sup>+/-</sup> Mäuse angegeben. Dargestellt sind die Mittelwerte ± SEM, n=6-8. Die Generierung der qPCR-Daten erfolgte in Zusammenarbeit mit Sandra Janku. Modifiziert aus Zöphel et al., 2023.

Die Ergebnisse im antigenspezifischen OT-I<sup>+/-</sup> Modell unterstützen die Annahme, dass die erhöhte Zytotoxizität von CD8<sup>+</sup> T-Zellen im Alter durch zellintrinsische Alterationen in der Expression lytischer Effektormoleküle bedingt ist. Die Art der TZR-Stimulation scheint hierbei eine untergeordnete Rolle zu spielen.

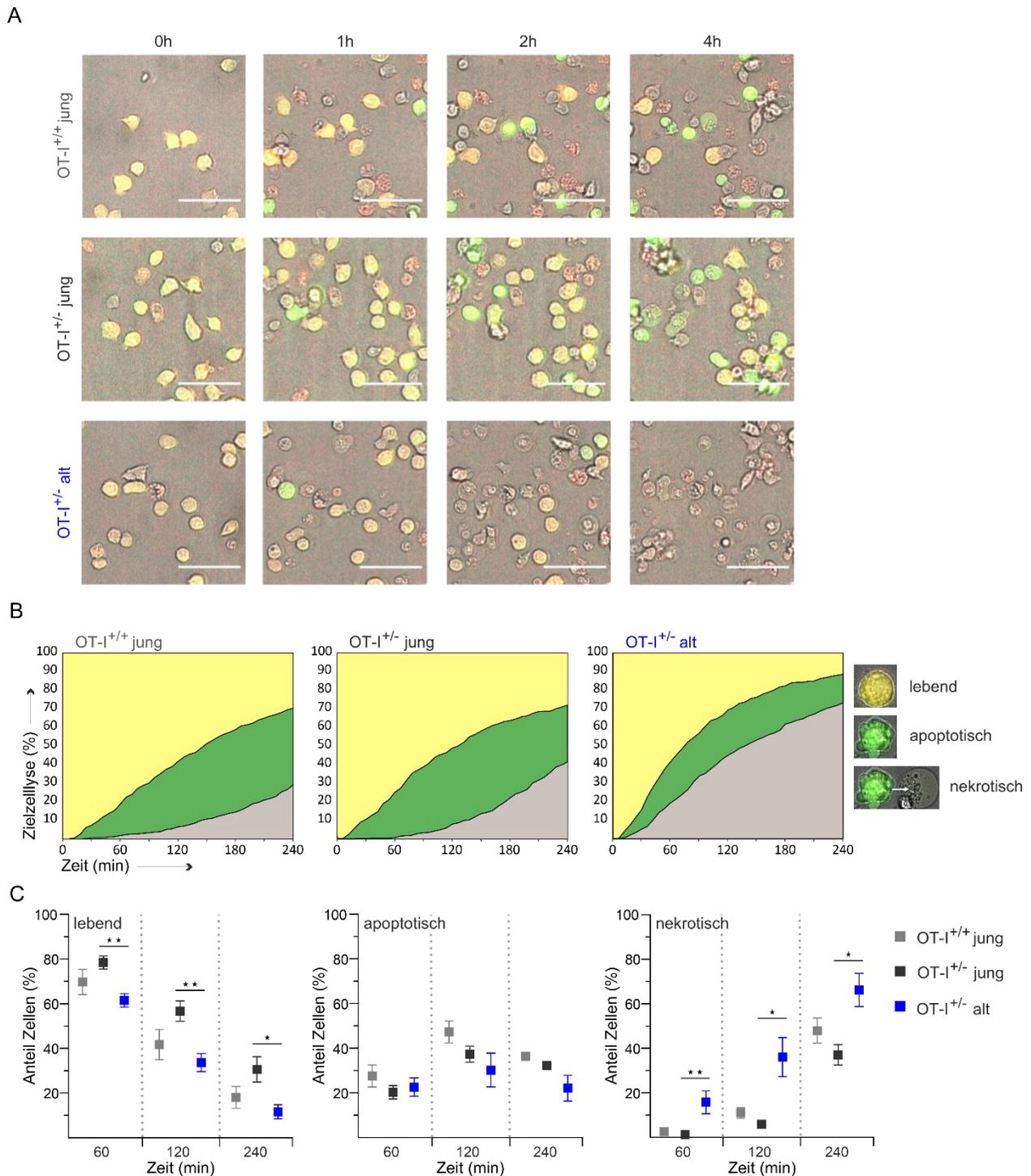
### 3.2.6 CD8<sup>+</sup> T-Zellen aus alten OT-I<sup>+/-</sup> Mäusen induzieren einen schnellen nekrotischen Zielzelltod

Die bisherigen Ergebnisse legen nahe, dass Veränderungen im Perforin- und Granzym-Gehalt ausschlaggebend für die schnelle Induktion des Zielzelltodes durch CD8<sup>+</sup> T-Zellen im Alter sind. Unklar ist jedoch welchen Einfluss eine erhöhte Expression dieser Effektormoleküle auf den Mechanismus der Granula-Exozytose-vermittelten Zytotoxizität nimmt. Perforin ist essenziell für die Freisetzung von Granzymen und die nachfolgende Caspase-abhängige Apoptose-Induktion. Darüber hinaus können hohe Perforin-Konzentrationen die Membranintegrität der Zielzelle so schädigen, dass zelleigene Reparaturmechanismen nicht mehr greifen, was einen nekrotischem Zelltod zur Folge hat (Backes et al., 2018).

Um die Art des Zielzelltodes näher charakterisieren zu können wurden EG.7-OVA Zellen stabil mit dem Apoptose-Reporter pCasper transfiziert. Der Sensor besteht aus einem TagGFP und TagRFP Fluorophor, verbunden über einen Linker der die Caspase-3 katalysierte Spaltungssequenz DEVD enthält (Shcherbo et al., 2009). Dies ermöglichte die fluoreszenzmikroskopische Unterscheidung zwischen lebenden (orange), apoptotischen (grün) und nekrotischen (Fluoreszenzverlust) Zielzellen. Nach Zugabe drei Tage stimulierter OVA-spezifischer CD8<sup>+</sup> T-Zellen aus jungen und alten OT-I Mäusen, in einer Effektor:Zielzell-Ratio von 2:1, wurden die Zielzellen über 4 Stunden kinetisch analysiert (Abbildung 26A und B). Die Quantifizierung des Zielzelltodes erfolgte nach 60, 120 und 240 min (Abbildung 26C).

Wie erwartet war der Anteil lebender Zielzellen nach Kontakt mit CD8<sup>+</sup> T-Zellen aus alten OT-I<sup>+/-</sup> Mäusen zu allen analysierten Zeitpunkten signifikant geringer. CD8<sup>+</sup> T-Zellen aus jungen OT-I<sup>+/+</sup> und OT-I<sup>+/-</sup> Mäusen induzierten bei bis zu 50% der Zielzellen eine Apoptose innerhalb der ersten 120 min, die Anzahl nekrotischer Zellen war zu diesem Zeitpunkt marginal. Im Gegensatz dazu, führte der Kontakt mit CD8<sup>+</sup> T-Zellen aus alten OT-I<sup>+/-</sup> Mäusen bereits nach wenigen Minuten zur Nekrose der Zielzellen (Abbildung 26B). Der Anteil der Nekrose-Induktionen im Vergleich zu CD8<sup>+</sup> T-Zellen aus jungen OT-I<sup>+/-</sup> Mäusen war mit 16% vs. 2% nach 60 min, 36% vs. 6% nach 120 min und 66% vs. 37% nach 240 min im Alter insgesamt signifikant höher (Abbildung 26C).

Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass hohe Perforin-Konzentrationen im Alter eine massive Schädigung der Zielzellmembran zur Folge haben, die die Granzym-vermittelte Apoptose durch schnelle Induktion von Nekrosen ersetzt.

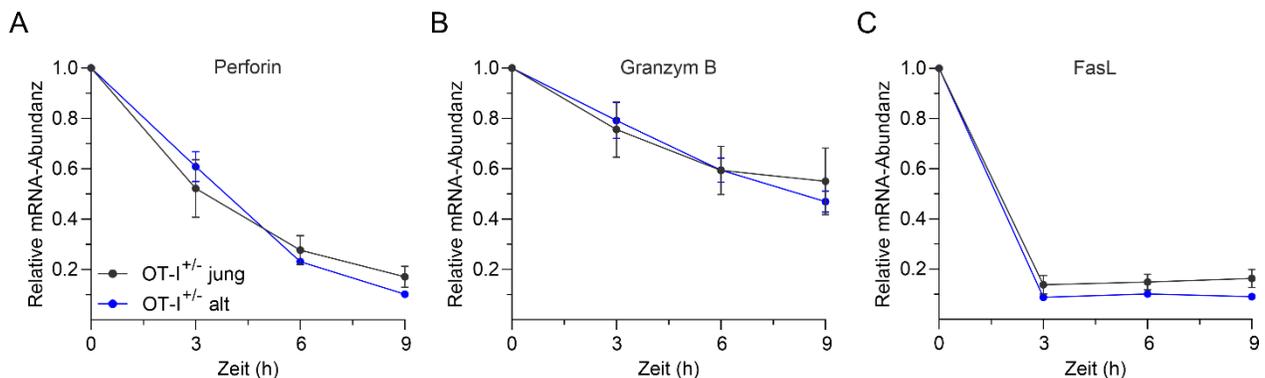


**Abbildung 26. Schnelle Nekrose-Induktion von Zielzellen durch CD8<sup>+</sup> T-Zellen aus alten OT-I<sup>+/-</sup> Mäusen.** Fluoreszenzmikroskopische Analyse des Zielzelltodes nach Kontakt mit aktivierten OVA-spezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen aus OT-I<sup>+/+</sup> und OT-I<sup>+/-</sup> Mäusen. Als Zielzellen dienten E.G7-OVA pCasper Zellen in einer Effektor:Zielzell-Ratio von 2:1. (A) Repräsentative *Overlays* von Hellfeld, GFP- und FRET-Fluoreszenz. (B) Anteil lebender (orange), apoptotischer (grün) und nekrotischer (Fluoreszenzverlust) Zellen zu den jeweiligen Zeitpunkten. (C) Statistische Quantifizierung des Zielzelltodes nach 60, 120 und 240 min. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM, n=4-6. Die Analyse der Daten erfolgte durch Lea Kaschek. Modifiziert aus Zöphel et al., 2023.

### 3.2.7 Altersbedingte Veränderungen in der Expression zytotoxischer Effektormoleküle finden auf transkriptioneller Ebene statt

Die Regulation der Genexpression ist ein mehrstufiger Prozess und posttranskriptionale Modifikationen können die Menge der entsprechenden mRNA-Transkripte stark beeinflussen. Um die zugrunde liegenden Mechanismen der altersbedingt erhöhten Expression zytotoxischer Effektormoleküle näher einzugrenzen, stellte sich zunächst die Frage, ob tatsächlich eine erhöhte Gentranskription oder Veränderungen in der Stabilität der mRNA-Transkripte ursächlich sind. Daher wurde die mRNA-Degradation von Perforin, Granzym B und FasL nach Behandlung stimulierter CD8<sup>+</sup> T-Zellen mit dem Transkriptioninhibitor Actinomycin D analysiert (Abbildung 27). 9 Stunden nach Transkriptionshemmung zeigte sich bei allen drei untersuchten Genen eine deutliche Reduktion des mRNA-Vorkommens um 45-90%. Ein signifikanter Unterschied in der Kinetik des mRNA-Abbaus zwischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen aus jungen und alten OT-I<sup>+/-</sup> Mäusen ließ sich jedoch nicht feststellen (Abbildung 27A-C).

Somit besitzen CD8<sup>+</sup> T-Zellen im Alter offenbar die Fähigkeit zur verstärkten Transkription von Genen mit Beteiligung an zytotoxischen Signalwegen.

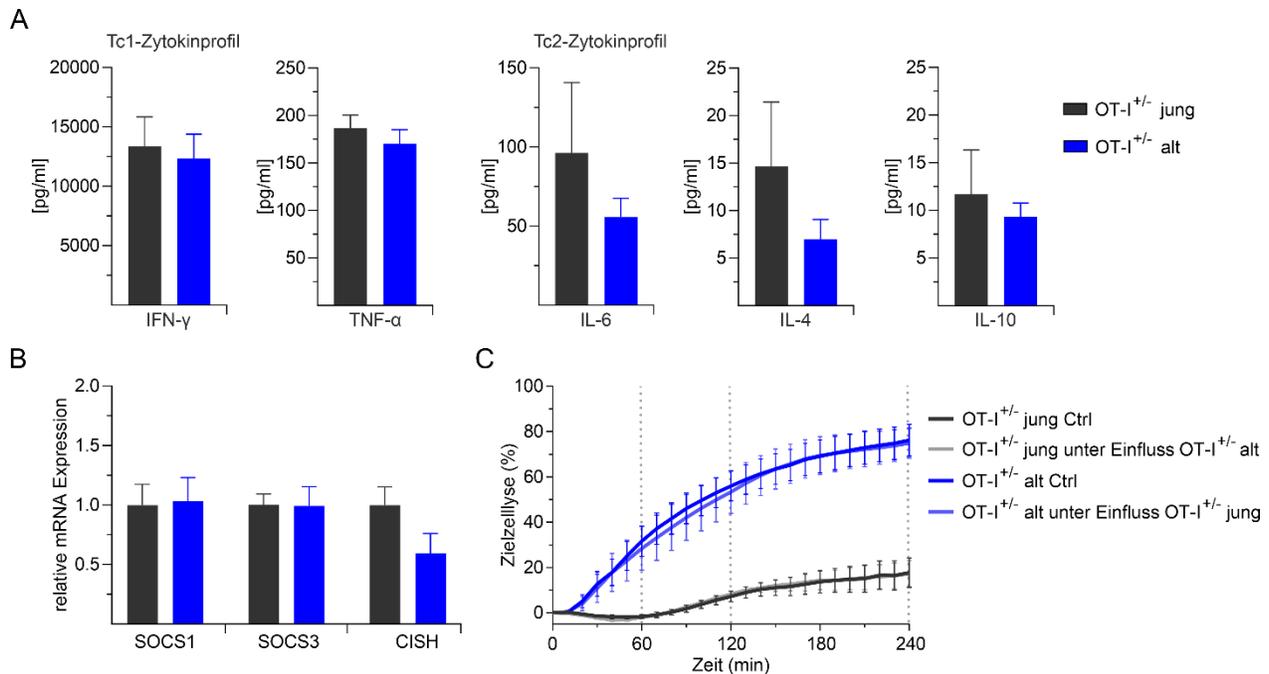


**Abbildung 27. mRNA-Stabilität von zytotoxischen Effektormolekülen in CD8<sup>+</sup> T-Zellen aus jungen und alten OT-I<sup>+/-</sup> Mäusen.** Relative mRNA-Abundanz von Perforin (A), Granzym B (B) und FasL (C) nach Zugabe des Transkriptioninhibitors Actinomycin D. Drei Tage aktivierte CD8<sup>+</sup> T-Zellen aus jungen und alten OT-I<sup>+/-</sup> Mäusen wurden mit 10 µg/ml Actinomycin D inkubiert und die entsprechenden mRNA-Level nach 3, 6 und 9h auf die mRNA-Level zum Zeitpunkt 0h normalisiert. Dargestellt sind die Mittelwerte ± SEM, n=4. Die Generierung der qPCR-Daten erfolgte in Zusammenarbeit mit Sandra Janku. Modifiziert aus Zöphel et al., 2023.

### 3.2.8 Einfluss des zelleigenen Zytokinprofils auf die zytotoxische Funktion von CD8<sup>+</sup> T-Zellen

Die Transkription zytotoxischer Effektormoleküle nach TZR-Aktivierung unterliegt einer dynamischen Regulation, die durch ein komplexes Zusammenspiel von aktivierenden und inhibierenden Signalen vermittelt wird. Zahlreiche Zytokine und deren Negativ-Regulatoren SOCS (*suppressors of cytokine signaling*) nehmen einen wesentlichen Einfluss auf das Transkriptionsprofil einzelner Immunzellen

(Yoshimura et al., 2018). Die bereits mehrfach beschriebene Tendenz zu einem pro-inflammatorischen Phänotyp im Alter liefert daher eine mögliche Erklärung für Modifikationen in der Transkription von Effektormolekülen. Unklar ist bisher jedoch wie sich die zelleigene Zytokin-Sekretion auf die zytotoxische Funktion der CD8<sup>+</sup> T-Zellen auswirkt. Während der *in vitro* Kultivierung sind CD8<sup>+</sup> T-Zellen, ausgenommen von IL-2 und antigenpräsentierenden Zellen, keinen externen Stimuli ausgesetzt. Daher wurde zunächst das zelleigene Zytokinprofil von CD8<sup>+</sup> T-Zellen aus jungen und alten OT-I<sup>+/-</sup> Mäusen nach dreitägiger Aktivierung untersucht. Die Analyse der Zellkultur-Überstände erfolgte durchflusszytometrisch mittels Bead-basiertem Immunoassay (LEGENDplex™, Biolegend). Die untersuchten Zytokine IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-4 und IL-10 wurden anhand der für CD8<sup>+</sup> T-Zellen mit zytotoxischer Aktivität charakteristischen Sekretionsprofile Tc1 und Tc2 unterteilt (Abbildung 28). Erwartungsgemäß zeigten aktivierte CD8<sup>+</sup> T-Zellen aus beiden Altersgruppen eine starke Sekretion von IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$ . Ein signifikanter Unterschied zwischen jungen und alten OT-I<sup>+/-</sup> Mäusen ließ sich nicht feststellen. CD8<sup>+</sup> T-Zellen aus jungen Mäusen zeigten im Vergleich tendenziell höhere Konzentrationen der für Tc2-Zellen typischen Interleukine, die Unterschiede waren jedoch nicht signifikant (Abbildung 28A). Die mRNA-Analyse der in CD8<sup>+</sup> T-Zellen exprimierten Negativ-Regulatoren SOCS1, SOCS3 und CISH (Davey et al., 2005; Gao et al., 2017; Palmer et al., 2015), ergab keine Hinweise auf altersbedingte Veränderungen in den Feedback-Mechanismen der Zytokin-Expression (Abbildung 28B). Um das zelleigene Sekretionsprofil als Ursache für die erhöhte Zytotoxizität im Alter weitgehend ausschließen zu können, wurden CD8<sup>+</sup> T-Zellen aus jungen und alten OT-I<sup>+/-</sup> Mäusen unter Verwendung eines Transwell-Systems ohne Zell-Zell-Kontakt co-kultiviert. CD8<sup>+</sup> T-Zellen aus alten Mäusen zeigten auch unter Einfluss des Zytokinmilieus von CD8<sup>+</sup> T-Zellen junger Mäuse eine zur Kontrolle identisch schnelle Lyse-Kinetik. Umgekehrt führten die von CD8<sup>+</sup> T-Zellen aus alten Mäusen sekretierten Zytokine nicht zu einer gesteigerten Zytotoxizität der CD8<sup>+</sup> T-Zellen aus jungen Mäusen (Abbildung 28C). Zusammengefasst scheint das zelleigene Zytokinprofil nicht ursächlich für die altersbedingten Veränderungen der zytotoxischen Funktion zu sein. Inwieweit ein pro-inflammatorisches Zytokinmilieu *in vivo* jedoch bereits zum Phänotyp der CD8<sup>+</sup> T-Zellen im Alter beiträgt, lässt sich anhand dieser Ergebnisse nicht beurteilen.



**Abbildung 28. Einfluss der zelleigenen Zytokin-Sekretion auf die Zytotoxizität von CD8<sup>+</sup> T-Zellen aus jungen und alten OT-I<sup>+/-</sup> Mäusen.** (A) Durchflusszytometrische Analyse (LEGENDplex™) der Zytokin-Konzentration aus Zellkultur-Überständen, drei Tage nach antigenspezifischer Aktivierung von CD8<sup>+</sup> T-Zellen aus jungen und alten OT-I<sup>+/-</sup> Mäusen. (B) Normalisierte mRNA-Expression der Negativ-Regulatoren (*suppressors of cytokine signaling*) SOCS1, SOCS3 und CISH in drei Tage aktivierten CD8<sup>+</sup> T-Zellen. Die jeweiligen Expressionslevel wurden auf die Referenzgene Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase 1 (HPRT1) und TATA-Box-Bindungsprotein (TBP) normalisiert. Die normierten Expressionslevel von alten OT-I<sup>+/-</sup> Mäusen sind relativ zur Expression von CD8<sup>+</sup> T-Zellen junger OT-I<sup>+/-</sup> Mäuse angegeben. (C) Echtzeit-Zytotoxizitätsassay nach dreitägiger Co-Kultivierung der CD8<sup>+</sup> T-Zellen aus jungen und alten Mäusen in einem Transwell-System ohne Zell-Zell-Kontakt. Als Zielzellen dienten E.G7-OVA Zellen in einer Effektor:Zielzell-Ratio von 10:1. Dargestellt sind die Mittelwerte ± SEM, n=3-8.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse im zweiten Teil der Arbeit, dass die Generierung einer heterozygoten OT-I Linie den Gesundheitszustand deutlich verbessert und somit eine Haltung der Tiere bis ins hohe Alter ermöglicht. CD8<sup>+</sup> T-Zellen aus jungen OT-I<sup>+/+</sup> und OT-I<sup>+/-</sup> Mäusen unterscheiden sich kaum in der Expression des transgenen T-Zell-Rezeptors und zeigten eine vergleichbare Proliferation und Zytotoxizität nach antigenspezifischer Aktivierung, wodurch die Eignung des heterozygoten Systems bestätigt werden konnte. Typische altersbedingte Veränderungen der CD8<sup>+</sup> T-Zellen wie der Rückgang des naives T-Zellpools und eine eingeschränkte Proliferationsfähigkeit konnten ebenfalls in alten OT-I<sup>+/-</sup> Mäusen beobachtet werden. Die kinetische Analyse der Zielzelllyse durch antigenspezifische CD8<sup>+</sup> T-Zellen bestätigte die hohe zytotoxische Effizienz der Zellen im Alter. Hohe Perforin-Konzentrationen haben eine massive Schädigung der Zielzellmembran zur Folge, wodurch die Granzym-vermittelte Apoptose durch eine schnelle Induktion von Nekrosen ersetzt wird. Die hohen

mRNA-Level von Perforin, Granzym B und FasL sind nicht durch altersbedingte Alterationen in der postranskriptionalen Modifikation bedingt, sondern deuten auf eine verstärkte Transkription der entsprechenden Gene hin. Die zelleigene Zytokin-Sekretion der CD8<sup>+</sup> T-Zellen scheint nicht ursächlich für die erhöhte Expression der zytotoxischen Effektormoleküle zu sein. Die hier dargestellten Ergebnisse wurden in Teilen bereits publiziert (Zöphel et al., 2023).

## 4 Diskussion

Immunoseneszenz ist ein unvermeidliches Phänomen des Alterungsprozesses und führt zu einer erhöhten Anfälligkeit für schwere Infektionen und Tumorerkrankungen. Bei Krebsdiagnose ist die Mehrheit der Patienten älter als 65 Jahre. Dennoch ist diese Altersgruppe bei klinischen Studien zu neuen Immuntherapien häufig unterrepräsentiert (Granier et al., 2021; Hamilton & Henry, 2020; Kanesvaran et al., 2018). Durch Komorbiditäten und Immunoseneszenz gelten ältere Patienten häufig als ungeeignet, wodurch die Nutzen/Risiko-Bewertung neuer Behandlungsstrategien bisher nur unzureichend erfolgt (Godby et al., 2019; Granier et al., 2021; Shouse et al., 2022). CD8<sup>+</sup> T-Zellen spielen eine Schlüsselrolle bei der Eliminierung infizierter und entarteter Zellen. Moderne immuntherapeutische Ansätze wie der adoptive T-Zelltransfer nutzen patienteneigene CD8<sup>+</sup> T-Zellen für die gezielte Sensibilisierung gegen Tumorzellen (Baruch et al., 2017; Y. Zhao et al., 2022). Zahlreiche Studien belegen quantitative und funktionale Veränderungen von CD8<sup>+</sup> T-Zellen im Alter (Goronzy & Weyand, 2017; Nikolich-Žugich et al., 2012), was den Erfolg T-Zell-basierter Immuntherapien bei älteren Patienten fraglich erscheinen lässt. Inwieweit funktionale Defekte auf zelleigene Alterationen oder auf eine suboptimale Umgebung und eingeschränkte Antigen-Präsentation zurückzuführen sind, ist bisher weitestgehend unklar, da entsprechende *in vitro* Studien auf Einzelzellebene fehlen (Nikolich-Žugich, 2014). Die Aufklärung intrinsisch erhaltener Fähigkeiten kann für die Wahl geeigneter Immuntherapien jedoch entscheidend sein. Eines der größten Herausforderungen ist die Heterogenität externer Faktoren, die die Immunkompetenz im Alter sehr individuell beeinflussen (Larbi et al., 2008; Ongrádi & Kövesdi, 2010). Die Verwendung von Mausmodellen lieferte bereits umfassende Einblicke in die Mechanismen des Alterungsprozesses (Folgueras et al., 2018; Köks et al., 2016). Die kurze Lebensdauer unter definierten Bedingungen überwindet die Einschränkungen der humanen Alterungsforschung. Zahlreiche Beobachtungen zu phänotypischen und funktionalen Veränderungen humaner CD8<sup>+</sup> T-Zellen im Alter wurden bereits in murinen Modellen beschrieben (Maue et al., 2009; Nikolich-Žugich, 2014).

Durch eine *in vitro* Stimulation minimal manipulierter muriner CD8<sup>+</sup> T-Zellen wurde im Rahmen dieser Arbeit die zellintrinsische Kapazität zur Initiation von Effektorfunktionen im Alter untersucht. Dabei lag der Fokus auf möglichen Alterationen in der Zytotoxizität und dem zelleigenen Proliferations- und Differenzierungspotential von CD8<sup>+</sup> T-Zellen aus gealterten Mäusen. Die hierdurch gewonnenen

Erkenntnisse tragen nicht nur zu einem besseren Verständnis über die zellspezifischen Veränderungen im Alterungsprozess bei, sondern erlauben ebenfalls erste Rückschlüsse über die Eignung von CD8<sup>+</sup> T-Zellen für Immuntherapien im Alter.

#### **4.1 Einfluss zellintrinsischer Alterationen auf die zytotoxische Funktion muriner**

##### **CD8<sup>+</sup> T-Zellen im Alter**

Die verminderte adaptive Immunantwort im Alter wird häufig mit einer verringerten Zytotoxizität von CD8<sup>+</sup> T-Zellen assoziiert. Tatsächlich ist über die Aufrechterhaltung der zytotoxischen Effektorfunktion im Verlauf des Lebens überraschend wenig bekannt. Bisherige Studien in murinen Alterungsmodellen bestätigen die eingeschränkte Fähigkeit zur Bekämpfung bakterieller und viraler Infektionen (Brien et al., 2009; Smithey et al., 2011). Hierbei erfolgte die Beurteilung der zytotoxischen Funktion jedoch nach Aktivierung der Zellen *in vivo*, entweder durch Quantifizierung der Bakterienlast oder durch einen im Anschluss *ex vivo* durchgeführten konventionellen Chrom-basierten (<sup>51</sup>Cr) Zytotoxizitätsassay (Brien et al., 2009). In Studien dieser Art unterliegt die Initiation der Effektorfunktion den Einflüssen der alternden Umgebung und erlaubt somit nur begrenzt Rückschlüsse auf die zelleigene zytotoxische Kapazität der Zellen. In murinen Infektionsmodellen besonders auffallend, ist der Mangel an antigenspezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen in alten Mäusen. Sowohl die Reduktion des naiven T-Zell-Repertoires (Messaoudi et al., 2004) als auch eine eingeschränkte Expansion und erhöhte Apoptose-Induktion aktivierter CD8<sup>+</sup> T-Zellen (Brien et al., 2009; Smithey et al., 2011) führen zu einer deutlich reduzierten Anzahl funktionaler Effektorpopulationen. Allein diese quantitativen Unterschiede scheinen wesentlich zu einer unzureichenden Erreger-Eliminierung beizutragen (Brien et al., 2009; Messaoudi et al., 2004; Smithey et al., 2011). Reziproke Transfer-Experimente nach *Listeria monocytogenes* Infektion zeigten unlängst, dass altersbedingte Alterationen in der Differenzierung und Expansion antigenspezifischer Effektorzellen überwiegend durch zellextrinsische Faktoren bestimmt wird. Während naive CD8<sup>+</sup> T-Zellen aus jungen Mäusen im alten Organismus ein eingeschränktes Proliferations- und Differenzierungspotential aufwiesen, konnten diese Defekte weder nach polyklonaler *in vitro* Stimulation noch nach Transfer alter CD8<sup>+</sup> T-Zellen in junge Mäuse beobachtet werden (Jergović et al., 2019). Die zytotoxische Aktivität der Zellen wurde hier jedoch nicht untersucht. Bisher erlauben nur wenige Studien eine tatsächliche Beurteilung der zellintrinsischen zytotoxischen Funktion im Alter (Saxena et al., 1988; Saxena & Adler, 1999). Interessanterweise zeigten dabei Concanavalin A-aktivierte Splenozyten alter Mäuse im Vergleich eine signifikant höhere Zytotoxizität gegenüber verschiedenen Tumorzelllinien (Saxena et al., 1988). Welchen Einfluss die Zytotoxizität der NK-Zellen innerhalb der Splenozyten-Population nimmt bleibt hier allerdings fraglich.

Anhand eines in unserem Labor etablierten Echtzeit-Zytotoxizitätsassays wurde in dieser Arbeit der Einfluss des Alterns auf die Kinetik der zytotoxischen Aktivität von CD8<sup>+</sup> T-Zellen nach polyklonaler *in vitro* Stimulation untersucht. Dabei zeigte sich, dass CD8<sup>+</sup> T-Zellen aus alten Mäusen ihre Zielzellen signifikant schneller lysieren, gekennzeichnet durch eine steile Lyse-Kinetik unmittelbar nach Zielzellkontakt. CD8<sup>+</sup> T-Zellen aus jungen Mäusen wiesen hingegen eine deutliche Verzögerung der zytotoxischen Aktivität innerhalb der ersten 60 min auf. Die fluoreszenzmikroskopische Analyse auf Einzelzellebene bestätigte, dass CD8<sup>+</sup> T-Zellen aus jungen Mäusen zwar ebenfalls stabile Zielzellkontakte bilden, diese jedoch trotz vergleichbarem Kontaktzeitpunkt, signifikant seltener oder erst verzögert zur Lyse der Zellen führen. Die altersbedingten Unterschiede in der Endpunkt-Lyse sind stark von der Effektor:Zielzell-Ratio abhängig, was die Bedeutung der kinetischen Analyse nochmals unterstreicht. Während der Anteil lysierter Zellen bei einer Effektor:Zielzell-Ratio von 20:1 und 10:1 in beiden Altersgruppen am Endpunkt vergleichbar ist, zeigen CD8<sup>+</sup> T-Zellen aus alten Mäusen bei einer 5:1 Ratio eine signifikant höhere Endpunkt-Lyse.

Insgesamt liefern diese Ergebnisse deutliche Hinweise darauf, dass die altersbedingt unzureichende Eliminierung von Erregern und Tumorzellen *in vivo*, nicht auf zellintrinsische Alterationen in der Zytotoxizität von CD8<sup>+</sup> T-Zellen zurückzuführen ist. In Einklang mit den Ergebnissen von Saxena et al., nimmt die zelleigene zytotoxische Kapazität im Alter zu. Entgegen der Erwartung könnten adoptive T-Zell-Therapien bei älteren Patienten somit besonders vielversprechend sein. Bei diesen Ansätzen erfolgt die Expansion der tumorspezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen *ex vivo* und unterliegt nicht den Einflüssen der gealterten Mikroumgebung. Bisherige Studien mit *in vitro* stimulierten T-Zellen lassen vermuten, dass Defekte im zelleigenen Proliferationspotential, wenn überhaupt beobachtet, deutlich weniger stark ausgeprägt sind (Grossmann et al., 1991; Jergović et al., 2019). Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte Analyse der Proliferationsfähigkeit nach polyklonaler Stimulation zeigte signifikant weniger Zellteilungen der CD8<sup>+</sup> T-Zellen aus alten Mäusen. Die Unterschiede lagen jedoch auch hier unter 10%. Eine unzureichende *in vitro*-Expansion tumorspezifischer CD8<sup>+</sup> T-Zellen sollte sich somit nicht als Limitation für adoptive T-Zell-Therapien im Alter erweisen.

#### 4.1.1 Altersbedingte Veränderungen im Phänotyp der CD8<sup>+</sup> T-Zell-Subpopulationen

Die Differenzierung naiver CD8<sup>+</sup> T-Zellen zu langlebigen antigenspezifischen Gedächtnispopulationen ist essenziell für die Ausbildung einer effektiven T-Zell-Immunität. Zentrale Gedächtnis- (T<sub>CM</sub>) und Effektor-Gedächtnis-T-Zellen (T<sub>EM</sub>) unterscheiden sich in ihren phänotypischen und funktionalen Eigenschaften. Während T<sub>EM</sub> nach erneuter Antigen-Exposition eine schnellere Initiation der Effektorfunktion mit hoher zytotoxischer Kapazität aufweisen, sind T<sub>CM</sub> vor allem durch ihr hohes Proliferationspotential gekennzeichnet, was die schnelle Expansion der antigenspezifischen T-Zellen ermöglicht (Obar & Lefrançois, 2010; Pennock et al., 2013; M. A. Williams & Bevan, 2007). Derzeit

basieren adoptive T-Zell-Therapien überwiegend auf der Verwendung der Gesamt-T-Zellpopulation, wodurch die Wirksamkeit allein durch die individuelle Zusammensetzung einzelner Subtypen beeinflusst wird (Klebanoff et al., 2015; Knörck et al., 2022; Sommermeyer et al., 2016). Inzwischen legen zahlreiche Studien nahe, dass die Verwendung definierter T-Zell-Populationen ein vielversprechender Ansatz zur Optimierung bisheriger Behandlungsstrategien darstellt (Contreras et al., 2018; Q. Liu et al., 2020; Sommermeyer et al., 2016).

Grundsätzlich können alle CD8<sup>+</sup> T-Zell-Subpopulationen für adaptive Immuntherapien genutzt werden, die jeweiligen Eigenschaften der Zellen bringen jedoch entsprechende Vor- und Nachteile mit sich. Voraussetzung für den Therapieerfolg ist neben der erfolgreichen *in vitro*-Expansion vor allem die Fähigkeit zur langfristigen Persistenz nach *in vivo*-Transfer. Hierin liegt sicher ein wesentlicher Grund, warum sich Gedächtnis-Populationen im Vergleich zu CD8<sup>+</sup> Effektor-T-Zellen allgemein als besser geeignet erweisen (Contreras et al., 2018). Die Quantifizierung der Zytotoxizität humaner T<sub>CM</sub> und T<sub>EM</sub> auf Einzelzellebene, zeigte im Vergleich eine deutlich höhere zytotoxische Effizienz von T<sub>EM</sub> und somit einen möglichen Vorteil gegenüber T<sub>CM</sub> (Knörck et al., 2022). Studien zur therapeutischen Wirksamkeit deuten wiederum darauf hin, dass T<sub>CM</sub> eine bessere *in vivo*-Persistenz und höhere Antitumor-Immunität aufweisen als T<sub>EM</sub> (Berger et al., 2008; Q. Liu et al., 2020). Auch kombinatorische Ansätze oder die Verwendung tumorspezifischer Effektorzellen die aus naiven T-Zellen generiert werden, lieferten bereits positive Ergebnisse (Contreras et al., 2018; Hinrichs et al., 2009).

Neben funktionalen Eigenschaften können jedoch auch quantitative Limitationen die Wahl geeigneter Subpopulationen beeinflussen. Angesichts der massiven Verschiebung der CD8<sup>+</sup> T-Zell-Subtypen im Verlauf des Lebens ist dies insbesondere bei zellulären Immuntherapien im Alter ein wesentlicher Faktor. Die durchflusszytometrischen Ergebnisse nach *in vitro* Stimulation isolierter naiver CD8<sup>+</sup> T-Zellen (T<sub>N</sub>) lassen vermuten, dass das zelleigene Differenzierungspotential im Alter weitgehend unverändert bleibt. Allerdings bestätigen die Daten, mit durchschnittlich 72% T<sub>N</sub> in Splenozyten junger Mäuse und 17% T<sub>N</sub> in alten Mäusen den geringen Anteil naiver CD8<sup>+</sup> T-Zellen durch Immunoseneszenz.

Im Vergleich zu T<sub>N</sub> zeichnen sich Gedächtnis-T-Zellen nach TZR-Stimulation durch eine schnelle Initiation der zytotoxischen Aktivität aus (Berard & Tough, 2002). Nach den Ergebnissen von Knörck et al. ist die zytotoxische Effizienz von humanen T<sub>EM</sub> durch eine vermehrte Expression lytischer Effektormoleküle deutlich höher als von T<sub>CM</sub> (Knörck et al., 2022). Die altersabhängige Veränderung der Subtypenverteilung und die bei CD8<sup>+</sup> T-Zellen aus jungen Mäusen beobachtete schnellere Lyse-Kinetik bei steigendem T<sub>EM</sub>-Anteil im Verlauf der Kultivierung, führte zu der Annahme, dass die effiziente Zytotoxizität im Alter in erster Linie auf den unterschiedlichen Anteil von T<sub>N</sub>, T<sub>CM</sub> und T<sub>EM</sub> zurückzuführen ist. Entgegen der Erwartung konnte dies durch die Analyse der Zytotoxizität der einzelnen Subpopulationen jedoch nicht bestätigt werden. In CD8<sup>+</sup> T-Zellen von jungen Mäusen führte die Abwesenheit von T<sub>N</sub> zwar insgesamt zu einer etwas höheren Zytotoxizität, im Vergleich zur

Gesamtpopulation ließen sich jedoch keine signifikanten Unterschiede in der Lyse-Kinetik und maximalen Lyserate nachweisen. Interessanterweise zeigten  $T_{CM}$  und  $T_{EM}$  aus alten Mäusen eine nahezu identisch schnelle Lyse-Kinetik. Im Gegensatz dazu wiesen beide Gedächtnispopulationen der  $CD8^+$  T Zellen aus jungen Mäusen, die zuvor in der Gesamtpopulation beobachtete, verzögerte Zielzellyse auf. Anders als bei  $CD8^+$  T-Zellen aus alten Mäusen, war die zytotoxische Effizienz der  $T_{EM}$  im Vergleich zu  $T_{CM}$  bei jungen Mäusen tendenziell höher, gekennzeichnet durch eine schnellere Lyse-Kinetik und höhere Endpunktllyse. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass es im Alter zu einem veränderten Phänotyp beider  $CD8^+$  Gedächtnispopulationen kommt, die mit einer erhöhten zytotoxischen Funktion einhergehen. Können diese Veränderungen in humanen  $CD8^+$  T-Zellen bestätigt werden, könnten ältere Patienten von einer Subtypen-spezifischen T-Zell-Therapie mit  $T_{CM}$  besonders profitieren. Entscheidend dafür ist jedoch, dass sich der veränderte Phänotyp der  $T_{CM}$  nicht wesentlich auf das zelleigene Proliferationspotential auswirkt. Auch der Einfluss des mit dem Alter steigenden Anteils Antigen-unerfahrener  $T_{VM}$  (*virtual memory T cells*) innerhalb der  $T_{CM}$ -Population wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht näher untersucht.

Grundsätzlich weisen  $T_{VM}$  auch ohne vorherige Antigen-Exposition funktionale Merkmale von Gedächtnis-T-Zellen auf und sind charakterisiert durch die schnelle Initiation von Proliferation und hohe zytotoxische Aktivität nach TZR-Stimulation (Akue et al., 2012; Hussain & Quinn, 2019; Lee et al., 2013; White et al., 2016). Inwieweit sich die Eigenschaften der  $T_{VM}$  im Alter verändern, ist noch unzureichend aufgeklärt. Die Ergebnisse der Zytotoxizitätsassays mit sortierten  $T_{CM}$  und  $T_{EM}$  deuten darauf hin, dass der erhöhte Anteil an  $T_{VM}$  keinen wesentlichen Einfluss auf die Zytotoxizität der Zellen hat, da Kinetik und Effizienz der Zielzellyse in beiden Gedächtnispopulationen aus alten Mäusen identisch ist. Ergebnisse aus einem Influenza-Modell legten ebenfalls nahe, dass  $T_{VM}$  aus alten Mäusen durchaus in der Lage sind de novo Infektionen effektiv zu bekämpfen (Lanzer et al., 2018). Allerdings scheinen  $T_{VM}$  im Alter vermehrt einen seneszenten Phänotyp mit eingeschränkter Proliferationsfähigkeit aufzuweisen (Quinn et al., 2018).

Zusammengenommen bekräftigen die altersbedingten Unterschiede innerhalb der  $CD8^+$  T-Zell-Subtypen den Nutzen, zellbasierte Immuntherapien gezielter an das Alter der Patienten auszurichten.

#### 4.1.2 Altersbedingte Veränderungen in der Granula-Exozytose-vermittelten Zytotoxizität

Die gesteigerte zytotoxische Aktivität beider  $CD8^+$  Gedächtnispopulationen im Alter lässt vermuten, dass Immunoseneszenz mit grundlegenden Veränderungen der zytotoxischen Effektorfunktion einhergeht. Die Granula-Exozytose vermittelte Zytotoxizität und die Apoptose-Induktion durch Bindung des Fas-Liganden an den Todesrezeptor Fas auf Zielzellen, gehören zu den zwei bedeutendsten Mechanismen der zytotoxischen Funktion von  $CD8^+$  T-Zellen (Shresta et al., 1998; Zelinskyy et al., 2004).

Die bei  $CD8^+$  T-Zellen alter Mäuse beobachtete, schnelle Zielzell-Lyse innerhalb von Minuten, spricht weniger für Alterationen in den vergleichsweise langsamen Fas/FasL-vermittelten Signalwegen, sondern

vielmehr für eine verstärkte Granula-Exozytose-vermittelte Zytotoxizität, bei der die Freisetzung lytischer Granula eine schnelle Aktivierung der Caspase-Kaskade zur Folge hat (Hassin et al., 2011; J. Li et al., 2014). Sowohl die durchflusszytometrische Quantifizierung des Degranulationsmarkers CD107a als auch die Analyse der Vesikel-Fusionen mittels TIRF-Mikroskopie zeigten keine altersbedingten Unterschiede im Degranulationsverhalten der CD8<sup>+</sup> T-Zellen. Die schnelle Zytotoxizität ist somit nicht auf eine vermehrte Freisetzung lytischer Granula zurückzuführen. Die Quantifizierung von Perforin und Granzym B zeigte hingegen eine im Alter signifikant erhöhte Expression der in den Vesikeln enthaltenen Effektormoleküle. Während unstimulierte CD8<sup>+</sup> T-Zellen beider Altersgruppen vergleichbare mRNA-Level aufweisen, geht die Stimulation der Zellen aus alten Mäusen mit einer 5-fach höheren Expression von Granzym B und einer 19-fach höheren Expression von Perforin einher. Die intrazelluläre Färbung zeigte zudem eine sehr unterschiedliche Verteilung von Granzym B innerhalb der CD8<sup>+</sup> T-Zell-Population, wobei ein erheblicher Anteil an CD8<sup>+</sup> T-Zellen aus jungen Mäusen überhaupt kein oder nur sehr wenig Granzym B aufweisen. Die schnelle Kinetik der Zielzellyse durch CD8<sup>+</sup> T-Zellen alter Mäuse scheint somit durch eine erhöhte Expression zytotoxischer Effektormoleküle begründet zu sein. Auch die mRNA-Expression von FasL ist in stimulierten CD8<sup>+</sup> T-Zellen aus alten Mäusen um das 2-fache erhöht. Li et al. konnten in Perforin-defizienten CD8<sup>+</sup> T-Zellen keine Fas/FasL-vermittelte Caspase-Aktivierung innerhalb der ersten 90 Minuten nach Zielzellkontakt nachweisen (J. Li et al., 2014). Die Ergebnisse von Hassin et al. zeigten allerdings eine schnellere und effizientere Zielzellyse bei Kombination beider Zytotoxizitätsmechanismen (Hassin et al., 2011). Die in dieser Arbeit eingesetzten P815-Mastozytom-Zellen zeichnen sich durch eine schwache Expression des Fas-Rezeptors aus (Saxena & Adler, 1999). Um eine unterstützende Fas/FasL-vermittelte Zytotoxizität als Ursache für die schnelle Lyse-Kinetik dennoch sicher ausschließen zu können, wurden Zytotoxizitätsassays mit FasL-blockierendem Antikörper durchgeführt. In beiden Altersgruppen konnte durch die Behandlung kein Unterschied in der Kinetik und Endpunkt-Lyse der Zielzellen beobachtet werden. Zudem konnte durch die Antikörper-induzierte Aktivierung des Fas-Rezeptors auf den Zielzellen keine Lyse induziert werden. Dieser Zytotoxizitätsmechanismus scheint hier also, wenn überhaupt, nur eine untergeordnete Rolle zu spielen.

Immunoseneszenz wird mit einer beeinträchtigten TZR-Signalgebung assoziiert, die mit einer kompensatorischen Hochregulation von NK-Zell-Rezeptoren auf CD8<sup>+</sup> T-Zellen einhergeht (Michel et al., 2016; Vallejo et al., 2011). Dieses Phänomen wurde insbesondere in humanen CD8<sup>+</sup> T-Zellen umfangreich charakterisiert. Dabei wird die Expression von NK-Zell-Rezeptoren auf CD8<sup>+</sup> T-Zellen mit dem zeitgleichen Verlust des Co-stimulatorischen Rezeptors CD28 in seneszenten Zellen in Verbindung gebracht (Abedin et al., 2005; Effros, 2004). NKG2D ist ein aktivierender Rezeptor der auf allen NK-Zellen, aber auch auf CD8<sup>+</sup> T-Zellen exprimiert wird und unter anderem an der TZR-unabhängigen Initiation der zytotoxischen Effektorfunktion beteiligt ist (Prajapati et al., 2018; Verneris et al., 2004).

Anders als humane CD8<sup>+</sup> T-Zellen, exprimieren naive murine T-Zellen kein NKG2D. Hier erfolgt die Expression nach TZR-Aktivierung (Raulet, 2003; Wensveen et al., 2018). Eine vermehrte Expression von NKG2D in CD28<sup>-</sup> CD8<sup>+</sup> T-Zellen konnte bereits nachgewiesen werden. Die Hochregulation von NKG2D und anderen NK-Zell-Rezeptoren ist dabei nicht auf das Altern beschränkt. Eine Zunahme dieser „NK-Zell-ähnlichen CD8<sup>+</sup> T-Zellen“ ist ebenfalls bei chronisch entzündlichen Erkrankungen und Virusinfektionen beschrieben (Michel et al., 2016; Pereira et al., 2020; Pereira & Akbar, 2016) und scheint somit in erster Linie mit einer vermehrten Anzahl seneszenten CD28<sup>-</sup> T-Zellen verbunden zu sein. Die Anzahl seneszenten CD28<sup>-</sup> CD8<sup>+</sup> T-Zellen nimmt im Alter wiederum ebenfalls zu (Effros, 2004; Pereira et al., 2020). Die Analyse der mRNA-Expression von NKG2D zeigte keine altersbedingten Unterschiede nach dreitägiger *in vitro* Stimulation der murinen CD8<sup>+</sup> T-Zellen. Liganden von NKG2D werden auf P815-Zellen schwach exprimiert (Diefenbach et al., 2000). Durch die Antikörper-vermittelte Blockierung von NKG2D im Echtzeit-Zytotoxizitätsassay konnte in keinen der beiden Altersgruppen eine Veränderung der zytotoxischen Effizienz und Lyse-Kinetik beobachtet werden.

Diese Ergebnisse legen nahe, dass die schnelle Zytotoxizität im Alter weniger durch Veränderungen in unterstützenden, Rezeptor-vermittelte Signalwegen verursacht wird, sondern maßgeblich durch die erhöhte Expression der lytischen Effektormoleküle Granzym B und Perforin bedingt ist.

#### 4.1.3 Einfluss von Interleukin-2 auf die zytotoxische Funktion von CD8<sup>+</sup> T-Zellen im Alter

Interleukin-2 (IL-2) ist eines der bedeutendsten Zytokine des Immunsystems, das durch seine pleiotrope Wirkung auf verschiedene Immunzellen das Gleichgewicht zwischen Immunstimulation und -suppression reguliert. IL-2 ist wesentlich für die Proliferation und Initiation der Effektorfunktionen von CD8<sup>+</sup> T-Zellen und NK-Zellen, fördert andererseits aber ebenfalls die Proliferation und Aktivität von regulatorischen T-Zellen und hemmt somit Immunantworten (Boyman & Sprent, 2012). Vermittelt wird die stimulatorische und inhibitorische Wirkung durch die Bindungsaffinität der unterschiedlichen IL-2-Rezeptor-Konformationen auf den Immunzellen (Overwijk et al., 2021; Tahvildari & Dana, 2019).

Neben seiner Beteiligung an Proliferation und Differenzierung nimmt IL-2 in CD8<sup>+</sup> T-Zellen direkten Einfluss auf die Expression von Perforin und Granzymen (Janas et al., 2005; Zhang et al., 1999) und ist somit neben der Aktivierung des T-Zell-Rezeptors ein essenzieller Bestandteil für eine adäquate Expansion und zytotoxische Effektorfunktion von CD8<sup>+</sup> T-Zellen *in vitro* und *in vivo*. Eine altersbedingte Reduktion der IL-2-Spiegel ist ein weitverbreitetes Dogma, sollte jedoch differenzierter betrachtet werden. Die IL-2-Konzentration im Serum scheint sich im Alter nicht signifikant zu verändern (Jergović et al., 2019; Kim et al., 2011). Studien zur IL-2-Produktion von CD8<sup>+</sup> T-Zellen liefern teils unterschiedliche Ergebnisse und verdeutlichen welchen Einfluss die Art der Stimulation auf die altersabhängige Expression von Zytokinen hat (Engwerda et al., 1996; Mu & Thoman, 1999; Pieren et al., 2019).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Einfluss unterschiedlicher externer IL-2-Konzentrationen auf die Differenzierung und Zytotoxizität von CD8<sup>+</sup> T-Zellen aus jungen und alten Mäusen untersucht. Die dreitägige Stimulation der CD8<sup>+</sup> T-Zellen mit 500, 100 und 50 U/ml IL-2 führte in beiden Altersgruppen zu keiner signifikanten Veränderung der zytotoxischen Aktivität. Die Reduktion der IL-2-Konzentration auf 20 U/ml hatte in CD8<sup>+</sup> T-Zellen junger Mäuse hingegen eine signifikante Abnahme der Zytotoxizität zur Folge. Dieser Effekt konnte in CD8<sup>+</sup> T-Zellen alter Mäuse nicht beobachtet werden. Der Einfluss von IL-2 auf die Initiation der zytotoxischen Effektorfunktion ist im Alter somit deutlich geringer. Nach sechstägiger Stimulation führte die Reduktion auf 20 U/ml IL-2 in beiden Altersgruppen zu einer signifikanten Abnahme der zytotoxischen Aktivität. Das Differenzierungspotential der CD8<sup>+</sup> T-Zellen wurde durch die Verringerung der IL-2-Konzentration nicht wesentlich beeinflusst. CD8<sup>+</sup> T-Zellen aus jungen Mäusen zeigten nach 6 Tagen Stimulation mit 20 U/ml IL-2 einen höheren Anteil an naiven T-Zellen und weniger Effektor-Gedächtnis-T-Zellen, die Unterschiede waren jedoch gering. Die Differenzierung der CD8<sup>+</sup> T-Zellen aus alten Mäusen war bei allen eingesetzten IL-2-Konzentrationen vergleichbar. Insgesamt zeigte sich, dass CD8<sup>+</sup> T-Zellen alter Mäuse trotz reduzierter IL-2 Spiegel ein gleichbleibendes Differenzierungspotential und eine hohe zytotoxische Aktivität aufweisen. Für die Aufrechterhaltung der zytotoxischen Effizienz nach initialer Aktivierung sind allerdings auch CD8<sup>+</sup> T-Zellen im Alter auf höhere externe IL-2-Konzentrationen angewiesen.

Die endogene IL-2-Produktion der CD8<sup>+</sup> T-Zellen wurde in dieser Arbeit nicht untersucht. Daher bleibt die Ursache für die altersbedingt verringerte IL-2-Abhängigkeit sehr spekulativ. Angesichts der mehrfach beschriebenen, reduzierten IL-2-Sekretion im Alter (Engwerda et al., 1996; Pieren et al., 2019), erscheint eine vermehrte autokrine Wirkung allerdings fraglich. Vielmehr könnte es sich hierbei um eine Anpassung an die reduzierten IL-2-Spiegel in der alternden Umgebung handeln. Ein ähnliches Phänomen wurde bereits bezüglich der Ca<sup>2+</sup>-Abhängigkeit auf die zytotoxische Funktion der CD8<sup>+</sup> T-Zellen beobachtet. Auch hier gehen die altersbedingt reduzierten Ca<sup>2+</sup>-Signale in CD8<sup>+</sup> T-Zellen mit einer verringerten Sensitivität gegenüber Schwankungen in der externen Ca<sup>2+</sup>-Konzentration einher (Angenendt et al., 2020). Durch seine stimulatorische und suppressive Wirkung findet IL-2 sowohl bei der Krebstherapie als auch bei der Behandlung von Autoimmunerkrankungen klinische Anwendung (Bendickova & Fric, 2020). Für eine ausreichende Aktivierung der CD8<sup>+</sup> T-Zellen ist bei der Behandlung von Tumorerkrankungen eine hohe Dosis IL-2 erforderlich. Damit verbundene, schwere Nebenwirkungen wie das „Vascular-Leak-Syndrom“ oder der Zytokinsturm schränken den breiten Einsatz jedoch erheblich ein (Jiang et al., 2016; Overwijk et al., 2021). Die Behandlung von Autoimmunerkrankungen erfordert wiederum die Verabreichung von niedrig dosiertem IL-2 um die Stimulation von regulatorischen T-Zellen zu fördern ohne zytotoxische CD8<sup>+</sup> T-Zellen zu aktivieren. Klinische Studien zeigten allerdings, dass die Wirksamkeit von niedrig dosiertem IL-2 aufgrund der kurzen Halbwertszeit begrenzt ist (Tahvildari & Dana, 2019). Aufgrund der bestehenden Limitationen auf beiden Seiten stehen verschiedene Ansätze zur

Optimierung der Rezeptor-Affinitäten von rekombinatem IL-2 im Fokus aktueller Forschung (Mo et al., 2021; Overwijk et al., 2021).

Der in dieser Arbeit aufgezeigte, verminderte Einfluss von IL-2 auf die Effektorfunktion von CD8<sup>+</sup> T-Zellen im Alter, könnte sich mit Blick auf die Dosierung in Immuntherapien als wichtiger Aspekt erweisen.

#### 4.1.4 Veränderungen der Zytotoxizität von CD8<sup>+</sup> T-Zellen im mittleren Lebensalter

Die bisherigen Ergebnisse legen nahe, dass die Remodellierung des Immunsystems während des Alterns mit einer tiefgreifenden Veränderung der zellintrinsic zytotoxischen Kapazität von CD8<sup>+</sup> T-Zellen einhergeht. Im Allgemeinen gilt die Annahme, dass sich altersbedingte Veränderungen der Immunzellen allmählich anhäufen. Klinisch relevant scheint Immunoseneszenz ab einem Alter von 65 Jahren zu werden, gekennzeichnet durch die starke Zunahme der Inzidenz von Tumorerkrankungen und schweren Verläufen bei Infektionen in dieser Altersgruppe (Cillóniz et al., 2018; Gold et al., 2020; Pilleron et al., 2019). Eine umfangreiche Studie zur altersabhängigen epigenetischen Signatur zeigte, dass humane Immunzellen während des Lebens zwei kurze Zeitspannen durchlaufen, in der abrupte epigenetische Veränderungen (sog. *Breakpoints*) stattfinden (Márquez et al., 2020). Interessanterweise scheint eine erste Remodellierung der Genexpression bereits in einem Alter von etwa 38-42 Jahren zu erfolgen. Eine weitere Periode plötzlicher epigenetischer Veränderungen findet, geschlechtsabhängig, zwischen dem 62. und 71. Lebensjahr statt. Diese führen unter anderen zu einer veränderten Expression von Transkriptionsfaktoren, zellspezifischen Oberflächenmarkern und zytotoxischen Effektormolekülen (Márquez et al., 2020).

Für die Untersuchung der zytotoxischen Kapazität von murinen CD8<sup>+</sup> T-Zellen im Alter, wurden in dieser Arbeit zunächst junge (12-26 Wochen) und alte (75-102 Wochen) weibliche C57BL/6J Mäuse verwendet. Um der Frage nachzugehen, in welchem zeitlichen Verlauf erste Veränderungen der zellintrinsic zytotoxischen Kapazität sichtbar werden, wurde im nächsten Schritt die Kinetik der Zielzellyse von CD8<sup>+</sup> T-Zellen aus Mäusen in einer Altersspanne von 33 bis 63 Wochen untersucht. Überraschenderweise zeigte sich, dass die Zytotoxizität mit zunehmendem Alter nicht allmählich gesteigert wird, sondern ab einem Alter von 49 Wochen sprunghaft erhöht ist. Während CD8<sup>+</sup> T-Zellen aus Mäusen zwischen 33 und 46 Wochen eine zur jungen Altersgruppe (< 26 Wochen) nahezu identische, verzögerte zytotoxische Aktivität aufwiesen, entsprach die schnelle Lyse-Kinetik der CD8<sup>+</sup> T-Zellen aus Mäusen zwischen 49 und 63 Wochen der Kinetik alter Mäuse (> 75 Wochen). Folglich scheinen altersbedingte Alterationen in der zytotoxischen Effektorfunktion der CD8<sup>+</sup> T-Zellen innerhalb dieser 3-wöchigen (46-49 Wochen) Zeitspanne stattzufinden. Auch wenn die altersbedingten Veränderungen in der Kinetik der Zielzellyse weitestgehend unabhängig von der Verteilung der T-Zell-Subtypen ist, zeigte sich in einem Alter von 46-49 Wochen ebenfalls eine signifikante Verschiebung der naiven T-Zell-Population hin zu

Gedächtnis-T-Zellen. Dies lässt eine umfassende Remodellierung der T-Zell-Immunität bereits im mittleren Lebensalter vermuten.

Eine 4-wöchige Lebensspanne in Mäusen entspricht ungefähr 3,5 Jahren beim Menschen (Diaz Brinton, 2012). Interessanterweise entspricht die Altersspanne von 46-49 Wochen somit in etwa dem Zeitpunkt der erstmals auftretenden epigenetischen Veränderungen in humanen T-Zellen in einem Alter von ca. 40 Jahren (Márquez et al., 2020). In Folge der Chromatin-Modifikationen konnten Márquez et al. bereits eine erhöhte Expression von Granzym B und Perforin ab dem mittleren Lebensalter nachweisen. Nach ihren Erkenntnissen ist die erste abrupte epigenetische Remodellierung der Immunzellen nicht geschlechtsspezifisch. Die Tatsache, dass sich weibliche Mäuse in einem Alter von 46-49 Wochen in der Perimenopause/Menopause befinden (Diaz Brinton, 2012; Van Kempen et al., 2011), sollte hier dennoch nicht unberücksichtigt bleiben. Dass die hormonelle Umstellung und der damit einhergehende Östrogenmangel zu Veränderungen des Immunsystems führt, ist bereits mehrfach beschrieben (C. M. Gameiro et al., 2010; Han et al., 2021). Neben vermehrten systemischen Entzündungsreaktionen (Abildgaard et al., 2020; C. Gameiro, 2010), zeigten Shen und Rodriguez-Garcia et al. kürzlich eine erhöhte zytotoxische Aktivität von CD8<sup>+</sup> T-Zellen aus dem Endometrium von Frauen nach der Menopause (Rodriguez-Garcia et al., 2020; Shen et al., 2022).

Ob die in dieser Arbeit beobachtete plötzliche Zunahme der Zytotoxizität im mittleren Lebensalter tatsächlich geschlechtsunspezifisch ist oder auf hormonelle Veränderungen zurückgeführt werden kann, bleibt demnach fraglich und erfordert eine detailliertere Untersuchung.

#### **4.2 Verwendung eines heterozygoten OT-I Mausmodells für Alterungsstudien zur antigenspezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zell-Immunität**

Im Gegensatz zur antigenspezifischen Immunantwort *in vivo*, erfolgt die Aktivierung muriner und humaner T-Zellen im Rahmen von *in vitro* Studien in der Regel antigenunspezifisch mittels Superantigenen (Knörck et al., 2022), Lektinen (Saxena & Adler, 1999) oder, wie auch in dieser Arbeit, Antikörper-basiert (Kummerow et al., 2014; Zhu et al., 2021). Modellantigene wie Ovalbumin (OVA) bieten eine wertvolle Alternative zur polyklonalen Stimulation der Zellen. Die TZR-transgene Mauslinie OT-I exprimiert T-Zell-Rezeptoren auf CD8<sup>+</sup> T-Zellen, die spezifisch das über MHC-I präsentierte OVA<sub>257-264</sub> Peptid erkennen. OT-I Mäuse haben sich somit zu einem weitverbreitetem Modellsystem für Studien zur antigenspezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zell-Immunität entwickelt und finden häufig Anwendung bei Untersuchungen zu Infektionskrankheiten, Autoimmunität und Krebs (Jenkins et al., 2006; Miyagawa et al., 2010; Rosato et al., 2019).

Die Verwendung von OT-I Mäusen in Alterungsstudien ist bisher hingegen vorwiegend auf *in vivo* Transfer-Modelle beschränkt, bei denen CD8<sup>+</sup> T-Zellen aus jungen OT-I Mäusen in gealterte

Wildtyp-Mäuse übertragen werden (Becklund et al., 2016; Decman et al., 2012; G. Li et al., 2012). Die unzureichende Immunantwort der OT-I CD8<sup>+</sup> T-Zellen gegen andere antigene Epitope führt zu einem immundefizienten Phänotyp, der den Gesundheitsstatus und die Lebenserwartung der Mäuse deutlich reduziert. Aus diesem Grund sind die üblicherweise verwendeten homozygoten OT-I Mäuse für Alterungsmodelle weitestgehend ungeeignet. Wie effizient antigenspezifische CD8<sup>+</sup> T-Zellen aus alten OT-I Mäusen ihre Effektorfunktion ausüben können, blieb folglich bislang unklar.

Um die nach polyklonaler Stimulation beobachtete erhöhte Zytotoxizität von CD8<sup>+</sup> T-Zellen im Alter dennoch in einem antigenspezifischen Modell bestätigen zu können, wurde im Rahmen dieser Arbeit eine heterozygote OT-I Linie (OT-I<sup>+/-</sup>) etabliert, deren Lebenserwartung vergleichbar mit der von Wildtyp-Mäusen ist. Der zunächst durchgeführte Vergleich phänotypischer und funktionaler Merkmale der CD8<sup>+</sup> T-Zellen aus jungen homo- und heterozygoten OT-I Mäusen bestätigte die Anwendbarkeit eines heterozygoten Modellsystems. CD8<sup>+</sup> T-Zellen aus jungen OT-I<sup>+/+</sup> und OT-I<sup>+/-</sup> Mäusen unterscheiden sich kaum in der Expression des transgenen T-Zell-Rezeptors und zeigten eine vergleichbare Proliferation und Zytotoxizität nach antigenspezifischer Aktivierung. Darüber hinaus konnten häufig beschriebene altersbedingte Veränderungen der CD8<sup>+</sup> T-Zellen wie der Rückgang naiver T-Zellen, begleitet von der Zunahme an Gedächtnis-T-Zellen und einer verminderten Proliferationsfähigkeit, ebenfalls in alten OT-I<sup>+/-</sup> Mäusen beobachtet werden. Diese Ergebnisse zeigen erstmals, dass die Verwendung heterozygoter TZR-transgener Mäuse bisherige Limitationen überwindet und sich zudem als vielversprechender Ansatz zur Belastungsreduktion im Sinne der 3R (*Replacement, Reduction, Refinement*)-Richtlinien im Umgang mit Versuchstieren (Lewis, 2019) erweisen kann.

Die Möglichkeit heterozygote OT-I Mäuse bis ins hohe Alter zu halten und die Entwicklung typischer altersbedingter Veränderungen ihrer CD8<sup>+</sup> T-Zellen, macht sie zu einem attraktiven Modell mit breitem Anwendungsfeld für *in vivo* und *in vitro* Alterungsstudien.

#### **4.2.1 Antigen-spezifisches OT-I<sup>+/-</sup> Modell bestätigt erhöhte Zytotoxizität von CD8<sup>+</sup> T-Zellen im Alter**

Die Generierung einer heterozygoten OT-I Linie ermöglichte die Untersuchung altersbedingter, zellintrinsischer Veränderungen der zytotoxischen Funktion von CD8<sup>+</sup> T-Zellen nach antigenspezifischer *in vitro*-Aktivierung. In Übereinstimmung mit den Ergebnissen von C57BL/6J Wildtyp-Mäusen, wiesen CD8<sup>+</sup> T-Zellen aus jungen OT-I<sup>+/+</sup> und OT-I<sup>+/-</sup> Mäusen eine verzögerte zytotoxische Aktivität innerhalb der ersten 60 Minuten auf. CD8<sup>+</sup> T-Zellen aus alten OT-I<sup>+/-</sup> Mäusen zeigten hingegen eine signifikant schnellere und effizientere Zielzellyse. Diese altersbedingten Unterschiede konnten sowohl in weiblichen als auch männlichen OT-I Mäusen beobachtet werden und verdeutlichen, dass die erhöhte Zytotoxizität im Alter nicht auf geschlechtsspezifische Ursachen zurückzuführen ist. Die Ergebnisse im antigenspezifischen Modellsystem unterstützen die Annahme, dass die hohe zytotoxische Effizienz durch

zelleigene Alterationen bestimmt wird, die unabhängig von der Art der T-Zell-Rezeptor-Stimulation greifen. Die, wie zuvor in CD8<sup>+</sup> T-Zellen aus alten C57BL/6J Wildtyp-Mäusen nachgewiesenen, erhöhten mRNA-Level von Granzym B, Perforin und FasL in alten OT-I CD8<sup>+</sup> T-Zellen bekräftigen den zugrunde liegenden Mechanismus erneut.

Die Regulation der Genexpression ist ein komplexer, mehrstufiger Prozess. Daher stellte sich die Frage, ob die auf mRNA-Ebene beobachteten altersabhängigen Unterschiede durch eine erhöhte Gentranskription oder durch eine reduzierte mRNA-Degradation bedingt sind. Alterationen in posttranskriptionalen Modifikationen durch Veränderungen in der Expression verschiedener microRNAs im Alter wurden bereits beschrieben (Gustafson et al., 2019; Hackl et al., 2010). Die kinetische Analyse des mRNA-Abbaus von Perforin, Granzym B und FasL nach Behandlung der OT-I CD8<sup>+</sup> T-Zellen mit dem Transkriptioninhibitor Actinomycin D zeigte allerdings keine signifikanten Unterschiede zwischen den Altersgruppen. Somit können altersbedingte Alterationen in der posttranskriptionalen Modifikation als Ursache für die hohen mRNA-Level weitestgehend ausgeschlossen werden. Vielmehr besitzen CD8<sup>+</sup> T-Zellen im Alter offenbar die Fähigkeit zur verstärkten Transkription von Genen mit Beteiligung an zytotoxischen Signalwegen.

Eine erhöhte Expression von Granzym B, Perforin und FasL wurde ebenfalls in humanen CD8<sup>+</sup> T-Zellen beschrieben (Aggarwal & Gupta, 1998; Márquez et al., 2020; Westmeier et al., 2020), was darauf hindeutet, dass die Hochregulation dieser Gene im Alter einem konservierten Prozess zugrunde liegt. Einen bedeutenden Einfluss auf das alternde Immunsystem hat die sowohl im murinen als auch im humanen Organismus auftretende Veränderung des Zytokinmilieus mit einer erhöhten Expression pro-inflammatorischer Zytokine und der Entstehung chronischer Entzündungsreaktionen (Fulop et al., 2016; Weiskopf et al., 2009). Die Sekretion von Zytokinen nach TZR-Aktivierung und die Expression ihrer Negativ-Regulatoren SOCS (*suppressors of cytokine signaling*) tragen entscheidend zum Transkriptionsprofil der CD8<sup>+</sup> T-Zellen bei (Yoshimura et al., 2018). Fraglich ist, ob ein pro-inflammatorischer Phänotyp im Alter begleitend einhergeht oder direkten Einfluss auf die Expression zytotoxischer Effektormoleküle nimmt. Während der *in vitro* Stimulation sind die OT-I CD8<sup>+</sup> T-Zellen, ausgenommen von Interleukin 2 und antigenspezifischen Zielzellen, keinen externen Stimuli ausgesetzt. Sowohl die durchgeführte Analyse der Zytokin-Sekretion und SOCS-Expression als auch die Co-Stimulation der CD8<sup>+</sup> T-Zellen aus alten und jungen Mäusen im Transwell-System, ergab keine Hinweise darauf, dass die zelleigene Zytokin-Sekretion ursächlich für die erhöhte Zytotoxizität im Alter ist. Inwieweit sich ein verändertes Zytokinmilieu im alterndem Organismus jedoch bereits auf das Transkriptionsprofil, einschließlich epigenetischer Modifikationen in CD8<sup>+</sup> T-Zellen auswirkt (Goronzy et al., 2018; Márquez et al., 2020; Shin et al., 2013), bleibt offen.

#### 4.2.2 Die hohe zytotoxische Effizienz von CD8<sup>+</sup> T-Zellen im Alter hat einen nekrotischen

##### Zielzelltod zur Folge

Die bisherigen Ergebnisse verdeutlichen, dass die erhöhte Expression von Granzym B und Perforin ausschlaggebend für die hohe zytotoxische Effizienz der CD8<sup>+</sup> T-Zellen im Alter ist. Im Allgemeinen vermittelt Perforin durch seine porenbildende Eigenschaft die Aufnahme von Granzymen in die Zielzelle und induziert somit die nachfolgende Caspase-abhängige Apoptose. Hohe Perforin-Konzentrationen können die Membranintegrität jedoch erheblich schädigen, so dass zelleigene Reparaturmechanismen nicht mehr greifen und die Zelle nekrotisch lysiert (Backes et al., 2018). Die unter Verwendung des Apoptose-Reporters pCasper durchgeführte fluoreszenzmikroskopische Analyse des Zielzelltodes durch CD8<sup>+</sup> T-Zellen aus jungen und alten OT-I Mäusen legt nahe, dass die altersbedingte Hochregulation der Perforin-Expression zu einer Verschiebung der Granzym-vermittelten Apoptose hin zur schnellen Nekrose-Induktion von Zielzellen führt.

Bisher unzureichend geklärt ist, welche Bedeutung ein häufig *in vitro* beobachteter, nekrotischer Zelltod durch zytotoxische Immunzellen (Backes et al., 2018; Knörck et al., 2022; Vanherberghen et al., 2013) bei der Abtötung infizierter oder entarteter Zellen *in vivo* hat. Bei CD8<sup>+</sup> T-Zellen aus jungen OT-I Mäusen erfolgte die nekrotische Lyse der Zielzellen bei einer Effektor:Zielzell-Ratio von 2:1 frühestens zwei Stunden nach Granzym-vermittelter Aktivierung der Caspase-Kaskade. In einer inflammatorischen Umgebung *in vivo* ist wahrscheinlich anzunehmen, dass die zuvor apoptotischen Zellen zu diesem Zeitpunkt bereits durch Phagozyten beseitigt wurden (Barth et al., 2017; Maderna & Godson, 2003). Bei einer schnellen Nekrose-Induktion innerhalb weniger Minuten nach Zielzellkontakt, wie sie durch CD8<sup>+</sup> T-Zellen alter Mäuse beobachtet wurde, ist eine Beseitigung der Zellen vor Freisetzung des Zellinneren hingegen fraglich.

Ein nekrotischer Zelltod wird allgemein mit einer starken, entzündungsfördernden Immunantwort in Verbindung gebracht, die häufig mit einer erhöhten Konzentration pro-inflammatorischer Zytokine, Gewebeschädigungen und einem fortschreitenden Krankheitsverlauf einhergeht (Oliveira et al., 2018; Wallach et al., 2014; M. Williams et al., 2021). Inwieweit die zellintrinsisch, hohe zytotoxische Kapazität der CD8<sup>+</sup> T-Zellen auch unter dem Einfluss der veränderten Mikroumgebung im Alter zum Tragen kommt und somit altersbedingte inflammatorische Prozesse begünstigen könnte, ist ungewiss.

In soliden Tumoren ist die durch Hypoxie und metabolischen Stress ausgelöste Nekrose der Krebszellen ein bekanntes Phänomen, dessen Bedeutung für die Tumorprogression jedoch noch unzureichend aufgeklärt ist (Hangai et al., 2021; Jiao et al., 2018; Z. Liu & Jiao, 2020). Bisherige Studien deuten darauf hin, dass die Freisetzung intrazellulärer Komponenten die Immunantwort auf unterschiedliche Weise moduliert, mit sowohl positiver als auch negativer Auswirkung auf das Tumorstadium (Hangai et al., 2021; Z. Liu & Jiao, 2020). Dass ein nekrotischer Zelltod durch infiltrierende CD8<sup>+</sup> T-Zellen die Antitumor-Immunität in irgendeiner Weise beeinflussen wird, scheint sehr wahrscheinlich. Mit Blick auf

den möglichen Einsatz von CD8<sup>+</sup> T-Zellen für Immuntherapien im Alter sollte diese Eigenschaft somit nicht unberücksichtigt bleiben.

### 4.3 Fazit

Zahlreiche intrinsische und extrinsische Veränderungen tragen zu einer beeinträchtigten Immunantwort im Alter bei. Der in dieser Arbeit auf zelleigene Veränderungen gerichtete Fokus, liefert erstmals deutliche Hinweise darauf, dass die intrinsische zytotoxische Kapazität von CD8<sup>+</sup> T-Zellen trotz insgesamt verringerter T-Zell-Immunität im Alter zunimmt. Diese Ergebnisse verdeutlichen auf eindrückliche Weise erneut, dass Immunoseneszenz nicht grundsätzlich mit einer Verschlechterung von Effektorfunktionen einhergeht. Die hohen Perforin-Konzentrationen in CD8<sup>+</sup> T-Zellen alter Mäuse führen zu einer verstärkten zytotoxischen Effizienz, was einen nekrotischen Zielzelltod zur Folge hat. Diese Fähigkeit könnte sich mit Blick auf immunmodulatorische Strategien als vorteilhaft oder auch nachteilig erweisen. Die gleichermaßen in humanen CD8<sup>+</sup> T-Zellen beschriebene, altersbedingt erhöhte Expression zytotoxischer Effektormoleküle, lässt hier ähnliche Mechanismen vermuten. Eine umfangreiche Charakterisierung der zytotoxischen Effektorfunktion humaner CD8<sup>+</sup> T-Zellpopulationen im Alter erscheint somit in jedem Fall sinnvoll. Bisher ebenfalls ungeklärt bleibt die Frage, in welchem Ausmaß extrinsische Faktoren, einschließlich altersbedingter Veränderungen in der inflammatorischen Mikroumgebung, die zelleigene zytotoxische Funktion beeinflussen können. Die Etablierung des heterozygoten OT-I Modells bietet einen wertvollen Ansatz für eine entsprechende Analyse der Zytotoxizität nach antigenspezifischer *in vivo* Stimulation und stellt ebenfalls eine wichtige Grundlage für zukünftige Tumormodelle zur Beurteilung der Eignung *in vitro* expandierter CD8<sup>+</sup> T-Zellen für adoptive Immuntherapien im Alter dar.

## 5 Literaturverzeichnis

- Abedin, S., Michel, J. J., Lemster, B., & Vallejo, A. N. (2005). Diversity of NKR expression in aging T cells and in T cells of the aged: the new frontier into the exploration of protective immunity in the elderly. *Experimental Gerontology*, *40*(7), 537–548. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2005.04.012>
- Abildgaard, J., Tingstedt, J., Zhao, Y., Hartling, H. J., Pedersen, A. T., Lindegaard, B., & Dam Nielsen, S. (2020). Increased systemic inflammation and altered distribution of T-cell subsets in postmenopausal women. *PLOS ONE*, *15*(6), e0235174. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0235174>
- Aggarwal, S., & Gupta, S. (1998). Increased apoptosis of T cell subsets in aging humans: altered expression of Fas (CD95), Fas ligand, Bcl-2, and Bax. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, *160*(4), 1627–1637. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9469419>
- Ahmed, M., Lanzer, K. G., Yager, E. J., Adams, P. S., Johnson, L. L., & Blackman, M. A. (2009). Clonal expansions and loss of receptor diversity in the naive CD8 T cell repertoire of aged mice. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, *182*(2), 784–792. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.182.2.784>
- 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>
- Anderson, G., Moore, N. C., Owen, J. J., & Jenkinson, E. J. (1996). Cellular interactions in thymocyte development. *Annual Review of Immunology*, *14*, 73–99. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.14.1.73>
- 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*(4), 3266–3286. <https://doi.org/10.18632/aging.102809>
- 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. *The Journal of Biological Chemistry*, *293*(42), 16348–16363. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA118.004549>
- Badovinac, V. P., Porter, B. B., & Harty, J. T. (2002). Programmed contraction of CD8+ T cells after infection. *Nature Immunology*, *3*(7), 619–626. <https://doi.org/10.1038/ni804>
- Barry, M., & Bleackley, R. C. (2002). Cytotoxic T lymphocytes: all roads lead to death. *Nature Reviews Immunology*, *2*(6), 401–409. <https://doi.org/10.1038/nri819>
- Barth, N. D., Marwick, J. A., Vendrell, M., Rossi, A. G., & Dransfield, I. (2017). The “Phagocytic Synapse” and Clearance of Apoptotic Cells. *Frontiers in Immunology*, *8*, 1708. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01708>
- Baruch, E. N., Berg, A. L., Besser, M. J., Schachter, J., & Markel, G. (2017). Adoptive T cell therapy: An overview of obstacles and opportunities. *Cancer*, *123*(S11), 2154–2162.

- <https://doi.org/10.1002/cncr.30491>
- Becklund, B. R., Purton, J. F., Ramsey, C., Favre, S., Vogt, T. K., Martin, C. E., Spasova, D. S., Sarkisyan, G., LeRoy, E., Tan, J. T., Wahlus, H., Bondi-Boyd, B., Luther, S. A., & Surh, C. D. (2016). The aged lymphoid tissue environment fails to support naïve T cell homeostasis. *Scientific Reports*, 6(1), 30842. <https://doi.org/10.1038/srep30842>
- Belardelli, F., & Ferrantini, M. (2002). Cytokines as a link between innate and adaptive antitumor immunity. *Trends in Immunology*, 23(4), 201–208. [https://doi.org/10.1016/s1471-4906\(02\)02195-6](https://doi.org/10.1016/s1471-4906(02)02195-6)
- Bendickova, K., & Fric, J. (2020). Roles of IL-2 in bridging adaptive and innate immunity, and as a tool for cellular immunotherapy. *Journal of Leukocyte Biology*, 108(1), 427–437. <https://doi.org/10.1002/JLB.5MIR0420-055R>
- Berard, M., & Tough, D. F. (2002). Qualitative differences between naïve and memory T cells. *Immunology*, 106(2), 127–138. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2567.2002.01447.x>
- Berent-Maoz, B., Montecino-Rodriguez, E., & Dorshkind, K. (2012). Genetic regulation of thymocyte progenitor aging. *Seminars in Immunology*, 24(5), 303–308. <https://doi.org/10.1016/j.smim.2012.04.006>
- Berger, C., Jensen, M. C., Lansdorp, P. M., Gough, M., Elliott, C., & Riddell, S. R. (2008). Adoptive transfer of effector CD8+ T cells derived from central memory cells establishes persistent T cell memory in primates. *Journal of Clinical Investigation*, 118(1), 294–305. <https://doi.org/10.1172/JCI32103>
- Bhat, P., Leggatt, G., Waterhouse, N., & Frazer, I. H. (2017). Interferon- $\gamma$  derived from cytotoxic lymphocytes directly enhances their motility and cytotoxicity. *Cell Death & Disease*, 8(6), e2836–e2836. <https://doi.org/10.1038/cddis.2017.67>
- Blackman, M. A., & Woodland, D. L. (2011). The narrowing of the CD8 T cell repertoire in old age. *Current Opinion in Immunology*, 23(4), 537–542. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2011.05.005>
- Bonilla, F. A., & Oettgen, H. C. (2010). Adaptive immunity. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 125(2 Suppl 2), S33–40. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2009.09.017>
- Borowski, A. B., Boesteanu, A. C., Mueller, Y. M., Carafides, C., Topham, D. J., Altman, J. D., Jennings, S. R., & Katsikis, P. D. (2007). Memory CD8+ T cells require CD28 costimulation. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 179(10), 6494–6503. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.179.10.6494>
- Boyman, O., & Sprent, J. (2012). The role of interleukin-2 during homeostasis and activation of the immune system. *Nature Reviews Immunology*, 12(3), 180–190. <https://doi.org/10.1038/nri3156>
- Brien, J. D., Uhrlaub, J. L., Hirsch, A., Wiley, C. A., & Nikolich-Žugich, 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>

- Brownlie, R. J., & Zamoyska, R. (2013). T cell receptor signalling networks: branched, diversified and bounded. *Nature Reviews Immunology*, *13*(4), 257–269. <https://doi.org/10.1038/nri3403>
- Castellino, F., & Germain, R. N. (1995). E multiple compartments. *Immunity*, *2*(1), 73–88. [https://doi.org/10.1016/1074-7613\(95\)90080-2](https://doi.org/10.1016/1074-7613(95)90080-2)
- Chang, R. B., & Beatty, G. L. (2020). The interplay between innate and adaptive immunity in cancer shapes the productivity of cancer immunosurveillance. *Journal of Leukocyte Biology*, *108*(1), 363–376. <https://doi.org/10.1002/JLB.3MIR0320-475R>
- Chinn, I. K., Blackburn, C. C., Manley, N. R., & Sempowski, G. D. (2012). Changes in primary lymphoid organs with aging. *Seminars in Immunology*, *24*(5), 309–320. <https://doi.org/10.1016/j.smim.2012.04.005>
- Chiu, B.-C., Martin, B. E., Stolberg, V. R., & Chensue, S. W. (2013). Cutting Edge: Central Memory CD8 T Cells in Aged Mice Are Virtual Memory Cells. *The Journal of Immunology*, *191*(12), 5793–5796. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1302509>
- Cicin-Sain, L., Messaoudi, I., Park, B., Currier, N., Planer, S., Fischer, M., Tackitt, S., Nikolich-Zugich, D., Legasse, A., Axthelm, M. K., Picker, L. J., Mori, M., & Nikolich-Zugich, J. (2007). Dramatic increase in naive T cell turnover is linked to loss of naive T cells from old primates. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *104*(50), 19960–19965. <https://doi.org/10.1073/pnas.0705905104>
- Cillóniz, C., Rodríguez-Hurtado, D., & Torres, A. (2018). Characteristics and Management of Community-Acquired Pneumonia in the Era of Global Aging. *Medical Sciences*, *6*(2), 35. <https://doi.org/10.3390/medsci6020035>
- Clark, R., & Kupper, T. (2005). Old meets new: The interaction between innate and adaptive immunity. *Journal of Investigative Dermatology*, *125*(4), 629–637. <https://doi.org/10.1111/j.0022-202X.2005.23856.x>
- Clarke, S. R., Barnden, M., Kurts, C., Carbone, F. R., Miller, J. F., & Heath, W. R. (2000). Characterization of the ovalbumin-specific TCR transgenic line OT-I: MHC elements for positive and negative selection. *Immunology and Cell Biology*, *78*(2), 110–117. <https://doi.org/10.1046/j.1440-1711.2000.00889.x>
- Conley, J. M., Gallagher, M. P., & Berg, L. J. (2016). T Cells and Gene Regulation: The Switching On and Turning Up of Genes after T Cell Receptor Stimulation in CD8 T Cells. *Frontiers in Immunology*, *7*. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2016.00076>
- Contreras, A., Beems, M. V., Tatar, A. J., Sen, S., Srinand, P., Suresh, M., Luther, T. K., & Cho, C. S. (2018). Co-transfer of tumor-specific effector and memory CD8<sup>+</sup> T cells enhances the efficacy of adoptive melanoma immunotherapy in a mouse model. *Journal for ImmunoTherapy of Cancer*, *6*(1), 41. <https://doi.org/10.1186/s40425-018-0358-2>

- Courtney, A. H., Lo, W.-L., & Weiss, A. (2018). TCR Signaling: Mechanisms of Initiation and Propagation. *Trends in Biochemical Sciences*, 43(2), 108–123. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2017.11.008>
- Cullen, S. P., & Martin, S. J. (2008). Mechanisms of granule-dependent killing. *Cell Death and Differentiation*, 15(2), 251–262. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4402244>
- Cunha, L. L., Perazzio, S. F., Azzi, J., Cravedi, P., & Riella, L. V. (2020). Remodeling of the Immune Response With Aging: Immunosenescence and Its Potential Impact on COVID-19 Immune Response. *Frontiers in Immunology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.01748>
- Dakup, P. P., Porter, K. I., Little, A. A., Zhang, H., & Gaddameedhi, S. (2020). Sex differences in the association between tumor growth and T cell response in a melanoma mouse model. *Cancer Immunology, Immunotherapy: CII*, 69(10), 2157–2162. <https://doi.org/10.1007/s00262-020-02643-3>
- Davey, G. M., Starr, R., Cornish, A. L., Burghardt, J. T., Alexander, W. S., Carbone, F. R., Surh, C. D., & Heath, W. R. (2005). SOCS-1 regulates IL-15-driven homeostatic proliferation of antigen-naïve CD8 T cells, limiting their autoimmune potential. *The Journal of Experimental Medicine*, 202(8), 1099–1108. <https://doi.org/10.1084/jem.20050003>
- Decman, V., Laidlaw, B. J., Doering, T. A., Leng, J., Ertl, H. C. J., Goldstein, D. R., & Wherry, E. J. (2012). Defective CD8 T Cell Responses in Aged Mice Are Due to Quantitative and Qualitative Changes in Virus-Specific Precursors. *The Journal of Immunology*, 188(4), 1933–1941. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1101098>
- Diaz Brinton, R. (2012). Minireview: Translational Animal Models of Human Menopause: Challenges and Emerging Opportunities. *Endocrinology*, 153(8), 3571–3578. <https://doi.org/10.1210/en.2012-1340>
- Diefenbach, A., Jamieson, A. M., Liu, S. D., Shastri, N., & Raulet, D. H. (2000). Ligands for the murine NKG2D receptor: expression by tumor cells and activation of NK cells and macrophages. *Nature Immunology*, 1(2), 119–126. <https://doi.org/10.1038/77793>
- Effros, R. B. (2004). Replicative senescence of CD8 T cells: effect on human ageing. *Experimental Gerontology*, 39(4), 517–524. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2003.09.024>
- Effros, R. B., & Walford, R. L. (1983). The immune response of aged mice to influenza: diminished T-cell proliferation, interleukin 2 production and cytotoxicity. *Cellular Immunology*, 81(2), 298–305. [https://doi.org/10.1016/0008-8749\(83\)90237-x](https://doi.org/10.1016/0008-8749(83)90237-x)
- Engwerda, C. R., Fox, B. S., & Handwerger, B. S. (1996). Cytokine production by T lymphocytes from young and aged mice. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 156(10), 3621–3630. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8621895>
- Fan, Z., & Zhang, Q. (2005). Molecular mechanisms of lymphocyte-mediated cytotoxicity. *Cellular & Molecular Immunology*, 2(4), 259–264. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16274623>

- Folgueras, A. R., Freitas-Rodríguez, S., Velasco, G., & López-Otín, C. (2018). Mouse Models to Disentangle the Hallmarks of Human Aging. *Circulation Research*, *123*(7), 905–924. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.118.312204>
- Franceschi, C., Bonafè, M., Valensin, S., Olivieri, F., De Luca, M., Ottaviani, E., & De Benedictis, G. (2000). Inflamm-aging. An evolutionary perspective on immunosenescence. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *908*, 244–254. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2000.tb06651.x>
- Franceschi, C., Monti, D., Sansoni, P., & Cossarizza, A. (1995). The immunology of exceptional individuals: the lesson of centenarians. *Immunology Today*, *16*(1), 12–16. [https://doi.org/10.1016/0167-5699\(95\)80064-6](https://doi.org/10.1016/0167-5699(95)80064-6)
- Fulop, T., Dupuis, G., Baehl, S., Le Page, A., Bourgade, K., Frost, E., Witkowski, J. M., Pawelec, G., Larbi, A., & Cunnane, S. (2016). From inflamm-aging to immune-paralysis: a slippery slope during aging for immune-adaptation. *Biogerontology*, *17*(1), 147–157. <https://doi.org/10.1007/s10522-015-9615-7>
- Fülöp, T., Dupuis, G., Witkowski, J. M., & Larbi, A. (2016). The Role of Immunosenescence in the Development of Age-Related Diseases. *Revista de Investigacion Clinica; Organo Del Hospital de Enfermedades de La Nutricion*, *68*(2), 84–91. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27103044>
- Fulop, T., Larbi, A., Kotb, R., & Pawelec, G. (2013). Immunology of aging and cancer development. *Interdisciplinary Topics in Gerontology*, *38*, 38–48. <https://doi.org/10.1159/000343599>
- Gameiro, C. (2010). Changes in the immune system during menopause and aging. *Frontiers in Bioscience*, *E2*(4), 190. <https://doi.org/10.2741/e190>
- Gameiro, C. M., Romão, F., & Castelo-Branco, C. (2010). Menopause and aging: Changes in the immune system—A review. *Maturitas*, *67*(4), 316–320. <https://doi.org/10.1016/j.maturitas.2010.08.003>
- Gao, Z., Jin, Y.-Q., & Wu, W. (2017). SOCS3 treatment prevents the development of alopecia areata by inhibiting CD8+ T cell-mediated autoimmune destruction. *Oncotarget*, *8*(20), 33432–33443. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.16504>
- Germain, R. N., & Margulies, D. H. (1993). The biochemistry and cell biology of antigen processing and presentation. *Annual Review of Immunology*, *11*, 403–450. <https://doi.org/10.1146/annurev.iy.11.040193.002155>
- Godby, R. C., Johnson, D. B., & Williams, G. R. (2019). Immunotherapy in Older Adults with Cancer. *Current Oncology Reports*, *21*(7), 56. <https://doi.org/10.1007/s11912-019-0806-2>
- Gold, J. A. W., Rossen, L. M., Ahmad, F. B., Sutton, P., Li, Z., Salvatore, P. P., Coyle, J. P., DeCuir, J., Baack, B. N., Durant, T. M., Dominguez, K. L., Henley, S. J., Annor, F. B., Fuld, J., Dee, D. L., Bhattarai, A., & Jackson, B. R. (2020). Race, Ethnicity, and Age Trends in Persons Who Died from COVID-19 — United States, May–August 2020. *MMWR. Morbidity and Mortality Weekly Report*, *69*(42), 1517–1521. <https://doi.org/10.15585/mmwr.mm6942e1>

- Gordy, C., & He, Y.-W. (2012). Endocytosis by target cells: an essential means for perforin- and granzyme-mediated killing. *Cellular & Molecular Immunology*, 9(1), 5–6. <https://doi.org/10.1038/cmi.2011.45>
- Goronzy, J. J., Hu, B., Kim, C., Jadhav, R. R., & Weyand, C. M. (2018). Epigenetics of T cell aging. *Journal of Leukocyte Biology*, 104(4), 691–699. <https://doi.org/10.1002/JLB.1RI0418-160R>
- Goronzy, J. J., Li, G., Yu, M., & Weyand, C. M. (2012). Signaling pathways in aged T cells – A reflection of T cell differentiation, cell senescence and host environment. *Seminars in Immunology*, 24(5), 365–372. <https://doi.org/10.1016/j.smim.2012.04.003>
- Goronzy, J. J., & Weyand, C. M. (2017). Successful and Maladaptive T Cell Aging. *Immunity*, 46(3), 364–378. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2017.03.010>
- Granier, C., Gey, A., Roncelin, S., Weiss, L., Paillaud, E., & Tartour, E. (2021). Immunotherapy in older patients with cancer. *Biomedical Journal*, 44(3), 260–271. <https://doi.org/10.1016/j.bj.2020.07.009>
- 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)
- Gustafson, C. E., Cavanagh, M. M., Jin, J., Weyand, C. M., & Goronzy, J. J. (2019). Functional pathways regulated by microRNA networks in CD8 T-cell aging. *Aging Cell*, 18(1), e12879. <https://doi.org/10.1111/acel.12879>
- Hackl, M., Brunner, S., Fortschegger, K., Schreiner, C., Micutkova, L., Mück, C., Laschober, G. T., Lepperdinger, G., Sampson, N., Berger, P., Herndler-Brandstetter, D., Wieser, M., Kühnel, H., Strasser, A., Rinnerthaler, M., Breitenbach, M., Mildner, M., Eckhart, L., Tschachler, E., ... Grillari, J. (2010). miR-17, miR-19b, miR-20a, and miR-106a are down-regulated in human aging. *Aging Cell*, 9(2), 291–296. <https://doi.org/10.1111/j.1474-9726.2010.00549.x>
- Hamilton, J. A. G., & Henry, C. J. (2020). Aging and immunotherapies: New horizons for the golden ages. *Aging and Cancer*, 1(1–4), 30–44. <https://doi.org/10.1002/aac2.12014>
- Han, A., Kim, J. Y., Kwak-Kim, J., & Lee, S. K. (2021). Menopause is an inflection point of age-related immune changes in women. *Journal of Reproductive Immunology*, 146, 103346. <https://doi.org/10.1016/j.jri.2021.103346>
- Hangai, S., Kawamura, T., Kimura, Y., Chang, C.-Y., Hibino, S., Yamamoto, D., Nakai, Y., Tateishi, R., Oshima, M., Oshima, H., Kodama, T., Moriya, K., Koike, K., Yanai, H., & Taniguchi, T. (2021). Orchestration of myeloid-derived suppressor cells in the tumor microenvironment by ubiquitous cellular protein TCTP released by tumor cells. *Nature Immunology*, 22(8), 947–957. <https://doi.org/10.1038/s41590-021-00967-5>
- Hao, Z., & Mak, T. W. (2010). Type I and Type II Pathways of Fas-mediated Apoptosis Are Differentially Controlled by XIAP. *Journal of Molecular Cell Biology*, 2(2), 63–64.

- <https://doi.org/10.1093/jmcb/mjp034>
- 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>
- Hinrichs, C. S., Borman, Z. A., Cassard, L., Gattinoni, L., Spolski, R., Yu, Z., Sanchez-Perez, L., Muranski, P., Kern, S. J., Logun, C., Palmer, D. C., Ji, Y., Reger, R. N., Leonard, W. J., Danner, R. L., Rosenberg, S. A., & Restifo, N. P. (2009). Adoptively transferred effector cells derived from naïve rather than central memory CD8 + T cells mediate superior antitumor immunity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *106*(41), 17469–17474. <https://doi.org/10.1073/pnas.0907448106>
- 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)
- Huber, M., Heink, S., Grothe, H., Guralnik, A., Reinhard, K., Elflein, K., Hünig, T., Mittrücker, H.-W., Brüstle, A., Kamradt, T., & Lohoff, M. (2009). A Th17-like developmental process leads to CD8(+) Tc17 cells with reduced cytotoxic activity. *European Journal of Immunology*, *39*(7), 1716–1725. <https://doi.org/10.1002/eji.200939412>
- Huppa, J. B., & Davis, M. M. (2003). T-cell-antigen recognition and the immunological synapse. *Nature Reviews Immunology*, *3*(12), 973–983. <https://doi.org/10.1038/nri1245>
- Hussain, T., & Quinn, K. M. (2019). Similar but different: virtual memory CD8 T cells as a memory-like cell population. *Immunology & Cell Biology*, *97*(7), 675–684. <https://doi.org/10.1111/imcb.12277>
- Hwang, J.-R., Byeon, Y., Kim, D., & Park, S.-G. (2020). Recent insights of T cell receptor-mediated signaling pathways for T cell activation and development. *Experimental & Molecular Medicine*, *52*(5), 750–761. <https://doi.org/10.1038/s12276-020-0435-8>
- Ivanova, M. E., Lukoyanova, N., Malhotra, S., Topf, M., Trapani, J. A., Voskoboinik, I., & Saibil, H. R. (2022). The pore conformation of lymphocyte perforin. *Science Advances*, *8*(6), eabk3147. <https://doi.org/10.1126/sciadv.abk3147>
- Janas, M. L., Groves, P., Kienzle, N., & Kelso, A. (2005). IL-2 Regulates Perforin and Granzyme Gene Expression in CD8 + T Cells Independently of Its Effects on Survival and Proliferation. *The Journal of Immunology*, *175*(12), 8003–8010. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.175.12.8003>
- Jenkins, M. R., Webby, R., Doherty, P. C., & Turner, S. J. (2006). Addition of a prominent epitope affects influenza A virus-specific CD8+ T cell immunodominance hierarchies when antigen is limiting. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, *177*(5), 2917–2925. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.177.5.2917>
- Jergović, M., Thompson, H. L., Renkema, K. R., Smithey, M. J., & Nikolich-Zugich, J. (2019). Defective

- Transcriptional Programming of Effector CD8 T Cells in Aged Mice Is Cell-Extrinsic and Can Be Corrected by Administration of IL-12 and IL-18. *Frontiers in Immunology*, 10. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.02206>
- Jiang, T., Zhou, C., & Ren, S. (2016). Role of IL-2 in cancer immunotherapy. *OncImmunity*, 5(6), e1163462. <https://doi.org/10.1080/2162402X.2016.1163462>
- Jiao, D., Cai, Z., Choksi, S., Ma, D., Choe, M., Kwon, H.-J., Baik, J. Y., Rowan, B. G., Liu, C., & Liu, Z.-G. (2018). Necroptosis of tumor cells leads to tumor necrosis and promotes tumor metastasis. *Cell Research*, 28(8), 868–870. <https://doi.org/10.1038/s41422-018-0058-y>
- Kanesvaran, R., Cordoba, R., & Maggiore, R. (2018). Immunotherapy in Older Adults With Advanced Cancers: Implications for Clinical Decision-Making and Future Research. *American Society of Clinical Oncology Educational Book*, 38, 400–414. [https://doi.org/10.1200/EDBK\\_201435](https://doi.org/10.1200/EDBK_201435)
- Kaye, J., Vasquez, N. J., & Hedrick, S. M. (1992). Involvement of the same region of the T cell antigen receptor in thymic selection and foreign peptide recognition. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 148(11), 3342–3353. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1316916>
- Kim, H. O., Kim, H.-S., Youn, J.-C., Shin, E.-C., & Park, S. (2011). Serum cytokine profiles in healthy young and elderly population assessed using multiplexed bead-based immunoassays. *Journal of Translational Medicine*, 9(1), 113. <https://doi.org/10.1186/1479-5876-9-113>
- Klebanoff, C. A., Scott, C. D., Leonardi, A. J., Yamamoto, T. N., Cruz, A. C., Ouyang, C., Ramaswamy, M., Roychoudhuri, R., Ji, Y., Eil, R. L., Sukumar, M., Crompton, J. G., Palmer, D. C., Borman, Z. A., Clever, D., Thomas, S. K., Patel, S., Yu, Z., Muranski, P., ... Restifo, N. P. (2015). Memory T cell-driven differentiation of naive cells impairs adoptive immunotherapy. *Journal of Clinical Investigation*, 126(1), 318–334. <https://doi.org/10.1172/JCI81217>
- 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>
- Knörck, A., Schäfer, G., Alansary, D., Richter, J., Thurner, L., Hoth, M., & Schwarz, E. C. (2022). Cytotoxic Efficiency of Human CD8+ T Cell Memory Subtypes. *Frontiers in Immunology*, 13, 838484. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.838484>
- Köks, S., Dogan, S., Tuna, B. G., González-Navarro, H., Potter, P., & Vandenbroucke, R. E. (2016). Mouse models of ageing and their relevance to disease. *Mechanisms of Ageing and Development*, 160, 41–53. <https://doi.org/10.1016/j.mad.2016.10.001>
- Krammer, P. H. (2000). CD95's deadly mission in the immune system. *Nature*, 407(6805), 789–795. <https://doi.org/10.1038/35037728>
- 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>

- Kurschus, F. C., Fellows, E., Stegmann, E., & Jenne, D. E. (2008). Granzyme B delivery via perforin is restricted by size, but not by heparan sulfate-dependent endocytosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *105*(37), 13799–13804. <https://doi.org/10.1073/pnas.0801724105>
- Lacorazza, H. D., & Nikolich-Žugich, J. (2004). Exclusion and Inclusion of TCR $\alpha$  Proteins during T Cell Development in TCR-Transgenic and Normal Mice. *The Journal of Immunology*, *173*(9), 5591–5600. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.173.9.5591>
- Lanzer, K. G., Cookenham, T., Reiley, W. W., & Blackman, M. A. (2018). Virtual memory cells make a major contribution to the response of aged influenza-naïve mice to influenza virus infection. *Immunity & Ageing: I & A*, *15*, 17. <https://doi.org/10.1186/s12979-018-0122-y>
- Larbi, A., Franceschi, C., Mazzatti, D., Solana, R., Wikby, A., & Pawelec, G. (2008). Aging of the Immune System as a Prognostic Factor for Human Longevity. *Physiology*, *23*(2), 64–74. <https://doi.org/10.1152/physiol.00040.2007>
- Lee, J.-Y., Hamilton, S. E., Akue, A. D., Hogquist, K. A., & Jameson, S. C. (2013). Virtual memory CD8 T cells display unique functional properties. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *110*(33), 13498–13503. <https://doi.org/10.1073/pnas.1307572110>
- Leung, C., Hodel, A. W., Brennan, A. J., Lukoyanova, N., Tran, S., House, C. M., Kondos, S. C., Whisstock, J. C., Dunstone, M. A., Trapani, J. A., Voskoboinik, I., Saibil, H. R., & Hoogenboom, B. W. (2017). Real-time visualization of perforin nanopore assembly. *Nature Nanotechnology*, *12*(5), 467–473. <https://doi.org/10.1038/nnano.2016.303>
- Lewis, D. I. (2019). Animal experimentation: implementation and application of the 3Rs. *Emerging Topics in Life Sciences*, *3*(6), 675–679. <https://doi.org/10.1042/ETLS20190061>
- Li, G., Smithey, M. J., Rudd, B. D., & Nikolich-Žugich, J. (2012). Age-associated alterations in CD8 $\alpha^+$  dendritic cells impair CD8 T-cell expansion in response to an intracellular bacterium. *Aging Cell*, *11*(6), 968–977. <https://doi.org/10.1111/j.1474-9726.2012.00867.x>
- Li, J., Figueira, S. K., Vrazo, A. C. A., Binkowski, B. F., Butler, B. L., Tabata, Y., Filipovich, A., Jordan, M. B., & Risma, K. A. (2014). Real-Time Detection of CTL Function Reveals Distinct Patterns of Caspase Activation Mediated by Fas versus Granzyme B. *The Journal of Immunology*, *193*(2), 519–528. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1301668>
- Liao, W., Lin, J.-X., & Leonard, W. J. (2013). Interleukin-2 at the Crossroads of Effector Responses, Tolerance, and Immunotherapy. *Immunity*, *38*(1), 13–25. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2013.01.004>
- Liu, Q., Sun, Z., & Chen, L. (2020). Memory T cells: strategies for optimizing tumor immunotherapy. *Protein & Cell*, *11*(8), 549–564. <https://doi.org/10.1007/s13238-020-00707-9>
- Liu, X., & Lieberman, J. (2020). Knocking 'em Dead: Pore-Forming Proteins in Immune Defense. *Annual*

- Review of Immunology*, 38, 455–485. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-111319-023800>
- Liu, Z., & Jiao, D. (2020). Necroptosis, tumor necrosis and tumorigenesis. *Cell Stress*, 4(1), 1–8. <https://doi.org/10.15698/cst2020.01.208>
- Lopez, J. A., Susanto, O., Jenkins, M. R., Lukoyanova, N., Sutton, V. R., Law, R. H. P., Johnston, A., Bird, C. H., Bird, P. I., Whisstock, J. C., Trapani, J. A., Saibil, H. R., & Voskoboinik, I. (2013). Perforin forms transient pores on the target cell plasma membrane to facilitate rapid access of granzymes during killer cell attack. *Blood*, 121(14), 2659–2668. <https://doi.org/10.1182/blood-2012-07-446146>
- Lu, Y., Hong, B., Li, H., Zheng, Y., Zhang, M., Wang, S., Qian, J., & Yi, Q. (2014). Tumor-specific IL-9–producing CD8 + Tc9 cells are superior effector than type-I cytotoxic Tc1 cells for adoptive immunotherapy of cancers. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(6), 2265–2270. <https://doi.org/10.1073/pnas.1317431111>
- Lückel, C., Picard, F. S. R., & Huber, M. (2020). Tc17 biology and function: Novel concepts. *European Journal of Immunology*, 50(9), 1257–1267. <https://doi.org/10.1002/eji.202048627>
- Maderna, P., & Godson, C. (2003). Phagocytosis of apoptotic cells and the resolution of inflammation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, 1639(3), 141–151. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2003.09.004>
- Márquez, E. J., Chung, C., Marches, R., Rossi, R. J., Nehar-Belaid, D., Eroglu, A., Mellert, D. J., Kuchel, G. A., Banchereau, J., & Ucar, D. (2020). Sexual-dimorphism in human immune system aging. *Nature Communications*, 11(1), 751. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-14396-9>
- Maue, A. C., Yager, E. J., Swain, S. L., Woodland, D. L., Blackman, M. A., & Haynes, L. (2009). T-cell immunosenescence: lessons learned from mouse models of aging. *Trends in Immunology*, 30(7), 301–305. <https://doi.org/10.1016/j.it.2009.04.007>
- Menees, K. B., Earls, R. H., Chung, J., Jernigan, J., Filipov, N. M., Carpenter, J. M., & Lee, J.-K. (2021). Sex- and age-dependent alterations of splenic immune cell profile and NK cell phenotypes and function in C57BL/6J mice. *Immunity & Ageing*, 18(1), 3. <https://doi.org/10.1186/s12979-021-00214-3>
- Mescher, M. F., Curtsinger, J. M., Agarwal, P., Casey, K. A., Gerner, M., Hammerbeck, C. D., Popescu, F., & Xiao, Z. (2006). Signals required for programming effector and memory development by CD8 + T cells. *Immunological Reviews*, 211(1), 81–92. <https://doi.org/10.1111/j.0105-2896.2006.00382.x>
- Messaoudi, I., LeMaout, 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>
- Michel, J. J., Griffin, P., & Vallejo, A. N. (2016). Functionally Diverse NK-Like T Cells Are Effectors

- and Predictors of Successful Aging. *Frontiers in Immunology*, 7. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2016.00530>
- Mittrücker, H.-W., Visekruna, A., & Huber, M. (2014). Heterogeneity in the differentiation and function of CD8<sup>+</sup> T cells. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*, 62(6), 449–458. <https://doi.org/10.1007/s00005-014-0293-y>
- Miyagawa, F., Gutermuth, J., Zhang, H., & Katz, S. I. (2010). The use of mouse models to better understand mechanisms of autoimmunity and tolerance. *Journal of Autoimmunity*, 35(3), 192–198. <https://doi.org/10.1016/j.jaut.2010.06.007>
- Mo, F., Yu, Z., Li, P., Oh, J., Spolski, R., Zhao, L., Glassman, C. R., Yamamoto, T. N., Chen, Y., Golebiowski, F. M., Hermans, D., Majri-Morrison, S., Picton, L. K., Liao, W., Ren, M., Zhuang, X., Mitra, S., Lin, J.-X., Gattinoni, L., ... Leonard, W. J. (2021). An engineered IL-2 partial agonist promotes CD8<sup>+</sup> T cell stemness. *Nature*, 597(7877), 544–548. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03861-0>
- 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)
- Mosmann, T. R., Li, L., & Sad, S. (1997). Functions of CD8 T-cell subsets secreting different cytokine patterns. *Seminars in Immunology*, 9(2), 87–92. <https://doi.org/10.1006/smim.1997.0065>
- Mu, X. Y., & Thoman, M. L. (1999). The Age-Dependent Cytokine Production by Murine CD8<sup>+</sup> T Cells as Determined by Four-Color Flow Cytometry Analysis. *The Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences*, 54(3), B116–B123. <https://doi.org/10.1093/gerona/54.3.B116>
- Netea, M. G., Schlitzer, A., Placek, K., Joosten, L. A. B., & Schultze, J. L. (2019). Innate and Adaptive Immune Memory: an Evolutionary Continuum in the Host's Response to Pathogens. *Cell Host and Microbe*, 25(1), 13–26. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2018.12.006>
- Nikolich-Zugich, J. (2008). Ageing and life-long maintenance of T-cell subsets in the face of latent persistent infections. *Nature Reviews. Immunology*, 8(7), 512–522. <https://doi.org/10.1038/nri2318>
- Nikolich-Žugich, J. (2014). Aging of the T cell compartment in mice and humans: from no naive expectations to foggy memories. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 193(6), 2622–2629. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1401174>
- Nikolich-Žugich, J. (2018). The twilight of immunity: emerging concepts in aging of the immune system. *Nature Immunology*, 19(1), 10–19. <https://doi.org/10.1038/s41590-017-0006-x>
- 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>

- Obar, J. J., & Lefrançois, L. (2010). Memory CD8<sup>+</sup> T cell differentiation. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1183, 251–266. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2009.05126.x>
- Oliveira, S. R., Amaral, J. D., & Rodrigues, C. M. P. (2018). Mechanism and disease implications of necroptosis and neuronal inflammation. *Cell Death & Disease*, 9(9), 903. <https://doi.org/10.1038/s41419-018-0872-7>
- Ongrádi, J., & Kövesdi, V. (2010). Factors that may impact on immunosenescence: an appraisal. *Immunity & Ageing: I & A*, 7, 7. <https://doi.org/10.1186/1742-4933-7-7>
- Overwijk, W. W., Tagliaferri, M. A., & Zalevsky, J. (2021). Engineering IL-2 to Give New Life to T Cell Immunotherapy. *Annual Review of Medicine*, 72(1), 281–311. <https://doi.org/10.1146/annurev-med-073118-011031>
- Palmer, D. C., Guittard, G. C., Franco, Z., Crompton, J. G., Eil, R. L., Patel, S. J., Ji, Y., Van Panhuys, N., Klebanoff, C. A., Sukumar, M., Clever, D., Chichura, A., Roychoudhuri, R., Varma, R., Wang, E., Gattinoni, L., Marincola, F. M., Balagopalan, L., Samelson, L. E., & Restifo, N. P. (2015). Cish actively silences TCR signaling in CD8<sup>+</sup> T cells to maintain tumor tolerance. *The Journal of Experimental Medicine*, 212(12), 2095–2113. <https://doi.org/10.1084/jem.20150304>
- Pennock, N. D., White, J. T., Cross, E. W., Cheney, E. E., Tamburini, B. A., & Kedl, R. M. (2013). T cell responses: naive to memory and everything in between. *Advances in Physiology Education*, 37(4), 273–283. <https://doi.org/10.1152/advan.00066.2013>
- Pereira, B. I., & Akbar, A. N. (2016). Convergence of Innate and Adaptive Immunity during Human Aging. *Frontiers in Immunology*, 7. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2016.00445>
- Pereira, B. I., De Maeyer, R. P. H., Covre, L. P., Nehar-Belaid, D., Lanna, A., Ward, S., Marches, R., Chambers, E. S., Gomes, D. C. O., Riddell, N. E., Maini, M. K., Teixeira, V. H., Janes, S. M., Gilroy, D. W., Larbi, A., Mabbott, N. A., Ucar, D., Kuchel, G. A., Henson, S. M., ... Akbar, A. N. (2020). Sestrins induce natural killer function in senescent-like CD8<sup>+</sup> T cells. *Nature Immunology*, 21(6), 684–694. <https://doi.org/10.1038/s41590-020-0643-3>
- Peter, M. E., Hadji, A., Murmann, A. E., Brockway, S., Putzbach, W., Pattanayak, A., & Ceppi, P. (2015). The role of CD95 and CD95 ligand in cancer. *Cell Death & Differentiation*, 22(4), 549–559. <https://doi.org/10.1038/cdd.2015.3>
- Pettan-Brewer, C., & M. Treuting, P. (2011). Practical pathology of aging mice. *Pathobiology of Aging & Age-Related Diseases*, 1(1), 7202. <https://doi.org/10.3402/pba.v1i0.7202>
- Pieren, D. K. J., Smits, N. A. M., van de Garde, M. D. B., & Guichelaar, T. (2019). Response kinetics reveal novel features of ageing in murine T cells. *Scientific Reports*, 9(1), 5587. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-42120-1>
- Pilleron, S., Sarfati, D., Janssen-Heijnen, M., Vignat, J., Ferlay, J., Bray, F., & Soerjomataram, I. (2019). Global cancer incidence in older adults, 2012 and 2035: A population-based study. *International*

- Journal of Cancer*, 144(1), 49–58. <https://doi.org/10.1002/ijc.31664>
- Pinti, M., Appay, V., Campisi, J., Frasca, D., Fülöp, T., Sauce, D., Larbi, A., Weinberger, B., & Cossarizza, A. (2016). Aging of the immune system: Focus on inflammation and vaccination. *European Journal of Immunology*, 46(10), 2286–2301. <https://doi.org/10.1002/eji.201546178>
- Plowden, J., Renshaw-Hoelscher, M., Engleman, C., Katz, J., & Sambhara, S. (2004). Innate immunity in aging: impact on macrophage function. *Aging Cell*, 3(4), 161–167. <https://doi.org/10.1111/j.1474-9728.2004.00102.x>
- Prajapati, K., Perez, C., Rojas, L. B. P., Burke, B., & Guevara-Patino, J. A. (2018). Functions of NKG2D in CD8+ T cells: an opportunity for immunotherapy. *Cellular & Molecular Immunology*, 15(5), 470–479. <https://doi.org/10.1038/cmi.2017.161>
- Pritchard, G. H., Cross, E. W., Strobel, M., Jameson, S. C., Kedl, R. M., Hogquist, K. A., & Hunter, C. A. (2016). Spontaneous partial loss of the OT-I transgene. *Nature Immunology*, 17(5), 471–471. <https://doi.org/10.1038/ni.3411>
- Quinn, K. M., Fox, A., Harland, K. L., Russ, B. E., Li, J., Nguyen, T. H. O., Loh, L., Olshanksy, M., Naeem, H., Tsyganov, K., Wiede, F., Webster, R., Blyth, C., Sng, X. Y. X., Tiganis, T., Powell, D., Doherty, P. C., Turner, S. J., Kedzierska, K., & 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>
- Raulet, D. H. (2003). Roles of the NKG2D immunoreceptor and its ligands. *Nature Reviews Immunology*, 3(10), 781–790. <https://doi.org/10.1038/nri1199>
- Riera Romo, M., Pérez-Martínez, D., & Castillo Ferrer, C. (2016). Innate immunity in vertebrates: An overview. *Immunology*, 148(2), 125–139. <https://doi.org/10.1111/imm.12597>
- Rodriguez-Garcia, M., Shen, Z., Fortier, J. M., & Wira, C. R. (2020). Differential Cytotoxic Function of Resident and Non-resident CD8+ T Cells in the Human Female Reproductive Tract Before and After Menopause. *Frontiers in Immunology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.01096>
- Rosato, P. C., Wijeyesinghe, S., Stolley, J. M., Nelson, C. E., Davis, R. L., Manlove, L. S., Pennell, C. A., Blazar, B. R., Chen, C. C., Geller, M. A., Vezys, V., & Masopust, D. (2019). Virus-specific memory T cells populate tumors and can be repurposed for tumor immunotherapy. *Nature Communications*, 10(1), 567. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-08534-1>
- Ross, S. H., & Cantrell, D. A. (2018). Signaling and Function of Interleukin-2 in T Lymphocytes. *Annual Review of Immunology*, 36(1), 411–433. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-042617-053352>
- 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>
- Rubio, V., Stuge, T. B., Singh, N., Betts, M. R., Weber, J. S., Roederer, M., & Lee, P. P. (2003). Ex vivo identification, isolation and analysis of tumor-cytolytic T cells. *Nature Medicine*, *9*(11), 1377–1382. <https://doi.org/10.1038/nm942>
- Russell, J. H., & Ley, T. J. (2002). Lymphocyte-mediated cytotoxicity. *Annual Review of Immunology*, *20*, 323–370. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.20.100201.131730>
- Sad, S., Marcotte, R., & Mosmann, T. R. (1995). Cytokine-induced differentiation of precursor mouse CD8+ T cells into cytotoxic CD8+ T cells secreting Th1 or Th2 cytokines. *Immunity*, *2*(3), 271–279. [https://doi.org/10.1016/1074-7613\(95\)90051-9](https://doi.org/10.1016/1074-7613(95)90051-9)
- 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>
- Sant'Angelo, D. B., Cresswell, P., Janeway, C. A., & Denzin, L. K. (2001). Maintenance of TCR clonality in T cells expressing genes for two TCR heterodimers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *98*(12), 6824–6829. <https://doi.org/10.1073/pnas.121179998>
- 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>
- Saxena, R. K., Saxena, Q. B., & Adler, W. H. (1988). Lectin-induced cytotoxic activity in spleen cells from young and old mice. Age-related changes in types of effector cells, lymphokine production and response. *Immunology*, *64*(3), 457–461. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3137156>
- Schmitt, C., Ktorza, S., Sarun, S., Verpilleux, M. P., Blanc, C., Deugnier, M. A., Dalloul, A., & Debré, P. (1995). CD34-positive early stages of human T-cell differentiation. *Leukemia & Lymphoma*, *17*(1–2), 43–50. <https://doi.org/10.3109/10428199509051702>
- Shcherbo, D., Souslova, E. A., Goedhart, J., Chepurnykh, T. V., Gaintzeva, A., Shemiakina, I. I., Gadella, T. W. J., Lukyanov, S., & Chudakov, D. M. (2009). Practical and reliable FRET/FLIM pair of fluorescent proteins. *BMC Biotechnology*, *9*, 24. <https://doi.org/10.1186/1472-6750-9-24>
- Shen, Z., Patel, M. V., Rodriguez-Garcia, M., & Wira, C. R. (2022). Aging beyond menopause selectively decreases CD8+ T cell numbers but enhances cytotoxic activity in the human endometrium. *Immunity & Ageing*, *19*(1), 55. <https://doi.org/10.1186/s12979-022-00312-w>
- Shin, H. M., Kapoor, V. N., Guan, T., Kaech, S. M., Welsh, R. M., & Berg, L. J. (2013). Epigenetic Modifications Induced by Blimp-1 Regulate CD8+ T Cell Memory Progression during Acute Virus Infection. *Immunity*, *39*(4), 661–675. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2013.08.032>
- Shinkai, Y., Takio, K., & Okumura, K. (1988). Homology of perforin to the ninth component of

- complement (C9). *Nature*, 334(6182), 525–527. <https://doi.org/10.1038/334525a0>
- Shouse, G., Danilov, A. V., & Artz, A. (2022). CAR T-Cell Therapy in the Older Person: Indications and Risks. *Current Oncology Reports*, 24(9), 1189–1199. <https://doi.org/10.1007/s11912-022-01272-6>
- Shresta, S., Pham, C. T., Thomas, D. A., Graubert, T. A., & Ley, T. J. (1998). How do cytotoxic lymphocytes kill their targets? *Current Opinion in Immunology*, 10(5), 581–587. [https://doi.org/10.1016/s0952-7915\(98\)80227-6](https://doi.org/10.1016/s0952-7915(98)80227-6)
- Smith, N. C., Rise, M. L., & Christian, S. L. (2019). A Comparison of the Innate and Adaptive Immune Systems in Cartilaginous Fish, Ray-Finned Fish, and Lobe-Finned Fish. *Frontiers in Immunology*, 10(October). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.02292>
- Smithey, M. J., Renkema, K. R., Rudd, B. D., & Nikolich-Zugich, J. (2011). Increased apoptosis, curtailed expansion and incomplete differentiation of CD8<sup>+</sup> 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>
- Smyth, M. J., & Trapani, J. A. (1998). The relative role of lymphocyte granule exocytosis versus death receptor-mediated cytotoxicity in viral pathophysiology. *Journal of Virology*, 72(1), 1–9. <https://doi.org/10.1128/JVI.72.1.1-9.1998>
- Sommermeier, D., Hudecek, M., Kosasih, P. L., Gogishvili, T., Maloney, D. G., Turtle, C. J., & Riddell, S. R. (2016). Chimeric antigen receptor-modified T cells derived from defined CD8<sup>+</sup> and CD4<sup>+</sup> subsets confer superior antitumor reactivity in vivo. *Leukemia*, 30(2), 492–500. <https://doi.org/10.1038/leu.2015.247>
- 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>
- Stinchcombe, J. C., & Griffiths, G. M. (2007). Secretory mechanisms in cell-mediated cytotoxicity. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 23, 495–517. <https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.23.090506.123521>
- Strasser, A., Jost, P. J., & Nagata, S. (2009). The Many Roles of FAS Receptor Signaling in the Immune System. *Immunity*, 30(2), 180–192. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2009.01.001>
- Tahvildari, M., & Dana, R. (2019). Low-Dose IL-2 Therapy in Transplantation, Autoimmunity, and Inflammatory Diseases. *The Journal of Immunology*, 203(11), 2749–2755. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1900733>
- Takada, K., & Jameson, S. C. (2009). Naive T cell homeostasis: from awareness of space to a sense of place. *Nature Reviews Immunology*, 9(12), 823–832. <https://doi.org/10.1038/nri2657>
- Tau, G. Z., Cowan, S. N., Weisburg, J., Braunstein, N. S., & Rothman, P. B. (2001). Regulation of IFN-gamma signaling is essential for the cytotoxic activity of CD8(+) T cells. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 167(10), 5574–5582. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.167.10.5574>

- Tschopp, J., Masson, D., & Stanley, K. K. (1986). Structural/functional similarity between proteins involved in complement- and cytotoxic T-lymphocyte-mediated cytotoxicity. *Nature*, *322*(6082), 831–834. <https://doi.org/10.1038/322831a0>
- Uematsu, Y., Ryser, S., Dembić, Z., Borgulya, P., Krimpenfort, P., Berns, A., von Boehmer, H., & Steinmetz, M. (1988). In transgenic mice the introduced functional T cell receptor beta gene prevents expression of endogenous beta genes. *Cell*, *52*(6), 831–841. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(88\)90425-4](https://doi.org/10.1016/0092-8674(88)90425-4)
- Vallejo, A. N., Mueller, R. G., Hamel, D. L., Way, A., Dvergsten, J. A., Griffin, P., & Newman, A. B. (2011). 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*, *10*(3), 354–361. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2010.09.006>
- Van Epps, P., Banks, R., Aung, H., Betts, M. R., & Canaday, D. H. (2014). Age-related differences in polyfunctional T cell responses. *Immunity & Ageing: I & A*, *11*, 14. <https://doi.org/10.1186/1742-4933-11-14>
- Van Kempen, T. A., Milner, T. A., & Waters, E. M. (2011). Accelerated Ovarian Failure: A novel, chemically induced animal model of menopause. *Brain Research*, *1379*, 176–187. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2010.12.064>
- Vanherberghen, B., Olofsson, P. E., Forslund, E., Sternberg-Simon, M., Khorshidi, M. A., Pacouret, S., Guldevall, K., Enqvist, M., Malmberg, K.-J., Mehr, R., & Önfelt, B. (2013). Classification of human natural killer cells based on migration behavior and cytotoxic response. *Blood*, *121*(8), 1326–1334. <https://doi.org/10.1182/blood-2012-06-439851>
- Verneris, M. R., Karami, M., Baker, J., Jayaswal, A., & Negrin, R. S. (2004). Role of NKG2D signaling in the cytotoxicity of activated and expanded CD8+ T cells. *Blood*, *103*(8), 3065–3072. <https://doi.org/10.1182/blood-2003-06-2125>
- Visekruna, A., Ritter, J., Scholz, T., Campos, L., Guralnik, A., Poncette, L., Raifer, H., Hagner, S., Garn, H., Staudt, V., Bopp, T., Reuter, S., Taube, C., Loser, K., & Huber, M. (2013). Tc9 cells, a new subset of CD8 + T cells, support Th2-mediated airway inflammation. *European Journal of Immunology*, *43*(3), 606–618. <https://doi.org/10.1002/eji.201242825>
- Volpe, E., Sambucci, M., Battistini, L., & Borsellino, G. (2016). Fas–Fas Ligand: Checkpoint of T Cell Functions in Multiple Sclerosis. *Frontiers in Immunology*, *7*. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2016.00382>
- Wajant, H. (2002). The Fas Signaling Pathway: More Than a Paradigm. *Science*, *296*(5573), 1635–1636. <https://doi.org/10.1126/science.1071553>
- Wallach, D., Kang, T.-B., & Kovalenko, A. (2014). Concepts of tissue injury and cell death in inflammation: a historical perspective. *Nature Reviews. Immunology*, *14*(1), 51–59.

- <https://doi.org/10.1038/nri3561>
- Wan, Y. Y., & Flavell, R. A. (2009). How diverse--CD4 effector T cells and their functions. *Journal of Molecular Cell Biology*, *1*(1), 20–36. <https://doi.org/10.1093/jmcb/mjp001>
- Weiskopf, D., Weinberger, B., & Grubeck-Loebenstien, B. (2009). The aging of the immune system. *Transplant International: Official Journal of the European Society for Organ Transplantation*, *22*(11), 1041–1050. <https://doi.org/10.1111/j.1432-2277.2009.00927.x>
- Wensveen, F. M., Jelenčić, V., & Polić, B. (2018). NKG2D: A Master Regulator of Immune Cell Responsiveness. *Frontiers in Immunology*, *9*. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00441>
- Westmeier, J., Paniskaki, K., Karaköse, Z., Werner, T., Sutter, K., Dolff, S., Overbeck, M., Limmer, A., Liu, J., Zheng, X., Brenner, T., Berger, M. M., Witzke, O., Trilling, M., Lu, M., Yang, D., Babel, N., Westhoff, T., Dittmer, U., & Zelinskyy, G. (2020). Impaired Cytotoxic CD8+ T Cell Response in Elderly COVID-19 Patients. *MBio*, *11*(5). <https://doi.org/10.1128/mBio.02243-20>
- White, J. T., Cross, E. W., Burchill, M. A., Danhorn, T., McCarter, M. D., Rosen, H. R., O'Connor, B., & Kedl, R. M. (2016). Virtual memory T cells develop and mediate bystander protective immunity in an IL-15-dependent manner. *Nature Communications*, *7*(1), 11291. <https://doi.org/10.1038/ncomms11291>
- Williams, M. A., & Bevan, M. J. (2007). Effector and Memory CTL Differentiation. *Annual Review of Immunology*, *25*(1), 171–192. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.25.022106.141548>
- Williams, M., Todd, I., & Fairclough, L. C. (2021). The role of CD8 + T lymphocytes in chronic obstructive pulmonary disease: a systematic review. *Inflammation Research*, *70*(1), 11–18. <https://doi.org/10.1007/s00011-020-01408-z>
- 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, J., Xie, A., & Chen, W. (2014). Cytokine regulation of immune tolerance. *Burns & Trauma*, *2*(1), 11–17. <https://doi.org/10.4103/2321-3868.124771>
- Yoshimura, A., Ito, M., Chikuma, S., Akanuma, T., & Nakatsukasa, H. (2018). Negative Regulation of Cytokine Signaling in Immunity. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, *10*(7). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a028571>
- Yu, Y., Cho, H.-I., Wang, D., Kaosaard, K., Anasetti, C., Celis, E., & Yu, X.-Z. (2013). Adoptive Transfer of Tc1 or Tc17 Cells Elicits Antitumor Immunity against Established Melanoma through Distinct Mechanisms. *The Journal of Immunology*, *190*(4), 1873–1881. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1201989>
- Zelinskyy, G., Balkow, S., Schimmer, S., Schepers, K., Simon, M. M., & Dittmer, U. (2004). Independent

- roles of perforin, granzymes, and Fas in the control of Friend retrovirus infection. *Virology*, 330(2), 365–374. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2004.08.040>
- Zhang, J., Scordi, I., Smyth, M. J., & Lichtenheld, M. G. (1999). Interleukin 2 receptor signaling regulates the perforin gene through signal transducer and activator of transcription (Stat)5 activation of two enhancers. *The Journal of Experimental Medicine*, 190(9), 1297–1308. <https://doi.org/10.1084/jem.190.9.1297>
- Zhao, R., Zhou, X., Khan, E. S., Alansary, D., Friedmann, K. S., Yang, W., Schwarz, E. C., Del Campo, A., Hoth, M., & Qu, B. (2021). Targeting the Microtubule-Network Rescues CTL Killing Efficiency in Dense 3D Matrices. *Frontiers in Immunology*, 12, 729820. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.729820>
- Zhao, Y., Deng, J., Rao, S., Guo, S., Shen, J., Du, F., Wu, X., Chen, Y., Li, M., Chen, M., Li, X., Li, W., Gu, L., Sun, Y., Zhang, Z., Wen, Q., Xiao, Z., & Li, J. (2022). Tumor Infiltrating Lymphocyte (TIL) Therapy for Solid Tumor Treatment: Progressions and Challenges. *Cancers*, 14(17). <https://doi.org/10.3390/cancers14174160>
- Zhu, J., Yang, W., Zhou, X., Zöphel, D., Soriano-Bagueta, L., Dolgener, D., Carlein, C., Hof, C., Zhao, R., Ye, S., Schwarz, E. C., Brenner, D., Prates Roma, L., & Qu, B. (2021). High Glucose Enhances Cytotoxic T Lymphocyte-Mediated Cytotoxicity. *Frontiers in Immunology*, 12. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.689337>
- Zingoni, A., Sornasse, T., Cocks, B. G., Tanaka, Y., Santoni, A., & Lanier, L. L. (2005). NK cell regulation of T cell-mediated responses. *Molecular Immunology*, 42(4), 451–454. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2004.07.025>
- Zöphel, D., Angenendt, A., Kaschek, L., Ravichandran, K., Hof, C., Janku, S., Hoth, M., & Lis, A. (2022). Faster cytotoxicity with age: Increased perforin and granzyme levels in cytotoxic CD8<sup>+</sup> T cells boost cancer cell elimination. *Aging Cell*, e13668. <https://doi.org/10.1111/accel.13668>
- Zöphel, D., Kaschek, L., Steiner, R., Janku, S., Chang, H., & Lis, A. (2023). Heterozygous OT-I mice reveal that antigen-specific CD8<sup>+</sup> T cells shift from apoptotic to necrotic killers in the elderly. *Aging Cell*. <https://doi.org/10.1111/accel.13824>

## 6 Anhang

### 6.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1. Zytotoxizitätsmechanismen von CD8 <sup>+</sup> T-Zellen.....	10
Abbildung 2. Altersbedingte Veränderungen in der CD8 <sup>+</sup> T-Zell-Immunität.....	13
Abbildung 3. Schnellere Zielzellyse durch CD8 <sup>+</sup> T-Zellen aus alten Mäusen.....	32
Abbildung 4. Unterschiede in der Lyse-Kinetik sind unabhängig von der Effektor:Zielzell-Ratio.....	33
Abbildung 5. Fluoreszenzmikroskopische Einzelzell-Analysen bestätigen die schnelle Zielzellyse durch CD8 <sup>+</sup> T-Zellen aus alten Mäusen.....	34
Abbildung 6. Verminderte Proliferationsfähigkeit und Viabilität von CD8 <sup>+</sup> T-Zellen im Alter.....	36
Abbildung 7. Einfluss der Stimulationsdauer auf die Lyse-Kinetik von CD8 <sup>+</sup> T-Zellen aus jungen und alten Mäusen.....	37
Abbildung 8. Einfluss der Stimulationsdauer auf die Subtypenverteilung von CD8 <sup>+</sup> T-Zellen aus jungen und alten Mäusen.....	38
Abbildung 9. Vermehrter Anteil an Antigen-unerfahrenen „T <sub>VM</sub> “-Gedächtnis-T-Zellen in CD8 <sup>+</sup> T-Zellen aus alten Mäusen .....	40
Abbildung 10. Schnelle Lyse-Kinetik in den T <sub>CM</sub> - und T <sub>EM</sub> -Gedächtnispopulationen von CD8 <sup>+</sup> T-Zellen aus alten Mäusen .....	41
Abbildung 11. Naive CD8 <sup>+</sup> T-Zellen aus jungen und alten Mäusen zeigen nach Stimulation keine zytotoxische Aktivität.....	42
Abbildung 12. Die Lyse-Kinetik von CD8 <sup>+</sup> T-Zellen junger Mäuse wird nicht durch den Anteil naiver Zellen bestimmt.....	43
Abbildung 13. CD8 <sup>+</sup> Zellen aus jungen und alten Mäusen zeigen eine vergleichbare Degranulation der lytischen Granula.....	45
Abbildung 14. Erhöhte Anzahl von CD8 <sup>+</sup> T-Zellen mit Vesikel-Fusionen bei unveränderter zelleigener Degranulationsfähigkeit im Alter .....	46
Abbildung 15. Erhöhte Expression der Effektormoleküle Perforin und Granzym B im Alter .....	47
Abbildung 16. Altersbedingte Unterschiede in der Anzahl Granzym B-positiver lytischer Granula .....	48
Abbildung 17. Die schnelle Lyse-Kinetik von CD8 <sup>+</sup> T-Zellen im Alter ist unabhängig von der FasL- und NKG2D-vermittelten Zytotoxizität.....	50
Abbildung 18. Einfluss variierender IL-2 Konzentrationen auf die Zytotoxizität und Differenzierung von CD8 <sup>+</sup> T-Zellen aus jungen und alten Mäusen nach dreitägiger Stimulation .....	52
Abbildung 19. Einfluss variierender IL-2 Konzentrationen auf die Zytotoxizität und Differenzierung von CD8 <sup>+</sup> T-Zellen aus jungen und alten Mäusen nach sechstägiger Stimulation.....	53
Abbildung 20. Schnelle Lyse-Kinetik von CD8 <sup>+</sup> T-Zellen ab dem mittleren Lebensalter.....	55

Abbildung 21. Expression des transgenen $V_{\alpha}2/V_{\beta}5$ -T-Zell-Rezeptors auf $CD8^+$ T-Zellen von jungen und alten $OT-I^{+/-}$ Mäusen.....	58
Abbildung 22. Verteilung der T-Zell-Populationen in Splenozyten aus männlichen und weiblichen $OT-I^{+/+}$ und $OT-I^{+/-}$ Mäusen .....	59
Abbildung 23. Proliferation und Differenzierung von $OT-I$ $CD8^+$ T-Zellen nach antigenspezifischer Aktivierung.....	61
Abbildung 24. Schnellere Zielzelllyse durch $CD8^+$ T-Zellen aus alten männlichen und weiblichen $OT-I^{+/-}$ Mäusen .....	62
Abbildung 25. Erhöhte Expression von Perforin, Granzym B und FasL in $CD8^+$ T-Zellen aus alten $OT-I^{+/-}$ Mäusen .....	63
Abbildung 26. Schnelle Nekrose-Induktion von Zielzellen durch $CD8^+$ T-Zellen aus alten $OT-I^{+/-}$ Mäusen .....	65
Abbildung 27. mRNA-Stabilität von zytotoxischen Effektormolekülen in $CD8^+$ T-Zellen aus jungen und alten $OT-I^{+/-}$ Mäusen.....	66
Abbildung 28. Einfluss der zelleigenen Zytokin-Sekretion auf die Zytotoxizität von $CD8^+$ T-Zellen aus jungen und alten $OT-I^{+/-}$ Mäusen.....	68

## 6.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1. Reagenzien .....	16
Tabelle 2. Kits .....	17
Tabelle 3. Antikörper für durchflusszytometrische Analysen.....	17
Tabelle 4. Aktivierende und inhibitorische Antikörper für Echtzeit-Zytotoxizitäts-Assays .....	18
Tabelle 5. QuantiTect Primer für qPCR.....	18
Tabelle 6. Lösungen .....	18
Tabelle 7. Zellkulturmedien und Puffer .....	19
Tabelle 8. Spezielle Verbrauchsmaterialien .....	19
Tabelle 9. Spezielle Geräte.....	19
Tabelle 10. Spezielle Software.....	20
Tabelle 11. Antikörper zur Analyse der Subtypenverteilung in $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellen .....	26
Tabelle 12. Antikörper zur Quantifizierung von $CD49d$ in $CD8^+$ Gedächtnis-T-Zellen .....	26
Tabelle 13. Antikörper zur Quantifizierung von TCR- $V_{\alpha}2$ und - $V_{\beta}5$ auf $CD8^+$ T-Zellen .....	27
Tabelle 14. Antikörper für Degranulationsassay .....	28
Tabelle 15. Körper- und Milzgewicht von $OT-I^{+/+}$ (n=9-10) und $OT-I^{+/-}$ (n=11-20) Mäusen $\pm$ SEM.....	57

### 6.3 Abkürzungsverzeichnis

APC	Antigenpräsentierende Zelle
BSA	Bovines Serumalbumin
CD	<i>Cluster of Differentiation</i>
CFSE	<i>Carboxyfluorescein succinimidyl ester</i>
CISH	<i>Cytokine inducible SH2-containing protein</i>
Ctrl	Kontrolle
d	Tag ( <i>lat. dies</i> )
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FACS	<i>Fluorescence Activated Cell Sorting</i>
FasL	Fas Ligand
FCS	Fetales Kälberserum
FRET	Förster-Resonanzenergietransfer
GFP	grün fluoreszierendes Protein
GrzB	Granzym B
h	Stunde ( <i>lat. hora</i> )
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1- Piperazinethansulfonsäure
IFN	Interferon
IL-2	Interleukin 2
LcK	Lymphocyte-specific protein tyrosine kinase
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex
min	Minute ( <i>lat. minuta</i> )
mRNA	<i>Messenger ribonucleic acid</i>
OVA	Ovalbumin
PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i>
PFA	Paraformaldehyd
PI	Propidiumiodid
qRT-PCR	Quantitative Reverse Transkriptase Polymerasekettenreaktion
RFP	rot fluoreszierendes Protein
RPMI	Roswell Park Memorial Institute Zellkulturmedium
SEM	<i>Standard Error of the Mean</i>

SIM	<i>Structured Illumination Microscopy</i>
SOCS	<i>Suppressors of cytokine signaling</i>
SPF	Spezifisch pathogenfrei
T <sub>c</sub>	zytotoxische T-Zelle
T <sub>CM</sub>	Zentrale Gedächtnis-T-Zelle
T <sub>EM</sub>	Effektor-Gedächtnis-T-Zelle
Th	T-Helfer-Zelle
TIRFM	<i>Total internal reflection fluorescence microscopy</i>
T <sub>N</sub>	Naïve T-Zelle
TNF	Tumornekrosefaktor
T <sub>VM</sub>	<i>Virtual memory T cells</i>
TZR	T-Zell-Rezeptor
U	<i>Unit</i>
ZAP70	<i>Zeta-chain-associated protein kinase 70</i>

## Publikationen

Lis, A., & **Zöphel, D.** Elderly CD8<sup>+</sup> T cells in the focus for immunotherapeutic approaches. *Aging* (Editorial under review)

### 2023

**Zöphel, D.**, Kaschek, L., Steiner, R., Janku, S., Hsin-Fang, C., & Lis, A. (2023). Heterozygous OT-I mice reveal that antigen-specific CD8<sup>+</sup> T cells shift from apoptotic to necrotic killers in the elderly. *Aging Cell*, e13824. <https://doi.org/10.1111/acel.13824>

### 2022

**Zöphel, D.**, Angenendt, A., Kaschek, L., Ravichandran, K., Hof, C., Janku, S., Hoth, M., & Lis, A. (2022). Faster cytotoxicity with age: Increased perforin and granzyme levels in cytotoxic CD8<sup>+</sup> T cells boost cancer cell elimination. *Aging Cell*, e13668. <https://doi.org/10.1111/acel.13668>

### 2021

Zhu, J., Yang, W., Zhou, X., **Zöphel, D.**, Soriano-Baguet, L., Dolgener, D., Carlein, C., Hof, C., Zhao, R., Ye, S., Schwarz, E. C., Brenner, D., Prates Roma, L., & Qu, B. (2021). High Glucose Enhances Cytotoxic T Lymphocyte-Mediated Cytotoxicity. *Frontiers in Immunology*, 12. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.689337>

### 2020

**Zöphel, D.**, Hof, C., & Lis, A. (2020). Altered Ca<sup>2+</sup> Homeostasis in Immune Cells during Aging: Role of Ion Channels. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(1). <https://doi.org/10.3390/ijms22010110>

## Danksagung

Mit Abschluss dieser Arbeit geht ein prägender Lebensabschnitt zu Ende, der durch viele wunderbare Menschen begleitet wurde, bei denen ich mich an dieser Stelle gerne bedanken möchte.

Mein besonderer Dank gilt dabei Prof. Dr. Markus Hoth, der es mir ermöglicht hat, in seiner Arbeitsgruppe zu promovieren. Vielen Dank für deine tolle Unterstützung in wissenschaftlichen und persönlichen Belangen. Deine Motivationsfähigkeit und Menschlichkeit sorgen für einen unglaublichen Zusammenhalt deiner Gruppe. Danke, dass ich ein Teil dieses Teams sein darf!

Von ganzem Herzen möchte ich mich bei meiner Betreuerin Dr. Annette Lis bedanken, die mir in den letzten Jahren nicht nur wissenschaftlich zur Seite stand. Dein Verständnis für all meine kleineren und größeren Problemchen und dein Vertrauen in meine Fähigkeiten haben mich immer wieder gestärkt. Dein Rückhalt war und ist für mich unsagbar wichtig.

Ein großer Dank gilt meinen Mädels aus dem „Eckbüro“, ihr seid klasse! Die Nachmittage an der Boulderwand und die gemeinsamen Abende haben so manche stressige Zeit besser ertragen lassen. Danke an Johanna Jansky und Nadja Kuchler für die inspirierenden Diskussionen, euer offenes Ohr und die vielen aufbauenden Worte. Das Wissen, immer auf euch zählen zu können, ist Gold wert.

Ebenfalls möchte ich mich bei Keerthana Ravichandran aus der AG Rettig für die tolle Zusammenarbeit während unserer Kooperation bedanken. Vielen Dank auch an Lea Kaschek für die unzähligen Stunden die du mit der Analyse unserer Daten inklusive meiner Extrawünsche verbracht hast. Danke an Gebhard Stopper für deine Unterstützung bei all meinen IT-Problemen, du hast mich diverse Male aus meiner Verzweiflung gerettet.

Ein großes Dankeschön an alle Mitarbeiter des Tierstalls für den enormen Einsatz bei der Versorgung unserer Versuchstiere und die Unterstützung bei unseren Vorhaben. Auch bei unseren TAs möchte ich mich für die Hilfsbereitschaft und vielen nützlichen Tipps und Ratschläge bedanken. Ein ganz besonderer Dank geht dabei an Sandra Janku, nicht nur für deine großartige Hilfe bei meinem Projekt, sondern auch für deine moralische Unterstützung!

Abschließend möchte ich mich ganz herzlich bei meiner Familie bedanken, ohne eure Unterstützung wäre vieles gar nicht möglich gewesen. Aus tiefsten Herzen danke ich meiner Schwester Sylvia. Du bist diesen Weg seit dem Studium mit mir gegangen, hast mich immer wieder aufgebaut und all meine Launen und Entscheidungen mitgetragen. Danke für deine Geduld mit mir!