

Altersforschung

Zytotoxische CD8⁺-T-Zellen im Alter: unterschätzte Killer?

ANNETTE LIS, LEA KASCHEK, DORINA ZÖPHEL
BIOPHYSIK, CENTRUM FÜR INTEGRATIVE PHYSIOLOGIE UND MOLEKULARE MEDIZIN,
UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

Aging leads to various alterations in immune cell functions. Here, we report our surprising findings that despite immunosenescence, CD8⁺ T cells' cytotoxic efficiency increases with age. The FRET-based apoptosis sensor pCasper, stably transfected into tumor cells, revealed fundamental changes in the cytotoxic mechanisms. Antigen-specific CD8⁺ T cells from elderly OT-I mice shift from apoptotic to necrotic killers. This capability might affect cell-based immunotherapies in old age.

DOI: 10.1007/s12268-024-2213-y
© Die Autorinnen 2024

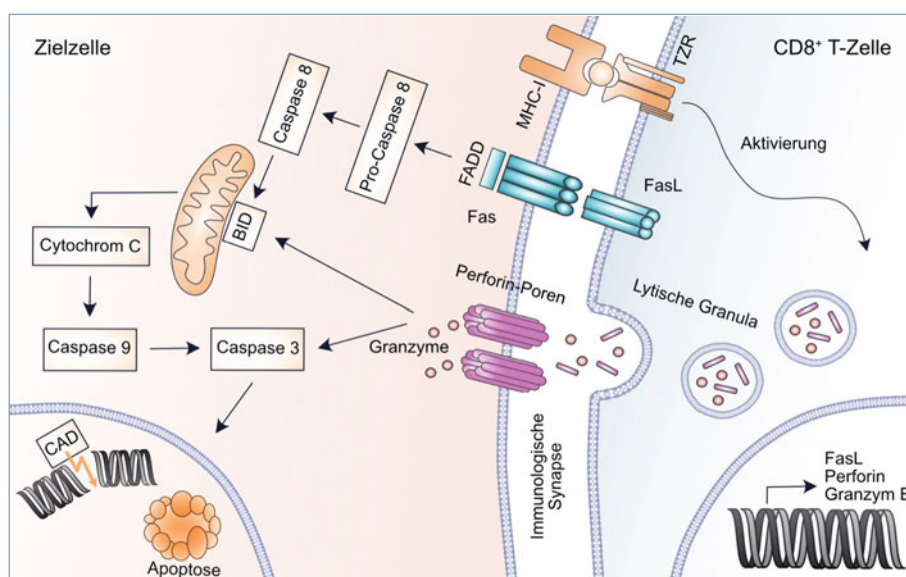
■ Immunoseneszenz ist die langsame Veränderung des Immunsystems im Alter und geht mit einem steigenden Risiko für schwere Infektionsverläufe und Krebserkrankungen einher. Im Laufe des Lebens nimmt die adaptive Immunantwort kontinuierlich ab. Gleichzeitig wird eine vermehrte Ausschüt-

tung proinflammatorischer Zytokine mit chronischen Entzündungsreaktionen in Verbindung gebracht, die die Karzinogenese fördern und zur Entstehung typischer Alterserkrankungen wie Alzheimer, Arthritis oder Arteriosklerose beitragen [1]. Die komplexen Wechselwirkungen, bedingt durch

Veränderungen einzelner Immunzellen, erschweren die Abgrenzung zwischen zell-eigenen Defekten und dem Einfluss des veränderten Mikromilieus. Die Identifizierung intrinsisch erhaltener Fähigkeiten ist jedoch für die Optimierung immuntherapeutischer Strategien im Alter von zentraler Bedeutung.

Zytotoxizitätsmechanismen von CD8⁺-T-Zellen

Zytotoxische CD8⁺-T-Zellen spielen als Teil der adaptiven Immunantwort eine Schlüsselrolle bei der Erkennung und Abtötung virusinfizierter und entarteter Zellen und sind somit entscheidend für eine effiziente Immunantwort und einen positiven Krankheitsverlauf. CD8⁺-T-Zellen erkennen über T-Zell-Rezeptoren spezifische Antigene. Aus naiven T-Zellen entstehen so langlebige Gedächtnispopulationen, die bei erneutem Kontakt mit demselben Antigen eine schnelle Immunreaktion ermöglichen. Für die Zerstörung ihrer Zielzellen nutzen CD8⁺-T-Zellen zwei wesentliche Zytotoxizitätsmechanismen: die über Liganden-Rezeptor-Interaktion induzierte Apoptose und die Exozytose-vermittelte Freisetzung lytischer Granula (**Abb. 1**). Die Bindung des T-Zell-Rezeptors (TZR) an ein MHC-assoziiertes Antigen führt zur Ausbildung einer immunologischen Synapse und aktiviert eine komplexe Kaskade von Signalwegen. Die Granula-Exozytose-vermittelte Zytotoxizität beruht auf der Freisetzung der in den lytischen Granula enthaltenen Effektormoleküle, im wesentlichen Perforin und Granzyme. Perforin bildet Poren in der Plasmamembran von Zielzellen. Die somit in die Zelle eindringende Serinprotease Granzym B führt zur Aktivierung der Caspase-Kaskade, die eine Apoptose auslöst. Ein weiterer bedeutender Mechanismus zur geordneten Eliminierung von potenziell schädigenden Zellen ist die Interaktion des Fas-Rezeptors (CD95) auf Zielzellen mit seinem Liganden FasL (CD178) auf CD8⁺-T-Zellen (**Abb. 1**). Die Bindung rekrutiert das Adaptermolekül FADD (*Fas-associated death domain*) und bildet den DISC (*death-inducing*



▲ **Abb. 1:** Die Zytotoxizitätsmechanismen der CD8⁺-T-Zellen. Die Apoptose der Zielzellen wird durch Aktivierung der Caspase-Kaskade eingeleitet, vermittelt durch Bindung des Fas-Liganden (FasL) an den Rezeptor Fas oder durch Freisetzung lytischer Granula. Diese enthalten das porenbildende Protein Perforin, wodurch Serinproteasen (Granzyme) in die Zielzelle eindringen.

signaling complex), was ebenfalls die Caspase-Kaskade aktiviert.

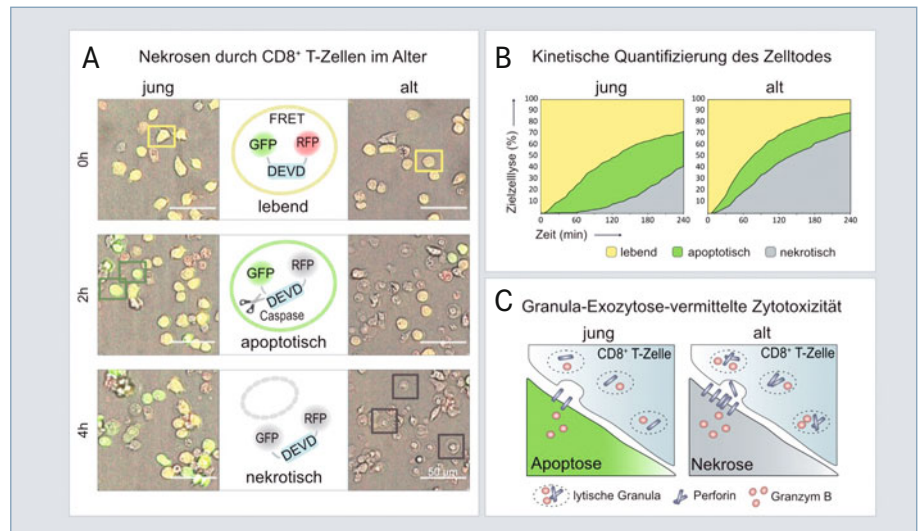
Die CD8⁺-T-Zell-vermittelte Zytotoxizität im Alter

Die Abnahme naiver CD8⁺-T-Zellen, verursacht durch die Rückbildung des Thymusgewebes und der kontinuierlichen Antigenexposition im Verlauf des Lebens, zählt sicher zu den markantesten Faktoren der Immunseneszenz und trägt wesentlich zu einer verminderten Immunantwort gegenüber neuen Erregern und Impfstoffen bei. Altersbedingte Veränderungen in der Expression von Oberflächenrezeptoren und Signalmolekülen beeinträchtigen die Proliferation und Differenzierung der Zellen. Der dadurch entstehende quantitative Mangel an funktionalen Effektorpopulationen verstärkt die ineffiziente Erreger-Eliminierung zusätzlich.

Trotz klarer Hinweise auf eine beeinträchtigte CD8⁺-T-Zell-Immunität im Alter sind die Kenntnisse über die Aufrechterhaltung der Zytotoxizitätsmechanismen während des Alterungsprozesses begrenzt. Mithilfe eines in unserem Labor etablierten fluoreszenzbasierten Echtzeit-Zytotoxizitätsassays [2] untersuchten wir die zellintrinsische zytotoxische Kapazität von CD8⁺-T-Zellen im Alter – mit überraschendem Ergebnis: Nach polyklonaler *in vitro*-Stimulation zeigen CD8⁺-T-Zellen aus alten Wildtyp-Mäusen eine erhöhte zytotoxische Aktivität mit einer gesteigerten Abtötungskinetik gegenüber verschiedenen Tumorzelllinien [3]. Um die altersbedingten Veränderungen in einem antigenspezifischen Modellsystem zu bestätigen, generierten wir eine heterozygote OT-I-Mauslinie, deren transgene CD8⁺-T-Zell-Rezeptoren spezifisch das über den MHC präsentierte Peptid OVA₂₅₇₋₂₆₄ erkennen [4]. Die schnellere und effizientere Lyse der OVA-exprimierenden Lymphom-Zelllinie EG.7 durch CD8⁺-T-Zellen aus gealterten OT-I-Mäusen bestätigte die hohe zytotoxische Effizienz. Die nach polyklonaler sowie antigenspezifischer Stimulation beobachtete erhöhte Expression von Granzym B, Perforin und FasL im Alter deutet darauf hin, dass die gesteigerte Zytotoxizität einem konservierten Mechanismus folgt, unabhängig von der Aktivierungsweise des T-Zell-Rezeptors.

Apoptose-Reporter pCasper liefert überraschende Einblicke in altersspezifische Zytotoxizität

Um zu verstehen, wie sich die hohe Expression der Effektormoleküle auf die Zytotoxi-



▲ **Abb. 2:** Analyse des Zelltodes mittels Apoptose-Sensor pCasper. **A**, Prinzip des FRET-basierten Konstruktes. In lebenden Zellen sind die TagGFP- und TagRFP-Fluorophore durch eine Caspase-3spezifische DEVD-Spaltungssequenz miteinander verbunden, wodurch die Zielzellen gelb fluoreszieren. Der Kontakt mit CD8⁺-T-Zellen leitet die Caspase-abhängige Apoptose ein. Durch die daraus resultierende Spaltung der beiden Fluorophore erscheinen apoptotische Zielzellen grün. Nekrosen zerstören die Membran vollständig, das Konstrukt entweicht und die Zellen verlieren ihre Fluoreszenz. **B**, kinetische Quantifizierung des Zielzelltodes nach Kontakt mit CD8⁺-T-Zellen aus jungen und alten OT-I-Mäusen [4]. **C**, altersbedingte Veränderungen in der Granula-Exozytose-vermittelten Zytotoxizität. Die im Alter hohe Konzentration des Effektormoleküls Perforin in den lytischen Granula der CD8⁺-T-Zellen ersetzt die üblicherweise eingeleitete, geordnete Apoptose durch schnelle Nekrosen.

tätsmechanismen gealterter CD8⁺-T-Zellen auswirkt, transfizierten wir EG.7-Lymphomzellen stabil mit dem Apoptose-Reporter pCasper [5]. Dieser FRET-basierte Sensor verbindet TagGFP- und TagRFP-Fluorophore über einen Linker, der eine Caspase-3-spezifische DEVD-Spaltungssequenz enthält (**Abb. 2A**). Die Aktivierung der Caspase-Kaskade bei Apoptose-Induktion durch CD8⁺-T-Zellen führt zur Spaltung der DEVD-Sequenz. Durch die räumliche Trennung der Fluorophore sinkt die rote FRET-Fluoreszenz, die GFP-Fluoreszenz nimmt hingegen zu. Bei einer Nekrose entweicht das Konstrukt aus der zerstörten Zelle und sie verliert ihre Fluoreszenz vollständig. Die daraus resultierende farbliche Unterscheidung ermöglicht die kinetische Analyse des Zielzelltodes auf Einzelzellebene (**Abb. 2B**). Unsere Beobachtungen legen nahe, dass die schnelle Zielzellabtötung im Alter weniger auf Alterationen in rezeptorvermittelten Signalwegen, sondern auf eine veränderte Granula-Exozytose-vermittelte Zytotoxizität zurückzuführen ist. Während Perforin üblicherweise durch seine porenbildende Funktion die Aufnahme von Granzymen und damit die Caspase-abhängige Apoptose vermittelt, führte der Kontakt mit CD8⁺-T-Zellen aus gealterten OT-I-Mäusen bereits nach wenigen Minuten zur Nekrose

der Zielzelle [4]. Offensichtlich haben die hohen Perforin-Konzentrationen im Alter eine ausgeprägte Schädigung der Membrintegrität zur Folge, wodurch die geordnete Apoptose durch eine schnelle Induktion von Nekrosen ersetzt wird (**Abb. 2C**).

Bedeutung für immuntherapeutische Ansätze

Moderne zellbasierte Immuntherapien, wie der adoptive T-Zelltransfer, nutzen patienteneigene CD8⁺-T-Zellen und erlangen aufgrund vielversprechender Resultate zunehmend Beachtung. Genetisch modifizierte T-Zellen mit chimären Antigenrezeptor (CAR-T-Zellen) werden bei der Behandlung von Leukämien und Lymphomen bereits erfolgreich eingesetzt. Obwohl die Mehrheit der Patient:innen bei Diagnosestellung älter als 65 Jahre ist, findet diese Form der Krebstherapie im Alter nur begrenzte Anwendung. Durch Vorerkrankungen sind ältere Patient:innen in klinischen Studien häufig unterrepräsentiert, dennoch zeigen die bisherigen Daten ein deutliches Bild: Die Wirksamkeit der CAR-T-Zellen ist bei älteren Lymphom-Patient:innen mindestens genauso gut, einige Studien deuten sogar auf ein besseres Therapieansprechen in dieser Altersgruppe hin [6]. Typische Nebenwirkungen

Hier steht eine Anzeige.

 Springer

– wie Neurotoxizität oder das Zytokin-Freisetzungssyndrom – scheinen im Alter jedoch verstärkt aufzutreten, die zugrunde liegenden Ursachen sind bis heute unklar [6]. Unsere gewonnenen Erkenntnisse über die altersbedingten Veränderungen der Zytotoxizitätsmechanismen in CD8⁺-T-Zellen liefern nun einen möglichen Erklärungsansatz. Eine Verschiebung der geordneten Eliminierung von Tumorzellen durch Apoptose-Induktion hin zu einem schnellen nekrotischen Zelltod lässt eine starke entzündungsfördernde Immunreaktion vermuten. Nekrosen werden häufig mit einer erhöhten Freisetzung proinflammatorischer Zytokine und Gewebeschädigungen in Verbindung gebracht. Die Folge wäre eine Verstärkung der mit der CAR-T-Zell-Therapie assoziierten Nebenwirkungen. Auch wenn diese Zusammenhänge bislang spekulativ sind, unterstreichen unsere Ergebnisse die Bedeutung funktionaler Einzelzell-Analysen bei der Aufklärung medizinischer Phänomene. Darüber hinaus bekräftigen sie die Notwendigkeit, Behandlungsstrategien gezielter an das Alter der Patient:innen auszurichten. So könnten ältere Tumorpatient:innen sowohl von einer frühzeitigen CAR-T-Zell-Therapie als auch von innovativen Ansätzen zur verbesserten Kontrolle der Zytotoxizität der modifizierten CAR-T-Zellen [7] besonders profitieren.

Danksagung

Wir bedanken uns bei der Deutschen Forschungsgemeinschaft (Projektnummer: LI 1750/4-2) und dem Homburger Forschungsförderungsprogramm der Medizinischen Fakultät der Universität des Saarlandes (HOMFOR) für die finanzielle Unterstützung. Besonderer Dank gebührt unseren geschätzten Kooperationspartnern für die herausragende Zusammenarbeit: Prof. Markus Hoth und seinem Team für ihre Experti-

se in der Einzelzellanalyse, dem Team der technischen Assistenz für ihre tägliche Unterstützung und den Tierpflegern für die fürsorgliche Betreuung unserer älteren Mäuse.

Literatur

- [1] Fülöp T, Dupuis G, Witkowski JM, Larbi A (2016) The Role of Immunosenescence in the Development of Age-Related Diseases. *Rev Invest Clin* 68: 84–91
- [2] Kummerow C, Schwarz EC, Bufe B et al. (2014) A simple, economic, time-resolved killing assay. *Eur J Immunol* 44: 1870–1872
- [3] Zöphel D, Angenendt A, Kaschek L et al. (2022) Faster cytotoxicity with age: Increased perforin and granzyme levels in cytotoxic CD8⁺ T cells boost cancer cell elimination. *Aging Cell* 21: e13668
- [4] Zöphel D, Kaschek L, Steiner R et al. (2023) Heterozygous OT-1 mice reveal that antigen specific CD8⁺ T cells shift from apoptotic to necrotic killers in the elderly. *Aging Cell* 22: e13824
- [5] Backes CS, Friedmann KS, Mang S et al. (2018) Natural killer cells induce distinct modes of cancer cell death: Discrimination, quantification, and modulation of apoptosis, necrosis, and mixed forms. *J Biol Chem* 293: 16348–16363

[6] Shouse G, Danilov AV, Artz A (2022) A. CAR T-Cell Therapy in the Older Person: Indications and Risks. *Curr Oncol Rep* 24: 1189–1199

[7] Huang K, Liu X, Han G, Zhou Y (2022) Nano-optogenetic immunotherapy. *Clin Transl Med* 12: e1020

Funding note: Open Access funding enabled and organized by Projekt DEAL.
Open Access: Dieser Artikel wird unter der Creative Commons Namensnennung 4.0 International Lizenz veröffentlicht, welche die Nutzung, Vervielfältigung, Bearbeitung, Verbreitung und Wiedergabe in jeglichem Medium und Format erlaubt, sofern Sie den/die ursprünglichen Autor(en) und die Quelle ordnungsgemäß nennen, einen Link zur Creative Commons Lizenz beifügen und angeben, ob Änderungen vorgenommen wurden. Die in diesem Artikel enthaltenen Bilder und sonstiges Drittmaterial unterliegen ebenfalls der genannten Creative Commons Lizenz, sofern sich aus der Abbildungslegende nichts anderes ergibt. Sofern das betreffende Material nicht unter der genannten Creative Commons Lizenz steht und die betreffende Handlung nicht nach gesetzlichen Vorschriften erlaubt ist, ist für die oben aufgeführten Weiterverwendungen des Materials die Einwilligung des jeweiligen Rechteinhabers einzuholen. Weitere Details zur Lizenz entnehmen Sie bitte der Lizenzinformation auf <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/deed.de>.

Korrespondenzadresse:

Dr. Dorina Zöphel

Dr. Annette Lis

Biophysik, Centrum für Integrative Physiologie und Molekulare Medizin, Universität des Saarlandes
 D-66424 Homburg
dorina.zoepfel@uks.eu, annette.lis@uks.eu

AUTORINNEN



Dorina Zöphel

2011–2015 Bachelorstudium Molekulare und Technische Medizin an der Hochschule Furtwangen University. 2016–2018 Masterstudium Human- und Molekularbiologie an der Universität des Saarlandes mit anschließender Promotion in der Biophysik. Seit 2024 PostDoc in der Biophysik an der Universität des Saarlandes.



Lea Kaschek

2014–2019 Bachelor- und Masterstudium Human- und Molekularbiologie an der Universität des Saarlandes. Seit 2019 Promotion in der Biophysik an der Universität des Saarlandes.



Annette Lis

1996–2005 Pharmaziestudium mit anschließender Promotion am Institut der Pharmakologie an der Universität des Saarlandes. 2005–2011 PostDoc und Assistenzprofessorin an der Medizinischen Fakultät der Universität von Hawaii, USA. 2012–2013 PostDoc und seit 2013 Gruppenleiterin in der Biophysik an der Universität des Saarlandes.