

AUS DEM INSTITUT FÜR MEDIZINISCHE IMMUNOLOGIE UND DES
BERLIN INSTITUTE OF HEALTH CENTER FOR REGENERATIVE
THERAPIES (BCRT)
DER MEDIZINISCHEN FAKULTÄT CHARITÉ – UNIVERSITÄTSMEDIZIN
BERLIN

DISSERTATION

CHARAKTERISIERUNG VON T-STAMMZELL-GEDÄCHTNIS ZELLEN (T_{SCM})
IN VERSCHIEDENEN ALTERSKOHORTEN
CHARACTERIZATION OF T STEM CELL MEMORY CELLS (T_{SCM}) IN
DISTINCT AGE BANDS

ZUR ERLANGUNG DES AKADEMISCHEN GRADES

DOCTOR MEDICINAE (DR. MED.)

VORGELEGT DER MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
CHARITÉ – UNIVERSITÄTSMEDIZIN BERLIN

VON

EVA HASSELMANN

Datum der Promotion:30.11.2023.....

TABELLEN- UND ABBILDUNGSVERZEICHNIS	3
1. ZUSAMMENFASSUNG	6
2. ABSTRACT	7
3. EINLEITUNG	8
3.1. DAS IMMUNSYSTEM	8
3.1.1. Grundlagen der T-Zell-Immunität.....	8
3.1.2. Subpopulationen und immunologisches T- Zell- Gedächtnis.....	10
3.1.3. T-Stammzell-Gedächtniszellen (T_{SCM})	12
3.1.4. Einflüsse des biologischen Alters auf die Zusammensetzung des T-Zell- Pools 14	
3.1.5.1. Der alternde Mensch	14
3.1.5.2. Homöostase naiver T-Zellen	15
3.1.5.3. Alterndes T-Zell-Gedächtnis	16
3.1.5. Das Knochenmark als Nische für Gedächtnis-T-Zellen.....	18
3.2. DAS HUMANE CYTOMEGALIEVIRUS (CMV).....	19
3.2.1. Charakteristik und Pathophysiologie.....	19
3.2.2. Epidemiologie	19
3.2.3. Klinisches Bild.....	20
3.2.4. T-Zell-Reaktionen auf CMV	20
3.2.5. CMV im immunkompromittierten Patienten.....	22
3.3. ETABLIERUNG EINES FACS-PANELS	23
3.3.1. Phänotypisierung.....	23
3.3.2. Bestimmung antigen-spezifischer T-Zellen.....	26
4. AUFGABENSTELLUNG.....	28
5. MATERIAL UND METHODEN.....	29
5.1. MATERIAL	29
5.1.1. Verbrauchsmaterialien	29
5.1.2. Pufferlösungen, Kulturmedien, Chemikalien	30
5.1.3. FACS Antikörper	31
5.1.4. Kits	31
5.1.5. Geräte	32
5.2. METHODEN	33
5.2.1. Stichprobenbeschreibung.....	33
5.2.2. Bestimmung der absoluten T-Zell Zahl	34
5.2.3. Isolation peripherer mono-nukleärer Blutzellen (PBMC)	34
5.2.4. Isolation mononukleärer Blutzellen aus dem Knochenmark (BMNC)	36
5.2.5. Zellzählung.....	36
5.2.6. Antigen-spezifische Stimulation.....	37
5.3. FÄRBUNG.....	38
5.3.1. Paneletablierung und -design.....	38
5.3.1.1. Oberflächen-Färbung	43
5.3.1.2. Fixierung und Permeabilisierung.....	43
5.3.1.3. Intrazelluläre Färbung	43

5.4.	DURCHFLUSSZYTOMETRISCHE MESSUNG.....	45
5.5.	STATISTISCHE AUSWERTUNG.....	46
6.	ERGEBNISSE.....	48
6.1.	DIFFERENZIERUNG UND CHARAKTERISIERUNG VON CD4 ⁺ UND CD8 ⁺ T-ZELLEN	48
6.2.	EINFLUSS VON ALTER UND CMV-INFEKTIONSSTATUS AUF T-ZELLEN	51
6.2.1.	<i>Grundlagen der statistischen Analyse und globale Zellzahlen von CD3⁺, CD4⁺ und CD8⁺</i>	51
6.2.2.	<i>T_{SCM} als stabile Population.....</i>	52
6.2.3.	<i>Höhere absolute und relative CD8⁺ T_{EMRA} mit zunehmendem Alter bei positivem CMV-Status</i>	53
6.3.	CMV-SPEZIFISCHE T-ZELL-ANTWORT.....	64
6.3.1.	<i>Gating-Strategie und virus-spezifische Reaktivität der T-Zell-Subsets....</i>	64
6.3.2.	<i>Polyfunktionales Potential der T-Zell-Subsets</i>	72
6.4.	FUNKTIONALITÄTSANALYSE DER TSCM	74
6.4.1.	<i>Analyse der CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen hinsichtlich der o.g. Aktivierungsmarker.....</i>	74
6.4.1.1.	<i>CXCR3 ist hoch exprimiert in CD8⁺ T_{CM} und T_{SCM}.....</i>	74
6.4.1.2.	<i>CXCR3 ist in CD8⁺ T_{CM} und T_{SCM} invers alterskorreliert.....</i>	75
6.4.1.3.	<i>CX₃CR₁ ist hoch exprimiert auf CD8⁺ Effektor-T-Zellen und gering auf früh-differenzierten T-Zellen</i>	75
6.4.1.4.	<i>Positiver CMV-Status geht mit höherer MFI von CX₃CR₁ auf CD8⁺T-Zellen einher</i>	76
6.4.1.5.	<i>PD-1 Expression steigt mit zunehmender T-Zell-Differenzierung.....</i>	76
6.4.1.6.	<i>MFI von PD-1 ist positiv alterskorreliert in CD4⁺ und CD8⁺</i>	79
6.5.	KNOCHENMARK ALS NICHE FÜR CD8 ⁺ MEMORY- ZELLEN	86
7.	DISKUSSION	88
7.1.	CD4 ⁺ UND CD8 ⁺ T-ZELL-POOL	88
7.1.1.	<i>Validierung der Messung.....</i>	88
7.2.	T _{SCM} ALS ALTERSUNABHÄNGIGER STABILER GRUNDPFEILER DER T-ZELL-IMMUNITÄT.....	89
7.2.1.	<i>T_{SCM} mit distinkten Expressionsmuster von CXCR3, CX₃CR₁ und PD-1</i>	91
7.2.2.	<i>CMV als Motor eines altersbedingt veränderten Gedächtnis-Pools</i>	94
7.2.3.	<i>Das Knochenmark als mögliche Nische für T_{SCM}.....</i>	97
7.3.	LIMITATIONEN UND AUSBLICK.....	98
7.4.	ZUSAMMENFASSUNG	100
	LITERATURVERZEICHNIS.....	101
	EIDESSTAATLICHE VERSICHERUNG.....	109
	CURRICULUM VITAE.....	110
	DANKSAGUNG	112
	BESCHEINIGUNG DES AKKREDITIERTEN STATISTIKERS	113

Tabellen- und Abbildungsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1. Hierarchisches Differenzierungsmodell von T-Zellen nach Gattinoni et al. (2017).....	12
Abbildung 2. Schematische Darstellung der PBMC Isolation durch Dichtegradientenzentrifugation.	35
Abbildung 3. Titration des Antikörpers CX3CR1 (Al 647).	40
Abbildung 4. Fluorescence minus one (FMO) und Einzelfärbung (Single Stain) des Antikörpers CD95 (PE-Cy7).	40
Abbildung 5. Typisierung humaner Immunzellen anhand von Vorwärts- und Seitwärtsstreuung des Laserstrahls.	45
Abbildung 6. Gating Strategie für CD4 ⁺ und CD8 ⁺ T-Zell Populationen und Subsets.	49
Abbildung 7. Frequenzen und absolute Zellzahl der CD4 ⁺ - und CD8 ⁺ T-Zell Populationen.....	50
Abbildung 8. CMV-Status und Alter korriert mit CD4 ⁺ und CD8 ⁺ T _{EMRA} und naiven T-Zell-Frequenzen.	55
Abbildung 9. CMV ⁺ Donoren zeigen höhere absolute CD4 ⁺ und positiv alterskorrelierte CD8 ⁺ T _{EMRA} Zellzahlen.	58
Abbildung 10. Auswirkungen von CMV- Status und Alter auf die proportionalen Anteile des Gesamt- T-Zell-Pools.	60
Abbildung 11. Das Verhältnis von T _{EMRA} bzw. T _{SCM} zu naiven CD8 ⁺ T-Zellen ist innerhalb CMV ⁺ Spender positiv alterskorreliert.	62
Abbildung 12. Gating-Strategie zur Identifikation CMV- spezifischer CD4 ⁺ und CD8 ⁺ T- Zellen.....	66
Abbildung 13. Frequenzen antigen-spezifischer CD4 ⁺ und CD8 ⁺ T- Zellen nach CMV-spezifischer Stimulation (pp65 und IE-1).....	68
Abbildung 14. CMV-spezifische T-Zellen (IFN γ ⁺ CD137 ⁺) innerhalb CD4 ⁺ und CD8 ⁺ naiver T-Zellen..	69
Abbildung 15. CD4 ⁺ T-Zell-Gesamtfrequenz ist invers mit den CMV- spezifischen CD4 ⁺ T-Zellen korreliert.	70
Abbildung 16. CMV- spezifische CD4 ⁺ und CD8 ⁺ T-Zellen sind positiv mit dem Anteil CMV- spezifischer CD4 ⁺ und CD8 ⁺ T _{SCM} korreliert.	71
Abbildung 17. Polyfunktionalitätsanalysen der CD8 ⁺ T-Zell-Subsets.....	73
Abbildung 18. Mittlere Fluoreszenzintensität von CXCR3, CX ₃ CR ₁ und PD-1 innerhalb der CD4 ⁺ und CD8 ⁺ T- Zell Subsets.	78
Abbildung 19. Einfluss von CMV- Status und Alter auf die MFI von CXCR3, CX ₃ CR ₁ und PD-1 innerhalb CD4 ⁺ und CD8 ⁺ T- Zellen.....	80
Abbildung 20. Einfluss von CMV- Status und Alter auf die MFI von CXCR3, CX ₃ CR ₁ und PD-1 innerhalb der CD8 ⁺ T- Zell- Subsets.	83
Abbildung 21. Heatmap zur MFI der Marker PD-1, CXCR3 und CX3CR1 in CD8 ⁺ T-Zellen.	85
Abbildung 22. Vergleich der T- Zell- Frequenzen in Knochenmark und PBMCs in gekoppelten Proben.	87

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1. Verwendete Verbrauchsmaterialien	29
Tabelle 2. Pufferlösungen, Kulturmedien, Chemikalien.....	30
Tabelle 3. FACs Antikörper	31
Tabelle 4. Verwendete Kits.....	31
Tabelle 5. Verwendete Geräte	32
Tabelle 6. Stichprobenbeschreibung der Gesamtkohorte	34
Tabelle 7. Mittlere Dichte von Blutbestandteilen.....	35
Tabelle 8. Titration der Aktivierungsmarker.....	41
Tabelle 9. Titration von Oberflächen- und intrazellulären Markern	42
Tabelle 10. Mastermix: Oberflächenmarker.....	43
Tabelle 11. Mastermix: Intrazelluläre Marker	44
Tabelle 12. Mittelwerte und Standardabweichungen der entsprechend Abbildung 6 erfassten CD4 ⁺ und CD8 ⁺ T- Zell- Subset Frequenzen und absoluten Zellzahlen pro µL Vollblut.	51
Tabelle 13. Signifikanzanalysen von Alter und CMV-Serostatus innerhalb der CD3 ⁺ /4 ⁺ /8 ⁺ T-Zell-Frequenzen.	56
Tabelle 14. Signifikanzanalysen von Alter und CMV-Status innerhalb der CD3 ⁺ /4 ⁺ /8 ⁺ absoluten T-Zell-Zahlen.	57
Tabelle 15. Signifikanzanalysen von Alter und CMV- Status bezogen auf den gesamten T- Zell- Pool.....	61
Tabelle 16. Signifikanzanalysen der Ratios von T _{EMRA} bzw. T _{SCM} zu naiven T-Zellen innerhalb CD4 ⁺ und CD8 ⁺	63
Tabelle 18. Mittelwerte und Standardabweichungen der CMV-spezifischen T-Zell- Antwort. Anteil der Subsets an Gesamt-Zytokinantwort und Anteil an CMV- spezifischen T-Zellen pro Subset.	68
Tabelle 19. Prozentualer Anteil einfach und zweifach positiver CD8 ⁺ T-Zellen	74
Tabelle 20. Mittelwerte, Standardabweichungen und Signifikanzniveaus der Mittleren Fluoreszenzintensität der Aktivierungsmarker CXCR3, CX ₃ CR ₁ und PD-1.	77
Tabelle 21. Signifikanzanalysen von Alters- und CMV-Status-Effekten auf die Aktivierungsmarker CXCR3, CX3CR1 und PD-1.	81
Tabelle 22. Signifikanzanalysen von Alters- und CMV-Status-Effekten auf die Aktivierungsmarker CXCR3, CX3CR1 und PD-1 innerhalb CD8 ⁺ T-Zell Subsets.	84
Tabelle 23. Mittelwerte und Standardabweichungen von T-Zell-Frequenzen in gekoppelten PBMC und BMMC Proben von vier Spendern.....	87

1. Zusammenfassung

Einleitung: T-Stammzell-Gedächtniszellen (T_{SCM}) stellen aufgrund ihrer Langlebigkeit, Multipotenz und des Potenzials zur Rekonstitution bestimmter T-Zellpopulationen eine wichtige Säule der nachhaltigen Immunabwehr dar. Sie scheinen im Kontext akuter und chronischer Infektionen sowie der adoptiven T-Zell-Therapie von großer klinischer Relevanz. Unklar sind der Einfluss des biologischen Alters sowie Alterationen des Immunsystems auf T_{SCM} und deren funktionelle Eigenschaften. Ziel der vorliegenden Arbeit war eine genauere Typisierung der T_{SCM} in ihrer absoluten und relativen Frequenz sowie der Funktionalität anhand funktionaler Marker in einer breiten Alterskohorte.

Methode: Die T-Zell-Frequenzen und absoluten Zellzahlen von T-Zell-Subpopulationen wurden im peripheren Blut von 60 Spendern durchflusszytometrisch bestimmt. Innerhalb der Subpopulationen wurde die Expression von Aktivierungs- und Proliferationsmarker in Abhängigkeit von Alter und CMV-Infektionsstatus (IS) erfasst. Es wurde PD-1 als Marker einer persistierenden T-Zell-Aktivierung mit erhöhter Sensitivität für eine Checkpointaktivierung, CXCR3 als Rezeptor des T-Zell-Migrationspotenzials zu Entzündungsgebieten und CX3CR1 als Marker der Effektor- vs. Proliferationsfunktion untersucht. Der Einfluss des CMV-IS wurde mittels intrazellulärer Co-Expression von T-Zelleffektor-Mediatoren nach CMV-abgeleiteter Peptidstimulation bestimmt. Zusätzlich wurden gekoppelte Blut- und Knochenmarkproben von 4 Spendern hinsichtlich der absoluten und relativen T_{SCM} -Zell-Zahlen untersucht.

Ergebnisse: Es fanden sich konstante T_{SCM} -Frequenzen und absolute Zell-Zahlen unabhängig vom Alter und CMV-IS. Die höchste Effektor-Polyfunktionalität und das größte Migrationspotential (CXCR3) zeigten früh-differenzierte T-Zell-Subtypen (T_{SCM} und zentrale Gedächtnis-T-Zellen(T_{CM})). Ein positiver CMV-IS führte zu einer geringeren CXCR3-Expression der T_{SCM} und T_{CM} im Alter. Die proliferative Kapazität (fehlende CX3CR1-Expression) der T_{SCM} war altersunabhängig geringer als die naiver T-Zellen (T_{NAIVE}) und höher als die der Effektor-Gedächtnis-Zellen (T_{EM}) und T_{EMRA} . Die Expression von PD-1 stieg mit zunehmendem Differenzierungslevel ($T_{NAIVE} < T_{SCM} < T_{CM} < T_{EM}$) und in höherem Alter an. Es zeigten sich keine Frequenzunterschiede der T_{SCM} innerhalb der PBMC und des Knochenmarks.

Diskussion: Die vorliegende Arbeit zeigt die T_{SCM} als robuste, frühdifferenzierte T-Zell-Population, die numerisch alters- und CMV-IS-unabhängig konstant besteht, auf funktionaler Ebene aber Alterationen aufweist. Von besonderer Relevanz erscheint die geringere Expression von CXCR3 im Alter bei Vorliegen eines positiven CMV-IS, welche auf eine verminderte Migrationsfähigkeit der T_{SCM} in entzündliche Areale hindeuten und eine Ursache der reduzierten Immunabwehr im höheren Alter darstellen könnte. Die vorliegenden Daten können als Basiswerte dienen um in folgenden Studien (z.B. bei Immunsuppression), die veränderte Funktionalität der T_{SCM} zu beurteilen.

2. Abstract

Introduction: T stem cell memory cells (T_{SCM}) represent a crucial pillar of the sustainable immune defense due to their longevity, multipotency and their potential to reconstitute different t-cell populations. Therefore, T_{SCM} seem of great clinical relevance in the context of acute and chronic infections as well as adoptive T cell therapy. However, the influence of biological age and alterations of the immune system on T_{SCM} and their functional properties is unclear. The aim of the present work was a more precise portrayal of T_{SCM} in their absolute and relative frequency and their functionality based on functional markers in a broad age cohort.

Methods: Frequencies and absolute cell numbers of T cells of diverse differentiation subtypes within peripheral blood were determined by flow cytometry from 60 donors in a broad age cohort. Within the subtypes, the expression of activation and proliferation markers was recorded as a function of age and human cytomegalovirus-infection status (CMV-IS). For this purpose, the expression of PD-1 as a marker of persistent T cell activation with an increased sensitivity for checkpoint activation, CXCR3 as a receptor for T cell migration towards inflammatory areas, and CX3CR1 as a marker of effector vs. proliferative function were examined. The effect of the CMV-IS was determined by assessing the intracellular co-expression of T cell effector mediators after CMV-derived peptide stimulation. Finally paired blood and bone marrow samples from 4 donors were analyzed for absolute and relative T cell counts.

Results: Constant frequencies and absolute T cell counts of T_{SCM} were recorded irrespective of age and CMV-IS. Functional analysis revealed the highest effector polyfunctionality and migration potential (CXCR3) for early-differentiated T cell subtypes (T_{SCM} and central memory T cells: T_{CM}). A positive CMV-IS resulted in decreased expression of CXCR3 within T_{SCM} and T_{CM} with age. The proliferative capacity (missing CX3CR1 expression) of T_{SCM} was lower than naïve T cells (T_{NAIVE}) but higher than that of effector memory cells (T_{EM}) and T_{EMRA} , independent of age. PD-1 expression increased significantly with increasing differentiation level ($T_{NAIVE} < T_{SCM} < T_{CM} < T_{EM}$) and increasing age. There were no frequency differences of T_{SCM} within PBMC and bone marrow.

Discussion: The present results establish T_{SCM} as a robust, early-differentiated T cell population that numerically persists consistently independent of age and CMV infection status, but exhibits alterations at the functional level. Of particular relevance is the lower expression of CXCR3 in old age, especially in the presence of a positive CMV-IS, which may indicate a reduced ability of T_{SCM} to migrate to inflammatory areas and may represent a cause of reduced immune defense in older age. The present data may serve as baseline values to assess altered functionality of T_{SCM} in further studies, e.g. regarding immunosuppression.

3. Einleitung

3.1. Das Immunsystem

3.1.1. Grundlagen der T-Zell-Immunität

Das Immunsystem dient der Erhaltung der Integrität entwickelter Lebewesen, d.h. dem Erhalt der Gewebehomöostase bei unterschiedlichen Herausforderungen wie Eindringen von Pathogenen, Gewebetraumata, Tumoren. Dabei spielen T-Lymphozyten eine zentrale Rolle sowohl bei der Induktion, der Exekution als auch der Regulation der adaptiven Immunantwort. Darüber hinaus beeinflussen sie die Stärke der angeborenen Immunität, insbesondere durch die Freisetzung von Zytokinen. Vom Knochenmark migrieren unreife T-Lymphozyten in den Thymus, wo sie eine positive und negative Selektion durchlaufen um als reife, selbsttolerante T-Zellen in die Blutbahn zu gelangen und zwischen peripheren lymphatischen Organen und Blutgefäßen zu zirkulieren.^{1,2} T-Zellen besitzen auf ihrer Oberfläche einen hoch polymorphen T-Zell-Rezeptor (TCR), der in über 90% aus einer α - und einer β - Kette besteht, die in ihrer Struktur den Immunglobulinen ähneln.^{3,4} Die große Vielfalt an TCR-Expressionsvarianten ergibt sich als Folge zufälliger somatischer Rekombination, der Insertion von N- und P-Nukleotiden sowie der unabhängigen Expression von α - und β - Kette.² Von den 10^{15} theoretischen Möglichkeiten umfasst das individuelle menschliche TCR-Repertoire über 100 Millionen unterschiedliche Varianten.⁵ Jeder TCR bindet ein Zielepitop, welches von Oberflächenproteinen des Haupthistokompatibilitätskomplexes (*major histocompatibility complex, MHC*) präsentiert wird. Der MHC umfasst eine Gruppe von Genen, die auf dem kurzen Arm von Chromosom 6 lokalisiert sind und neben der Pathogenerkennung der Unterscheidung zwischen Eigen- und Fremdanitigenen sowie der Detektion maligne entarteter Zellen dienen. Es werden zwei MHC-Klassen unterschieden: MHC-Moleküle der Klasse I befinden sich auf allen kernhaltigen Zellen und dienen insbesondere der Präsentation intrazellulärer Peptide. Sie besitzen eine größere transmembrane α -Kette bestehend aus drei Untereinheiten (α_1 - α_3) sowie eine kleinere nicht-polymorphe β_2 -Mikroglobulin-Kette. Peptide mit einer Länge von 8-12 Aminosäuren, die insbesondere beim Abbau körpereigener, viraler und mutierter

Proteine entstehen, werden von MHC-I Molekülen gebunden. Der Komplex aus MHC-Molekül und Peptid (pMHC I) wird von CD8⁺ T-Zellen erkannt und führt im Fall von viralen oder mutierten Peptiden zur Aktivierung der T-Zelle.² MHC Klasse II Moleküle befinden sich nur auf APCs und bestehen aus zwei transmembranären Ketten (α und β), die sich jeweils aus zwei Untereinheiten ($\alpha 1$, $\alpha 2$ sowie $\beta 1$ und $\beta 2$) zusammensetzen. Sie binden i.d.R. extrazelluläre Peptide mit einer Länge von 15-24 Aminosäuren und werden von CD4⁺ T-Zellen erkannt, die infolgedessen weitere Zellen der Immunabwehr, insbesondere B-Zellen aktivieren. Die Expression von MHC I und II Molekülen wird durch Zytokine, insbesondere Interferon γ , reguliert. Zusätzlich existiert eine große Gruppe „nicht-klassischer“ MHC-Klasse I Moleküle, deren Expression zwischen und innerhalb verschiedener Arten stark variiert und die T-Zellen und NK-Zellen aktivieren und inhibieren können.²

T-Zellen, die noch keinen Peptid/MHC-Komplex (pMHC) gebunden haben, werden als naiv bezeichnet. Das Priming einer naiven T-Zelle durch eine APC erfolgt durch die Bindung des TCR und spezifischem pMHC-Molekül (=Antigenerkennung) sowie das Vorhandensein des CD4⁺- oder CD8⁺-Co-Rezeptors. Des Weiteren sind co-stimulatorische Signale, die für Überleben und Expansion sorgen und Zytokine, die die Differenzierung der T-Zellen regulieren (unter anderem IL-6, IL-12, IL-4) notwendig.² Zu den co-stimulatorischen Signalen zählen insbesondere transmembranäre Moleküle der B7 Familie (CD80/CD86), die an den CD28-Rezeptor der T-Zelle binden und die Proliferation der naiven T-Zelle stimulieren.^{2,6,7} Außerdem können verschiedene Moleküle der TNF-Familie co-stimulatorisch wirken: unter anderem CD137 (4-1BB), welches den Liganden 4-1BBL auf aktivierten APCs bindet, sowie CD154 (CD40Ligand), welches vor allem auf CD4⁺ T-Zellen exprimiert wird und den CD40 Rezeptor auf dendritischen sowie B-Zellen bindet. Für letztere ist CD154 der entscheidende Aktivator der T-Zell-vermittelten B-Zellreifung und fördert die Ausbildung von Keimzentren sowie den Isotopenwechsel.^{2,8}

Die Aktivierung der T-Zellen führt insbesondere zur Produktion von Interleukin 2 (IL-2), einem T-Zell-Wachstumsfaktor, der entscheidend für die Proliferation und Expansion der T-Zellen ist. Innerhalb weniger Tage nach Priming erfolgt die klonale Expansion und Differenzierung der naiven T-Zelle in Effektor- und Gedächtnis-T-

Zellen.^{9,10} Im Falle eines erneuten Antigen-Kontakt genügt zur Aktivierung von Gedächtniszellen die Bindung zwischen TCR und spezifischem pMHC ohne das Vorhandensein co-stimulatorischer Signale.² Nach erfolgreich bekämpfter Infektion (*Clearance*) sterben bis zu 95% der Effektor T-Zellen ab¹¹; ein kleiner Teil bleibt bestehen und zirkuliert über Jahrzehnte, möglicherweise lebenslang in peripheren Geweben.^{12,13}

3.1.2. Subpopulationen und immunologisches T- Zell- Gedächtnis

Im folgenden Abschnitt werden Grundlagen zur Zusammensetzung des CD8⁺ T-Zell-Gedächtnisses dargestellt. Grundsätzlich lassen sich *Central Memory* T-Zellen (T_{CM}) von *Effektor Memory* T-Zellen (T_{EM}) unterscheiden. T_{CM} können in sekundär lymphatische Gewebe migrieren und nach Antigenkontakt IL-2 produzieren. Sie aktivieren dendritische Zellen, CD4⁺ T-Zellen und B-Zellen, haben ein hohes proliferatives Potential und können in T_{EM} differenzieren¹²; besitzen aber keine direkten Effektorfunktionen.¹⁴ T_{EM} können hingegen mithilfe von Chemokinrezeptoren in infizierte Gewebe migrieren und über gespeicherte Perforin-Granula zytotoxische Effektorfunktionen ausüben. Sie sind in der Lage Pathogene direkt zu eliminieren.¹⁴ Des Weiteren produzieren T_{EM} die Zytokine Interferon γ (IFN γ) und Tumor-Nekrose-Faktor α (TNF α)^{12,14,15}, die zur Aktivierung verschiedener Immunzellen sowie zur Eliminierung der Pathogene beitragen.^{2,16} T_{EM} besitzen nur ein geringes Proliferationspotential, kürzere Telomere als T_{CM} und können nicht in T_{CM} differenzieren.¹² Neben den T_{EM} und T_{CM} existieren insbesondere innerhalb der CD8⁺ T-Zellen sogenannte terminal ausdifferenzierte Effektorzellen (T_{EMRA}), die wie T_{EM} zu Orten von Infektionen migrieren und nach Antigenkontakt unmittelbar zytotoxisch agieren. T_{EMRA} besitzen die größten Mengen an Perforin und sind insbesondere für die Kontrolle viraler Infektionen entscheidend¹⁷, haben aber nur geringe bis gar keine Proliferationsfähigkeiten.¹² CD4⁺ T_{EMRA} wurden vor allem im Rahmen von Virusinfektionen wie CMV und Dengue-Virus nachgewiesen und zeigen ausgeprägte interindividuelle Frequenzschwankungen innerhalb des T-Zell-Pools.¹⁷

Eine weitere, zahlenmässig sehr kleine Subpopulation (*Subset*), welches erst seit wenigen Jahren beim Menschen beschrieben ist, sind die T-Stammzell-

Gedächtniszellen (T_{SCM}).¹⁸ Sie besitzen Selbsterneuerungs- und Proliferationsfähigkeiten und sekretieren insbesondere IL-2, aber auch IFN γ und TNF α . Sie werden als Grundpfeiler des T-Zell-Gedächtnisses angesehen. Aufgrund dieser Eigenschaften sind T_{SCM} im Rahmen der adoptiven T-Zell-Therapien von besonderem Interesse.¹⁹⁻²¹ Im nachfolgenden Kapitel wird der aktuelle Forschungsstand zu den T_{SCM} aufgezeigt.

Zusammenfassend unterscheidet man zwischen Gedächtnis-T-Zellen mit vorrangig proliferativen Eigenschaften (T_{SCM}/T_{CM}) und solchen mit zytotoxischen Eigenschaften (T_{EM}/T_{EMRA}). Zusammen ermöglichen sie eine schnelle und zielgerichtete Immunantwort auf bekannte Antigene. Hinsichtlich der Abstammungslinie (*Lineage*) der Gedächtniszellen wird eine linear hierarchische Entwicklung angenommen, bei der mit steigendem Differenzierungsgrad die proliferativen Eigenschaften ab- und die zytotoxischen Eigenschaften zunehmen (siehe Abb. 1).^{22,23,21} In Studien, die Patienten nach hämatopoetischer Stammzelltransplantation (HSZT) untersuchten, konnte gezeigt werden, dass T_{SCM} kurze Zeit nach dem *Priming* direkt aus naiven T-Zellen entstehen^{24,25}, und dass nur naive T-Zellen und T_{SCM} fähig waren, den gesamten Gedächtnis-Zellpool (T_{SCM} , T_{CM} und T_{EM}) wiederherzustellen. Sobald T-Zellen in T_{CM} oder T_{EM} differenziert waren, konnte sich nur ein sehr kleiner Teil von diesen in T_{SCM} entwickeln.^{25,26} Die T_{SCM} stellen in diesem Modell das am wenigsten differenzierte T-Zell *Subset* dar, (welches über Selbsterneuerungspotenzial verfügt und insbesondere CXCR3 und nach spezifischer Stimulation IL-2 exprimiert).^{22,26}

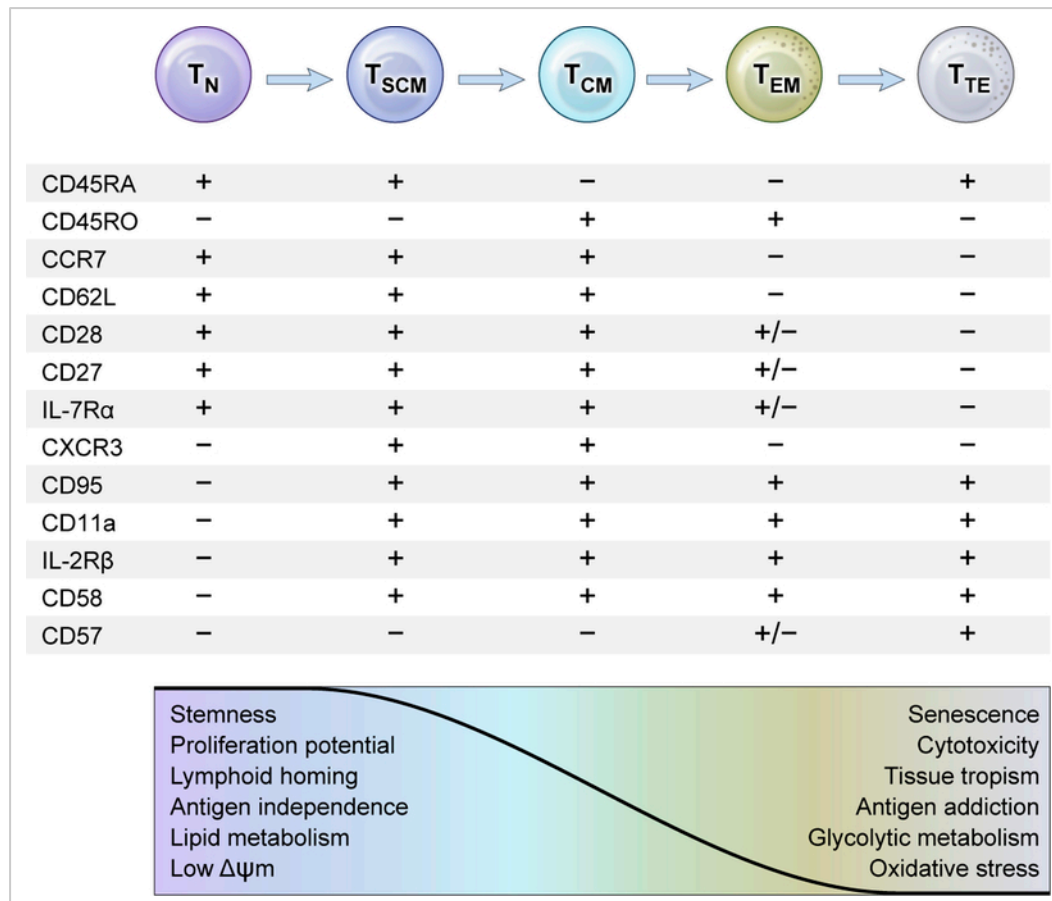


Abbildung 1. Hierarchisches Differenzierungsmodell von T-Zellen nach Gattinoni et al. (2017). T-Zellen exprimieren abhängig von ihrem Differenzierungsgrad verschiedene Oberflächenmarker und lassen sich anhand dieser unterscheiden. Naive T-Zellen und T_{SCM} besitzen proliferatives Potential und Stammzeleigenschaften, mit zunehmender Ausdifferenzierung verlieren T-Zellen diese Fähigkeiten und erlangen zytotoxische Funktionen und prägen teils Senescence-Marker (z.B. CD57) aus.

3.1.3. T-Stammzell-Gedächtniszellen (T_{SCM})

Im Jahr 2012 wurden T_{SCM} erstmals in humanem Blut als distinktes T-Zell Subset beschrieben, welches als am geringsten differenzierte Population einzuordnen ist und sowohl Eigenschaften der T_{NAIVE} als auch der T_{CM} besitzt.¹⁸ T_{SCM} verfügen über Selbsterneuerungspotential, können in alle anderen Gedächtnis-Subsets differenzieren^{21,26-28} und produzieren bei Antigenkontakt Zytokine wie IL-2, TNF α und IFN γ , wobei der Anteil zytokin-produzierender Zellen innerhalb der T_{SCM} geringer ist im Vergleich zu differenzierteren Subsets.^{19,28} T_{SCM} machen sowohl innerhalb des CD4⁺ als auch CD8⁺ Kompartiments mit etwa 2-4% einen kleinen Teil des Gedächtnis-T-Zell-Pools aus, stellen aber aufgrund ihrer Langlebigkeit, ihrer Stammzeleigenschaften und der damit einhergehenden Fähigkeit zur

Immunrekonstitution eine äußerst wichtige Säule der Immunabwehr dar.^{21,29} Verschiedene Studien, die unter anderem T_{SCM} nach Gelbfieber-Impfung und nach Therapiestart mit antiretroviraler Therapie (ART) in Patienten mit Humanem Immundefizienz-Virus 1 (HIV-1) untersuchten, zeigten, dass T_{SCM} jahrzehntelang im Körper überdauern³⁰⁻³², dabei das Selbsterneuerungspotential beibehalten und essenziell für die Rekonstitution des T-Gedächtnis-Pools sind.³² Costa del Amo et al. (2018) fanden kinetische Unterschiede innerhalb der T_{SCM}, mit Zellen, die eine kurze Halbwertszeit (HWZ) von etwa 5 Monate aufwiesen im Gegensatz zu langlebigen Zellen mit einer HWZ von 9 Jahren. Diese Subpopulation der T_{SCM} zeichnete sich durch ein hohes Selbsterneuerungspotential aus.³³ Ursächlich für das langfristige Fortbestehen der T_{SCM} wird eine fortlaufende Proliferation angenommen, die sich unter anderem in hohen Levels sowohl des Proliferationsmarkers Ki-67 als auch der aktiven Telomerase zeigte.³⁴ Als sogenanntes Rückgrat des Immunsystems spielen T_{SCM} insbesondere im Kontext akuter und chronischer Infektionen sowie in Zeiten temporärer oder permanenter Immunsuppression eine entscheidende Rolle.²¹ Verschiedene Studien zu viralen und parasitären Infektionen fanden beispielsweise inverse Korrelationen zwischen Viruslast und Schweregrad des Krankheitsverlaufs und der Frequenz von T_{SCM}.³⁵⁻³⁷ Insbesondere für die Entwicklung neuer Therapien im Bereich der adoptiven T-Zell-Therapie, Autoimmun- und Tumorerkrankungen können T_{SCM} ein relevantes *Target darstellen*.^{19,21} Dennoch können T_{SCM} insbesondere im Hinblick auf Erkrankungen, die mit unkontrolliert wachsenden oder autoreaktiven T-Zellen einhergehen, auch pathogenes Potential bergen.^{38,39} Darüberhinaus scheinen CD4⁺ T_{SCM} aufgrund ihrer Langlebigkeit ein Reservoir für das HIV-1-Virus darzustellen und das latente Überdauern des Virus unter ART zu ermöglichen.⁴⁰ Aufgrund der noch relativ jungen Geschichte der T_{SCM}, der Komplexität der T-Zell-Immunität und der klinischen Relevanz ist es von großem Interesse, dieses Subset genauer zu charakterisieren und im Vergleich zu den anderen Gedächtnis-Subpopulationen zu untersuchen. Phänotypisch lassen sich T_{SCM} anhand verschiedener Marker charakterisieren: unter anderen CD45RA⁺, CD45RO⁻, CCR7⁺, CXCR3⁺, CD95⁺ und IL-2Rβ.^{18,19,29} In der vorliegenden Arbeit sollen T_{SCM} zusätzlich anhand der Expression von CX₃CR₁ und PD-1 genauer typisiert werden, um

Rückschlüsse auf das zytotoxische vs. proliferative Potential sowie den Erschöpfungsgrad zu ziehen (Einzelheiten siehe Kapitel 1.5.1.).

Von besonderem Interesse ist darüber hinaus der Einfluss des biologischen Alters auf die T_{SCM} . Hinsichtlich der anderen T-Zell-Subsets sind altersbezogene Veränderungen beschrieben, die im folgenden Kapitel aufgezeigt werden.⁴¹⁻⁴³ Geht man von der Annahme aus, dass der Organismus mit zunehmendem Alter einer steigenden Anzahl von Antigenen ausgesetzt ist, könnte durch Priming und Ausdifferenzierung naiver T-Zellen ein wachsender T_{SCM} Pool resultieren. Bislang existieren hinsichtlich der T_{SCM} nur wenige Daten. Diese deuten aber darauf hin, dass sich der T_{SCM} -Pool über das Alter konstant verhält.^{44,45} Da mit zunehmendem Alter die Inzidenz verschiedenster Erkrankungen ansteigt, erscheint es sinnvoll, die T_{SCM} in einem breiten Altersrange hinsichtlich der relativen und absoluten Anzahl sowie ihrer Funktionalität zu beschreiben. Darauf aufbauend können Rückschlüsse auf mögliche Pathogenität und gleichzeitige Therapieoptionen geschlossen werden.

Im folgenden Abschnitt wird der aktuelle Forschungsstand zu Alterseffekten auf die anderen T-Zell-Subpopulationen aufgezeigt.

3.1.4. Einflüsse des biologischen Alters auf die Zusammensetzung des T-Zell-Pools

3.1.5.1. Der alternde Mensch

Alterungsprozesse zeichnen sich durch zelluläre und molekulare Veränderungen aus. Zu diesen zählen unter anderem Genominstabilitäten, epigenetische Veränderungen, DNA-Schäden, mitochondriale Dysfunktionen und einer verminderte Homöostase- und Regenerationsfähigkeit von Geweben und Organen, die unter anderem auf die *Exhaustion* von Stammzellen zurückzuführen ist.⁴⁶ Auch das Immunsystem weist altersbezogene Veränderungen auf, die sich unter anderem in einer veränderten Zusammensetzung und Funktionalität des T-Zell-Pools zeigen.^{42,45,47,48} Insbesondere die Ausbildung einer antigenspezifischen Immunantwort scheint mit zunehmendem Alter vermindert.⁴⁹ Aus klinischer Sicht resultieren eine erhöhte infektionsbedingte Morbidität und Mortalität⁴⁷, die sich unter anderem aus einer erhöhten Vulnerabilität gegenüber neuen und latenten Infektionen, einem

steigenden Risiko für langwierige und komplikationsreiche Krankheitsverläufe sowie verminderten Impferfolgen ergeben.^{42,50,51}

Die immunologischen Veränderungen und damit einhergehenden klinischen Aspekte werden häufig als Immunoseneszenz bezeichnet.^{49,52} Auf zellulärer Ebene beschreibt Seneszenz einen Zustand irreversiblen Wachstumsstopps und limitierter Lebenszeit, aufgrund verschiedener Stressoren (u.a. Telomer-Verkürzung, DNA-Schäden).⁵¹ Senescente Zellen zeichnen sich meist durch eine Zell-Vergrößerung, erhöhte lysosomale Aktivität und einen sekretorischen Phänotyp aus.⁵¹ Zwei weitere Aktivitätszustände, die im Rahmen von Zellalterung vorkommen, sind *Quiescence* und *Exhaustion*. *Quiescente* Zellen weisen eine ausbleibende Zellteilungsaktivität, einen niedrigen Stoffwechsel und eine verminderte Proteinbiosynthese auf. Werden sie jedoch durch das passende Signal (re)stimuliert, können sie erneut in einen aktivierten Zustand übergehen.⁵¹ *Exhaustion* bezeichnet den Zustand von T-Zellen, die sich funktional und transkriptionell von Effektor- oder Gedächtnis-T-Zellen unterscheiden, vermehrt inhibitorische Rezeptoren exprimieren und vermindert Zytokine sekretieren. Dieser dysfunktionale Zustand tritt insbesondere im Rahmen chronischer Infektionen oder Neoplasien auf.⁵³ Eine Dysregulation der drei Aktivitätszustände kann zu einer verminderten T-Zell Homöostase führen und in einer verminderten Anzahl funktionaler T-Zellen resultieren. Im folgenden Abschnitt werden aktuelle Erkenntnisse zur Regulation des naiven T-Zell-Pools sowie Alterseinflüssen auf den naiven und Gedächtnis-T-Zell-Pool dargestellt.

3.1.5.2. Homöostase naiver T-Zellen

Naive T-Lymphozyten und deren Proliferation und Ausdifferenzierung in T-Effektorzellen sind für die Erkennung neuer Antigene und die effiziente Eliminierung der Pathogene unerlässlich. Wie in Abschnitt 1.2. beschrieben, wandern unreife T-Zellen aus dem Knochenmark in den Thymus, von wo aus sie nach erfolgreicher Reifung als T_{NAIVE} in die Peripherie migrieren. Die Thymusaktivität und sein Volumen sind zum Zeitpunkt der Geburt am größten und bilden sich ab der Pubertät physiologisch zurück (Thymusinvolution)⁴⁹, woraus eine stetige Verminderung der Produktion naiver T-Zellen von etwa 15-16% bei Kindern bis unter 1% bei älteren

Menschen resultiert.^{42,54,55} Der Großteil der T-Zellen (etwa 85%) entstammt schon in jungen Jahren nicht dem Thymus, sondern der peripheren T-Zell-Proliferation, die mit zunehmendem Alter auf bis zu 99% ansteigt und dabei die Diversität des T-Zell-Pools weitestgehend aufrecht erhält.⁵¹ Während dieser Mechanismus die Anzahl der naiven CD4⁺-T-Zellen hinreichend bewahrt, zeigt sich hinsichtlich der naiven CD8⁺-T-Zellen ein relevanter Verlust.^{42,43,45,48,51,56} Eine geringere Rate an altersbezogenen epigenetischen Abweichungen und eine höhere Affinität zu IL-2 erklären möglicherweise die höhere Resilienz der CD4⁺ T-Zellen.⁵¹ Zur Aufrechterhaltung der Homöostase benötigen T-Zellen die Präsentation von Eigen-Antigen durch MHC-1-Moleküle sowie IL-7, das von fibroblastischen Retikulumzellen in sekundär lymphatischen Organen produziert wird.⁴² Strukturelle Veränderungen und der Verlust des IL-7-Rezeptors können zu einer verminderten Homöostase führen.⁵⁷ Darüberhinaus werden eine übermäßige Ausdifferenzierung in Effektorzellen sowie Störungen der klonalen Expansion als Ursache des verminderten homöostatischen Potentials naiver CD8⁺ T-Zellen angenommen.⁵¹ Zusammenfassend wird insbesondere innerhalb der CD8⁺ T-Zellen eine Abnahme naiver T-Zellen beobachtet, die hauptsächlich auf eine verminderte Homöostase-Aktivität zurückzuführen ist. Dabei scheint die Diversität des TCR kaum durch den Rückgang der T_{NAIVE} beeinträchtigt zu sein.⁵¹ So konnte in Computersimulationen selbst bei einer Abnahme des naiven Pools um >50% keine relevante Verringerung der TCR-Diversität beobachtet werden.⁵⁸ Ursächlich könnte die *Clon*-Größe humaner TCR-*Excision Circles* von etwa 100 sein, die das Verschwinden einzelner *Clone* unwahrscheinlich macht.⁵⁹

3.1.5.3. Alterndes T-Zell-Gedächtnis

Die Aufrechterhaltung des Gedächtnis-T-Zell-Pools ist notwendig um auch mit zunehmendem Alter eine effiziente Abwehr neuer und bekannter Antigene zu gewährleisten. Sie erfolgt durch das langfristige Überleben einzelner T-Gedächtnis-Zellen sowie die homöostatische T-Zell-Proliferation.^{51,60,61} Neben IL-7, welches für das Überleben naiver und Gedächtnis-T-Zellen notwendig ist, ist IL-15 insbesondere für die homöostatische Proliferation der Gedächtnis-T-Zellen erforderlich.^{42,62} Der

homöostatische Kreislauf verläuft bei letzteren drei- bis viermal schneller als bei naiven T-Zellen. Insgesamt zeigt sich mit zunehmendem Alter eine erhöhte Anzahl an Memory-T-Zellen (T_{CM}/T_{EM}) insbesondere innerhalb der $CD8^+$ T-Zell-Population.^{41,42} Der genaue Mechanismus ist nicht vollständig verstanden. Unter anderem werden Hypothesen zur Akkumulierung antigen-spezifischer Gedächtnis-Zellen im Laufe des Lebens als auch die Generierung sogenannter virtueller (antigen-unspezifischer) Gedächtnis-Zellen postuliert.^{42,63} T_{CM} und T_{EM} scheinen ihre Funktionalität im Alter beizubehalten, wobei T_{CM} zunehmend ein Effektor-Profil zeigen.⁵¹ Insbesondere die $CD8^+$ T_{EMRA} -Population ist mit dem biologischen Alter korreliert, zeigt nur geringe Proliferationsfähigkeiten und scheint eine dysfunktionale Zytokinproduktion aufzuweisen.⁴¹ Sie besitzen sowohl Merkmale von Zell-Seneszenz (verkürzte Telomere und DNA-Schäden)⁶⁴ als auch Exhaustion (v.a. Stillstand des Zellzyklus), unterscheiden sich aber insbesondere hinsichtlich der ausgeprägten Effektorfunktionen, der Reversibilität des Zellzyklusarrests und der Expression verschiedener regulatorischer Oberflächenproteine von beiden Zuständen.⁵¹ Vor allem im Rahmen chronischer Infektionen oder Reaktivierung latenter Virusinfektionen kommt es durch wiederkehrenden Antigenkontakt zu einer oligoklonalen Akkumulierung von antigen-spezifischen $CD8^+$ T_{EMRA} .⁶⁵ Dieses Phänomen ist insbesondere für das humane Cytomegalievirus (CMV) vielfach beschrieben und wird als *Memory Inflation* bezeichnet.^{64,66-68} CMV-spezifische $CD8^+$ Memory T-Zellen können dabei bis zu 10-20% des gesamten Gedächtnis-T-Zell-Pools ausmachen.^{65,69}

Insgesamt zeigt sich mit zunehmendem Alter im peripheren Blut ein veränderter T-Zell-Pool hinzu einer verringerten Anzahl naiver T-Zellen und einer Zunahme von Gedächtnis-T-Zellen. Im Rahmen einer CMV-Infektion besteht der T-Zell-Pool zunehmend aus (terminal differenzierten) Effektor-Zellen und weniger aus T_{CM} . Aufgrund der Relevanz der CMV-Infektion auf das T-Zell-Gedächtnis sowohl im gesunden Probanden als auch insbesondere im immunsupprimierten Patienten werden in Kapitel 3.2 die Charakteristik, Klinik und der aktuelle Forschungsstand zur T-Zell-Antwort auf CMV aufgezeigt. Zuvor wird im folgenden Abschnitt kurz das

Knochenmark als Nische für CD4⁺ und CD8⁺ Gedächtnis-T-Zellen präsentiert, da es entscheidend an der Aufrechterhaltung des Gedächtnis-T-Zell-Pools beteiligt ist.⁶⁰

3.1.5. *Das Knochenmark als Nische für Gedächtnis-T-Zellen*

Die im peripheren Blut gemessene Anzahl an Gedächtnis-T-Zellen stellt lediglich einen Teil der Gesamtheit des T-Zell-Gedächtnisses dar. Der überwiegende Anteil zirkuliert zwischen Blutgefäßen und lymphatischen sowie peripheren Geweben.^{61,70,71}

Ein solches Gewebe stellt das Knochenmark dar. Insgesamt machen T-Zellen etwa 3 - 8 % der kernhaltigen Zellen des Knochenmarks aus. Dabei ist der Anteil CD8⁺ im Verhältnis zu CD4⁺ T-Zellen im Vergleich zu peripherem Blut erhöht.⁶¹

Neben seiner Funktion als primäres lymphatisches Organ fungiert es als Nische für Gedächtnis-T-Zellen und ist für das langfristige Überdauern und die homöostatische Proliferation von großer Bedeutung.^{60,72,73} Es scheint ein Ort für die Stimulation von Gedächtnis-T-Zellen und das initiale Priming von naiven T-Zellen durch dendritische Zellen zu sein.⁷⁴ In Mausexperimenten konnte demonstriert werden, dass die Anzahl proliferierender Gedächtnis-T-Zellen im Knochenmark größer war als in Milz oder Lymphknoten.⁷⁵ Letsch et al. fanden erhöhte Frequenzen von CMV-spezifischen T_{CM} im Knochenmark im Vergleich zum peripheren Blut. Die absolute Anzahl an T_{CM} unterschied sich dabei nicht zwischen Knochenmark und peripherem Blut, was als Hinweis gedeutet wurde, dass kürzlich aktivierte oder reaktivierte T_{CM} ins Knochenmark migrieren und expandieren.⁷⁶ Neben den T_{CM} konnten auch polyfunktionale T_{EM} im Knochenmark sowohl gesunder Spender als auch Patienten mit Arthritiden identifiziert werden.⁷⁷

Zusammenfassend scheint das Knochenmark ein entscheidender Ort für die Proliferation von Gedächtnis-T-Zellen zu sein. Die T_{SCM} machen einen kleinen Anteil der im peripheren Blut gemessenen T-Zellen aus. Bislang existieren keine Daten zu Frequenzen von T_{SCM} im Knochenmark.

3.2. Das humane Cytomegalievirus (CMV)

3.2.1. Charakteristik und Pathophysiologie

Das humane Cytomegalievirus (CMV), auch Herpes-Virus 5, gehört zur Familie der Herpesviridae und weist mit über 230.000 Basenpaaren eines der größten Genome unter den Herpes-Viren auf.^{78,79} Die doppelsträngige DNA ist von einem icosaedrischen Kapsid umschlossen, um welches sich eine Proteinschicht (Tegument) anlagert.⁸⁰ Eine Phospholipidmembran mit membranständigen Glykoproteinen bildet die Virushülle. Die Infektion erfolgt über Körperflüssigkeiten sowie im Rahmen von Transplantationen und Transfusionen. Zudem ist die vertikale Infektion diaplazentar, perinatal sowie postnatal über die Muttermilch möglich.⁸¹ CMV infiziert eine Vielzahl unterschiedlicher Zellen wie Drüsen- und Schleimhautepithel, glatten Muskelzellen, Fibroblasten, dendritischen Zellen und Makrophagen und repliziert in diesen.⁸² Nach Infektion erfolgt der Transport der Virus-DNA in den Zellkern, wo die Replikation innerhalb von etwa 24 Stunden abläuft.^{83,84} Die DNA-Synthese folgt einem spezifischen Zyklus: In der *immediate early* Phase werden insbesondere die Phospholipide IE-1 und IE-2 exprimiert und in der Spätphase unter anderem das Tegument-Protein pp65 synthetisiert. Anschließend erfolgt die Virusfreisetzung und es können Blutbildveränderungen wie Zytomegalie sowie intranukleäre Einschlusskörperchen auftreten. Die lytische Primärinfektion mit CMV führt zu vielfältigen Abwehrreaktionen des angeborenen und adaptiven Immunsystems. Dennoch kodiert CMV für verschiedenste Moleküle und Mechanismen zur Immunevasion (bspw. gehemmte Antigenpräsentation zu T-Zellen, Störung der MHC-Präsentation oder verminderte Proteinexpression), sodass es einer vollständigen Eliminierung entgeht und lebenslang im Körper persistiert.^{80,85-87} Trotz periodischer Reaktivierung und wiederkehrender Exposition zu CMV kann der immunkompetente Organismus die Virusinfektion kontrollieren.

3.2.2. Epidemiologie

CMV ist weltweit verbreitet, mit Seroprävalenzen von 45-100% in der Allgemeinbevölkerung, abhängig unter anderem von der geographischen Lage, dem sozioökonomischen Status und dem Alter.⁸⁸ In Industrienationen liegt die

Infektionsrate bei etwa 60%, in Entwicklungsländern bei bis zu 100%.^{86,89,90} Eine Primärinfektion in der Schwangerschaft ist die häufigste Ursache einer konnatalen CMV-Infektion des Kindes. Mit einer Inzidenz von 0,6-0,7% stellt sie die häufigste konnatale Infektion aller Lebendgeburten weltweit dar.^{91,92} Der Mensch ist als einziger Wirt des humanen CMV bekannt, obwohl es Homologe für andere Spezies gibt.⁸⁵

3.2.3. *Klinisches Bild*

Sowohl die Primärinfektion mit CMV als auch spätere Reaktivierungen verlaufen bei immunkompetenten Personen i.d.R. inapparent. In etwa 10% der Infektionen können mononukloseähnliche Symptome auftreten.^{90,93} Im Rahmen einer Immunsuppression (z.B. Patienten nach Solid-Organ-Transplantation, Stammzelltransplantation und AIDS) kann CMV zu einer opportunistischen Infektion führen und ein CMV-Syndrom sowie Endorganschädigungen verursachen. Häufige Manifestationen sind die CMV-Pneumonie, -Retinitis, -Hepatitis und -Colitis sowie Blutbildveränderungen bis hin zur Panzytopenie.^{83,94} Infolge einer konnatalen CMV-Infektion können neben unmittelbaren Symptomen (u.a. Hydrocephalus, Frühgeburtlichkeit, Chorioretinitis) Spätfolgen wie Hörverlust, kognitive und neurologische Störungen auftreten.⁹² Mit zunehmendem Alter scheint ein positiver CMV-Status auch bei gesunden Personen mit einer erhöhten Morbidität und Mortalität zu korrelieren.^{95,96}

3.2.4. *T-Zell-Reaktionen auf CMV*

Aufgrund der klinischen und epidemiologischen Relevanz wurde das humane und murine CMV in einer Vielzahl von Studien hinsichtlich der angeborenen und adaptiven Immunreaktionen untersucht.^{68,97-101} Die T-Zell-vermittelte Immunantwort hat sich als die wichtigste Kontrollinstanz der CMV-Infektion herausgestellt^{65,82} und weist im Vergleich zu anderen Gedächtnis-Zellen phänotypische und funktionelle Besonderheiten auf. Postinfektionär kommt es zunächst zu einer starken Expansion CMV-spezifischer CD8⁺ T-Zellen^{100,102}, die nach abgelaufener Primärinfektion bestehen bleiben und mit zunehmendem Alter ansteigen können.^{68,103,104} Doch auch im Blut CMV⁺ Kleinkinder konnten bereits ausgeprägte CD8⁺ T-Zell-Reaktionen

gezeigt werden, die über die Kindheit bestehen blieben¹⁰² und einer rein linearen Funktion zwischen Alter und T-Zell-Expansion widersprechen.^{66,98} Das Phänomen der *Memory Inflation* wurde zuerst im Mausmodell und später ebenfalls für das humane CMV beschrieben und bezeichnet die Expansion und das langfristige Überleben CMV-spezifischer CD8⁺ T-Zellen.^{64,66,105} Diese Zellen zeichnen sich durch einen spezifischen spät-differenzierten Phänotypen aus, der am ehesten CD8⁺ T_{EMRA} entspricht⁶⁸ : im Gegensatz zu anderen chronischen Virusinfektionen (z.B. EBV und HSV), bei denen insbesondere CD8⁺ CD45RO⁺ T-Zellen akkumulieren¹⁰⁶⁻¹⁰⁹, re-exprimieren CMV-spezifische CD8⁺-T-Zellen CD45RA^{42,51,64,68} und sind negativ oder nur schwach positiv für die co-stimulatorischen Rezeptoren CD27 und CD28. Zudem deutet die Expression der zytotoxischen Moleküle Perforin und Granzym B sowie des Chemokinrezeptors CX₃CR₁ auf ausgeprägte Effektorfunktionen hin.¹¹⁰ Des Weiteren produzieren CMV-spezifische T_{EMRA} nach Stimulation IFN γ und TNF α , aber nur in geringen Mengen IL-2.¹¹¹ Dabei zeigen sie keine Anzeichen von T-Zell-Exhaustion.⁶⁶ Unter anderem ist PD-1 als klassischer Marker für T-Zell-Exhaustion auf CMV-spezifischen T_{EMRA} niedriger exprimiert als auf anderen virusspezifischen T-Zellen.^{112,113} Die Expansion der CMV-spezifischen CD8⁺ T-Zellen scheint eine Folge wiederholter Reaktivierung zu sein¹¹⁴, in deren Folge möglicherweise T_{CM} restimuliert werden und in Effektorzellen ausdifferenzieren.⁶⁷ Wie und wo diese Restimulation genau abläuft, ist nicht abschließend geklärt⁶⁶. Infizierte Zellen nicht-hämatopoetischen Ursprungs werden als ursächlich für die Ausdifferenzierung der T-Zellen angenommen und könnten in sekundär-lymphatischen Organen oder im Gefäßsystem zur Restimulation führen.⁶⁷ Die *klonale Diversität* der CMV-spezifischen CD8⁺ T-Zellen nimmt mit der Zeit ab und resultiert in einem oligoklonalen Repertoire.^{115,116} Hinsichtlich der CD4⁺ T-Zellen zeigen sich weniger starke Reaktionen auf CMV. Mit zunehmendem biologischem Alter wächst aber auch in dieser Zell-Population die Anzahl CMV-spezifischer spätdifferenzierter Effektor-T-Zellen.¹¹⁷ Ob die stark expandierten CMV-spezifischen T-Zell-Populationen notwendig sind um die Viruslatenz zu garantieren, ist bislang ungeklärt. Im Maus-Modell konnte gezeigt werden, dass eine Reaktivierung des MCMV durch CD4⁺ und CD8⁺ sowie Antikörper und NK-Zellen suffizient verhindert wird.¹¹⁸ Auch bei immunsupprimierten Patienten nach Solid-

Organtransplantation haben CMV-spezifische CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen eine schützende Wirkung vor einer CMV-Reaktivierung.¹¹⁹

Neben der protektiven Wirkung kann die oligoklonale Expansion der CMV-spezifischen CD8⁺ T_{EMRA} eine Verdrängung der anderen T-Zell-Subsets bedingen, was insbesondere im höheren Alter mit einer verminderten Immunkompetenz gegenüber „neuen“ Infektionen und einem gesteigerten Mortalitätsrisiko assoziiert ist.^{41,68,120-122}

3.2.5. CMV im immunkompromittierten Patienten

Im Rahmen krankheitsbedingter oder therapeutischer Immunsuppression kann CMV reaktivieren und als opportunistische Infektion klinisch apparent werden. Nach allogener Stammzelltransplantation (HSCT) und Solid-Organ-Transplantation stellt CMV die größte infektiöse Komplikation dar und erhöht das Risiko therapiebedingter Sterblichkeit.¹²³⁻¹²⁵ Über 50% der organtransplantierten Patienten zeigen Zeichen einer CMV-Infektion, wobei das Ausmaß der Symptomatik vom Serostatus des Donors und Empfängers abhängt. Das höchste Risiko einer schweren CMV-Infektion ergibt sich für die Kombination aus seronegativem Empfänger und seropositivem Spender, da dies in der Primärinfektion des Empfängers resultieren kann. Im Gegensatz dazu ergibt sich nach HSCT das größte Risiko einer symptomatischen CMV-Infektion aufgrund einer Reaktivierung für seropositive Patienten.¹²⁵ Ein entscheidender Grund für die CMV-Infektion bzw. Reaktivierung ist das Fehlen einer CMV-spezifischen CD8⁺ zytotoxischen T-Zell-Antwort. 50 % der Patienten nach HSCT zeigen 40 Tage nach Transplantation ein Defizit an spezifischen CD8⁺ zytotoxischen Effektor-Zellen, was wiederum den größten Risikofaktor für das Ausbilden einer CMV-Pneumonie darstellt. Die Rekonstitution der CD4⁺ - und CD8⁺ T-Zell-Population ist mit einer protektiven Wirkung gegenüber CMV assoziiert.^{126,127}

Antivirale Medikamente wie Ganciclovir, Valganciclovir oder Letemovir werden prophylaktisch und therapeutisch eingesetzt, zeigen aber insbesondere langfristig häufig keinen zufriedenstellenden Erfolg, weisen ein relevantes Nebenwirkungsprofil auf und bergen das Risiko der Resistenzbildung.^{128,129} Eine Möglichkeit die schützende T-Zellimmunität wiederherzustellen besteht in der adoptiven T-Zell-Therapie. Erstmals 1992 wurde der erfolgreiche Transfer ex vivo expandierter CMV-

spezifischer T-Zell-Klone eines gesunden Spenders in einen immunsupprimierten Patienten beschrieben, der in einer langfristigen Wiederherstellung der CMV-spezifischen Immunität resultierte.¹²⁷ Seither hat sich die adoptive T-Zell-Therapie als Therapieoption von Infektionen im Rahmen von Immunsuppression etabliert.¹³⁰ Um den langfristigen Erhalt der virus-spezifischen Immunität zu optimieren, erscheint die Transfusion fröhendifferenzierter T-Zellen mit Selbsterneuerungspotential und der Fähigkeit zur Differenzierung in Effektor-T-Zellen sinnvoll.¹⁹ Die zuvor beschriebenen CD8⁺ T_{SCM} könnten in dieser Hinsicht eine ideale Population darstellen.

3.3. Etablierung eines FACS-Panels

Die Durchflusszytometrie ermöglicht die Charakterisierung einzelner T-Zellen mithilfe von fluoreszenzgekoppelten Antikörpern. Ein *Panel* bezeichnet dabei die Kombination von Antikörpern, die anhand der Fragestellungen ausgewählt werden. In der vorliegenden Arbeit wurden zur Differenzierung und Charakterisierung der T-Zell-Subsets (Phänotypisierung) klassische Oberflächenmarker wie CCR7, CD45RA/RO und CD95 sowie Aktivierungsmarker wie CXCR3, CX₃CR₁ und PD-1 integriert. Darüberhinaus wurden zur Funktionalitätsanalyse die Zytokine IL-2, IFN γ und TNF α sowie die co-stimulatorischen Moleküle CD137 und CD154 genutzt. Im Folgenden werden die für die Arbeit relevanten Antikörper kurz dargestellt.

3.3.1. Phänotypisierung

T-Zellen können aufgrund der unterschiedlichen Expression spezifischer Oberflächenmarker in naive bzw. Gedächtnis-Zellen differenziert werden¹³¹. Zur eindeutigen Identifizierung naiver T-Zellen sollten mindestens drei Marker eingeschlossen werden¹³², dies kann z.B. anhand des Chemokinrezeptors CCR7⁺, des Oberflächenproteins CD45RA⁺ sowie des Gedächtniszellmarker CD95⁻ (Fas) erfolgen.¹² CCR7 ist ein Homing-Rezeptor, der die Migration von T-Zellen in sekundär lymphatische Organe ermöglicht. CD45 ist eine Tyrosin-Proteinphosphatase, die auf allen hämatopoetischen Zellen exprimiert wird und in mehreren *Splicing*-Varianten vorliegt: unter anderem CD45RA und CD45RO.² Wird

eine naive T-Zelle aktiviert, erfolgt durch alternatives Splicen die Umwandlung von CD45RA zu CD45RO.^{15,133,134} Das Oberflächenprotein CD95 (Fas) aus der TNF-Rezeptor-Familie kennzeichnet Gedächtniszellen und kann nach Liganden-Bindung die Apoptose der Zelle bewirken.¹³⁵ Naive T-Zellen sind somit negativ für CD45RO und CD95 und positiv für CCR7. T_{CM} und T_{EM} sind positiv für CD45RO und CD95. T_{CM} sind CCR7 positiv und können aufgrund dieses Rezeptors in sekundär lymphatische Organe migrieren. Das unterscheidet sie von T_{EM}, die CCR7 negativ sind.¹⁴ Die terminal ausdifferenzierten T_{EMRA} sind wie T_{EM} negativ für CCR7 und positiv für CD95, allerdings re-exprimieren sie CD45RA. Es wird angenommen, dass diese Re-Exprimierung zu einer veränderten TCR-Aktivierung führt und somit dem Zell-Überleben dient.¹³⁶ Die T_{SCM}-Zellen befinden sich phänotypisch im *naive-like* T-Zell-Pool, sind negativ für CD45RO (CD45RO^{neg}) und werden anhand der Expression von CD95 sowie eines mittleren Expressionsniveaus von CCR7 (CCR7^{dim}) von den naiven T-Zellen (T_{Naive}) abgegrenzt^{30,19}.

Zur weiteren Typisierung wurde das Expressionsniveau von drei Oberflächenmarkern innerhalb der T-Zell-Populationen bestimmt: CXCR3, CX₃CR₁ und PD-1. CXCR3 ist ein G-Protein-gekoppelter Chemokinrezeptor, der insbesondere auf aktivierten T-Lymphozyten, auf Zellen der angeborenen Immunabwehr (z.B. natürlichen Killerzellen) sowie auf einer B-Zell-Subpopulation exprimiert wird.^{137,138} Er bindet drei Liganden (CXCL9, CXCL10 und CXCL11), die sich in entzündlichen Geweben anhäufen und so eine chemotaktische Migration von T-Zellen in Richtung der Inflammation induzieren.¹³⁸⁻¹⁴² Darüber hinaus bewirkt CXCR3 die Rekrutierung weiterer Zellen der Immunantwort.¹⁴³ In einer Vielzahl von entzündlichen und Autoimmunerkrankungen konnte eine Hochregulation von CXCR3 und seinen Liganden gezeigt werden.¹⁴⁴⁻¹⁴⁶ Jüngste Studienergebnisse deuten zudem auf eine prädiktive Rolle des intratumoralem CXCR3-Systems für den Erfolg einer Chemotherapie bei Blasenkrebs hin.¹⁴¹ CXCR3 ist hoch exprimiert auf CD8⁺ T_{CM} und T_{SCM}^{19,26,141} und niedrig auf naiven T-Zellen. Es wird sehr schnell nach Aktivierung einer naiven T-Zelle hochreguliert.¹⁴⁷

Der Chemokinrezeptor CX₃CR₁ ist ein Transmembranprotein, welches an der Adhäsion und Migration von Leukozyten beteiligt ist und mindestens zwei distinkte

Gedächtnis-Zellpopulationen unterscheiden kann: $CX_3CR_1^+$ T-Zellen zeigen zytotoxische Kapazität und weisen einen terminal differenzierten Phänotyp auf wohingegen $CX_3CR_1^-$ T-Zellen proliferative Eigenschaften aufweisen und ein hohes Maß an Polyfunktionalität (Produktion von IL-2, $IFN\gamma$ und $TNF\alpha$).^{148,149} Diese Unterscheidung war unabhängig von der Expression des Lymphknoten-*Homing*-Rezeptors CD62L. So zeigten Böttcher et al. (2015) $CX_3CR_1^+ / CD62L^+$ T-Zellen, die Effektorfunktionen aufwiesen und sich in subkapsulären Lymphknotenregionen fanden. Patienten, die an chronischen Viruserkrankungen litten, wiesen eine geringe Anzahl an $CX_3CR_1^+$ Effektor-T-Zellen auf; erst nach Ausheilung zeigten sich hohe $CX_3CR_1^+$ Effektor-T-Zellzahlen.^{150,148} Die Expression von CX_3CR_1 scheint also ein Marker ausgeheilter Virusinfektion zu sein und kann darüberhinaus Aufschluss über die Infektionskontrolle und den Erfolg von Immuntherapien geben. Eine weitere Studie beschrieb ein T-Zell-Subset, welches eine intermediäre CX_3CR_1 -Expression aufwies, in Lymphknoten migrieren konnte, aber vorwiegend periphere Gewebe patrouillierte. Zudem wies diese Zellpopulation eine hohe homöostatische Aktivität und Selbsterneuerungspotential auf, war $CXCR3^+$ und wurde als *peripheral memory* T-Zellen benannt. Hinsichtlich der Lineage wurde es zwischen den hochproliferativen $CX_3CR_1^-$ und den $CX_3CR_1^+$ Effektorzellen eingeordnet.¹⁴⁸ Das Expressionsmuster von CX_3CR_1 auf T_{SCM} ist bislang nicht beschrieben. Möglicherweise könnte anhand dieses Markers eine klare funktionale Abgrenzung der T_{SCM} gegenüber den T_{CM} erfolgen. Das *Programmed-Cell Death* Protein 1 (PD-1) ist ein Oberflächenprotein, welches unter anderem auf $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Lymphozyten exprimiert wird und zusammen mit seinen Liganden (PD-L1, PD-L2, PD-L) an einer Vielzahl immunregulatorischer Prozesse beteiligt ist.¹⁵¹ Es ist ein hemmendes Protein, welches die Apoptose antigen-spezifischer T-Zellen induzieren und gleichzeitig die Apoptose regulatorischer T-Zellen reduzieren kann.^{151,152} PD-1 und die Liganden sind sowohl für Autoimmunität als auch für maligne Erkrankungen als sogenannter Immun-Checkpoint-Inhibitor ein wichtiges Target.¹⁵³ Auch für die T-Zell-Differenzierung scheint PD-1 ein wichtiger Rezeptor zu sein: naive T-Zellen zeigen innerhalb kurzer Zeit nach Stimulation eine Induktion der PD-1-Expression.¹⁵⁴ Mit steigendem Differenzierungsgrad steigt das PD-1- Expressionslevel. Frühdifferenzierte T_{CM} weisen

eine geringere Expression auf, möglicherweise um stark-inhibierende Effekte zu verhindern, T_{EM} weisen hingegen die höchste Expression auf. $CD8^+ T_{EMRA}$ zeigen im Vergleich geringere PD-1-Level.¹¹³ Die Expression auf T_{SCM} ist bislang nicht bekannt. Dem linearen Differenzierungsmodell folgend, wäre ein Level zwischen naiven T-Zellen und T_{CM} zu erwarten.

3.3.2. Bestimmung antigen-spezifischer T-Zellen

Zur Bestimmung antigen-spezifischer Zellen werden T-Zellen mit bestimmten Peptiden stimuliert und anschließend wird mittels fluoreszenz-gekoppelter Antikörper die Zytokinantwort gemessen. Die Technik der proteinüberspannenden, überlappenden Peptidpools, die praktisch alle CD4 und CD8 Epitope enthalten, wurde an unserem Institut entwickelt und wird heute weltweit angewendet.¹⁵⁵ Es werden unter anderem $IFN\gamma$, $TNF\alpha$ und IL-2 für (Poly-)Funktionalitätsanalysen genutzt.^{101,156} $IFN\gamma$ ist ein Zytokin aus der Interferon-Familie, welches von aktivierten T-Zellen produziert und sekretiert wird. Es wirkt antiviral, aktiviert Makrophagen, erhöht die Expression von MHC-Klasse I-Molekülen und führt damit zu einer verbesserten Antigen-Clearance.² $IFN\gamma$ wird nicht sofort nach Aktivierung produziert und ist eher auf spät-differenzierten T-Zellen exprimiert.^{157,158} $TNF\alpha$ ist als bedeutendes proinflammatorisches Zytokin an der Eliminierung von Pathogenen beteiligt und wird vor allem von aktivierten T-Zellen und Makrophagen produziert.¹⁶ Es induziert die Proliferation und Aktivierung naiver und Effektor-T-Zellen durch eine erhöhte Produktion weiterer proinflammatorischer Zytokine wie $IFN\gamma$. Zudem erhöht es die Menge von IL-2R, wodurch eine weitere T-Zell-Proliferation induziert wird.¹⁵⁹ Gleichzeitig kann $TNF\alpha$ die Apoptose von stark aktivierten Effektor-T-Zellen induzieren und spielt sowohl bei der Regulation der Immunantwort als auch im Rahmen von Autoimmunerkrankungen eine entscheidende Rolle.¹⁶ IL-2 ist ein entscheidender T-Zell-Wachstumsfaktor und maßgeblich für die Entwicklung des T-Zell-Gedächtnisses erforderlich.² Alle drei Zytokine werden von allen Subsets produziert, jedoch in unterschiedlichem Ausmaß und Kombination.²⁶ Früh differenzierte T-Zellen (T_{CM}/T_{SCM}) sekretieren vermehrt IL-2 und weisen eine stärkere Polyfunktionalität auf¹⁴⁸ während spät-differenzierte T-Zellen (T_{EM}/T_{EMRA}) vor allem

TNF α produzieren.¹⁴ In der vorliegenden Arbeit wurde die Antigen-spezifität anhand der Co-Expression von IFN γ und dem Aktivierungsmarker CD137 bestimmt. Bei letzterem handelt es sich um ein co-stimulatorisches Protein der TNFR Familie, welches wenige Stunden nach Stimulation von T-Zellen exprimiert wird und unter anderem Zelleffektorfunktionen wie die Produktion und Sekretion von Zytokinen und Chemokinen induziert.¹⁶⁰

Mithilfe des gewählten Panels werden T_{SCM} phänotypisch von den anderen Gedächtnis-T-Zellen abgegrenzt. Anhand der PD-1 und CX₃CR₁ Expression können Rückschlüsse auf den Differenzierungs- und Aktivierungsgrad gezogen werden. Die Funktionalität wird durch CMV-spezifische Stimulation gemessen. Anhand dieser Schritte soll in der vorliegenden Arbeit eine genauere Typisierung der T_{SCM} in einem breiten Altersrange erfolgen.

4. Aufgabenstellung

Die T_{SCM} stellen ein seit einigen Jahren bekanntes und zunehmend erforschtes T-Zell-*Subset* dar, welches hinsichtlich der Erhaltung und Rekonstitution des gesamten T-Zell-Pools sowie der effizienten Immunantwort auf Pathogene von großem Interesse ist.

Ausgehend von der Hypothese, dass Alter und Nachweis einer persistierenden CMV-Infektion einen Einfluss auf Zahl und Funktion von T_{SCM} hat, waren die Ziele der Arbeit:

- die relativen und absoluten Zellzahlen der T_{SCM} im Vergleich zu den übrigen T-Zell-Subpopulationen in einer breiten Alterskohorte zu untersuchen. Anhand der Bestimmung des CMV-Infektionsstatus wurde zusätzlich der Einfluss einer persistierenden Virusinfektion in die Analysen einbezogen.
- Weiterhin erfolgte die Analyse der Funktionalität der T_{SCM} mithilfe von drei Rezeptoren/Aktivierungsmarkern (CXCR3, PD-1 und CX₃CR₁).
- Zusätzlich wurden T_{SCM} in einem kleinen Patientenkollektiv in gekoppelten Proben aus PBMC und Knochenmark bestimmt, um eine mögliche Nische aufzuzeigen.

Besonderem Interesse galt den Fragen, ob sich mit zunehmendem Lebensalter erhöhte Frequenzen und absolute Zell-Zahlen von T_{SCM} zeigen und inwieweit ein Einfluss einer CMV-Infektion besteht. Zusätzlich wurden auch die übrigen T-Zell-Subpopulationen hinsichtlich der Alters- und CMV-Statuseffekte untersucht

Hinsichtlich der Typisierung und Funktionalität sollte untersucht werden, ob sich in der untersuchten Stichprobe eine erhöhte Expression von CXCR3 auf T_{SCM} sowie ein distinktes Expressionsmuster von PD-1 zeigt, welches eine Abgrenzung einerseits von den T_{CM} und andererseits von den naiven T-Zellen zulässt. Bezüglich des Markers CX₃CR₁ wurde ein niedriges Expressionslevel ähnlich dem auf den T_{CM} angenommen, welches auf die hohe proliferative Potenz der Subpopulation hindeuten würde.

Im letzten Teil der Arbeit wurde der Frage nachgegangen, ob sich möglicherweise im Knochenmark erhöhte Frequenzen und Zell-Zahlen von T_{SCM} im Vergleich zum peripheren Blut nachweisen lassen.

5. Material und Methoden

5.1. Material

5.1.1. Verbrauchsmaterialien

Tabelle 1. Verwendete Verbrauchsmaterialien

Material	Firma
BD Vacutainer® One Use Holder	Becton, Dickinson and Company, (Franklin Lakes, USA)
BD Vacutainer® Plus blood collect tubes LH 170	Becton, Dickinson and Company, (Franklin Lakes, USA)
BD Vacutainer® Safety-Lok blood collection set	Becton, Dickinson and Company, (Franklin Lakes, USA)
Softasept® N	B Braun (Melsungen, DE)
FALCON Conical Centrifuge Tubes (15-, 50 ml)	Corning Inc. (Corning, USA)
Serologische Pipetten (5-, 10-, 25 ml)	Corning Inc. (Corning, USA)
Sterile Transferpipetten 3,5 ml	Sarstedt (Nümbrecht, DE)
Rundbodenröhrchen 5 ml, Polystyrol	Corning Inc. (Corning, USA)
Sterile Pipettenspitzen (10-, 20-, 100-, 200-, 1000 µl)	Eppendorf (Hamburg, DE)
Vasco Nitril Handschuhe	B. Braun (Melsungen, DE)
Eppendorfgefäße (0.5, 1.5 mL)	Eppendorf (Hamburg, DE)
Zellsieb, 100µm	Corning Inc. (Corning, USA)

5.1.2. Pufferlösungen, Kulturmedien, Chemikalien

Tabelle 2. Pufferlösungen, Kulturmedien, Chemikalien

Material	Firma
CyPBS Dulbecco's Phosphate Buffered Saline	Gibco by life technologies/Thermo Fisher (Waltham, USA)
Ampura Spüllösung 1000 ml Plastipur, Aqua ad iniectabilia, steril, endotoxinfrei	Fresenius Kabi (Bad Homburg, DE)
Fötale Kälberserum·500ml ·BCR-S 0115	Biochrom (Berlin, DE)
Penicillin/Streptomycin 10.000 E/10.000	Biochrom (Berlin, DE)
VLE-RPMI 1640 (Very Low Endotoxin)	Biochrom (Berlin, DE)
Biocoll Separating Solution, Isotonic Solution Density 1.077 g/ml, testet for endotoxin	Biochrom/Merck GmbH (Berlin, DE)
Brefeldin A from Penicillium Penicillium brefeldianum, ≥99% (HPLC and TLC)	Sigma - Aldrich Chemie (München, DE)
HighClone Trypan Blue 0.2 um Filtered	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Ionomycin Calcium Salt from Streptomyces conglobatus	Sigma - Aldrich Chemie (München, DE)
Phorbol 12-Myristate 13-Acetate, Molecule	Sigma - Aldrich Chemie (München, DE)
Erythrozytenlyse Puffer	Qiagen
Ethanol 96%	

5.1.3. FACS Antikörper

Tabelle 3. FACS Antikörper

Primärantikörper	Herkunfts- organismus	Hersteller	Klon
Anti - CD3 Brilliant Violet 650	Maus	BioLegend (SanDiego, USA)	OKT3
Anti - CD4 PerCP/Cy5.5	Maus	BioLegend (San Diego, USA)	SK3
Anti - CD8 Brilliant Violet 570	Maus	BioLegend (San Diego, USA)	RPA-T8
Anti - CD45RA PE/Dazzle 594	Maus	BioLegend (San Diego, USA)	HI100
Anti - CD45RO Brilliant Violet 785	Maus	BioLegend (San Diego, USA)	UCHL1
Anti- CCR7 PE	Maus	BioLegend (San Diego, USA)	G043H7
Anti - CD95 (Fas) PE/Cy7	Maus	BioLegend (San Diego, USA)	DX2
Anti - CD137 PE/Cy5	Maus	BioLegend (San Diego, USA)	4B4-1
Anti - CD154 Brilliant Violet 711	Maus	BioLegend (San Diego, USA)	24-31
Anti - IFN- γ Brilliant Violet 605	Maus	BioLegend (San Diego, USA)	4S.B3
Anti - IL2 Brilliant Violet 421	Ratte	BioLegend (San Diego, USA)	MQ1-17H12
Anti - TNF alpha Alexa Fluor A700	Maus	BioLegend (San Diego, USA)	MAb11
Anti- CXCR3 Al488	Maus	BioLegend (San Diego, USA)	G025H7
Anti-CX3CR1 Al647	Ratte	BioLegend (San Diego, USA)	2A9-1
Anti-PD-1 APC/Cy7	Maus	BioLegend (San Diego, USA)	EH12-2H7
Anti-CD3 PE	Maus	BioLegend (San Diego, USA)	OKT3

5.1.4. Kits

Tabelle 4. Verwendete Kits

Kit	Firma
Live/Dead Fixable Blue Dead Cell Stain Kit for UV excitation	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)

5.1.5. Geräte

Tabelle 5. Verwendete Geräte

Gerät	Firma
BD LSR Fortessa Cell Analyzer	Becton, Dickinson and Company (Franklin Lakes, USA)
MACSQuant	Miltenyi Biotech (Bergisch Gladbach, DE)
Eisbad	neoLab Migge (Heidelberg, DE)
Grant Wasserbad	neoLab Migge (Heidelberg, DE)
Kühlschrank Liebherr Profi Line (4°C)	Liebherr (Bieberach and der Riß, DE)
Gefrierschrank Liebherr Premium NoFrost (-20°C)	Liebherr (Bieberach and der Riß, DE)
Heraeus Multifuge 3SR+	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Heraeus Multifuge X1R	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Hämatocytometer Deckglas 20 x 26 x 0,4 mm	Sigma - Aldrich Chemie (München, DE)
neoLab-Vortex-Reagenzglas mixer	Grant (Cambridge, UK)
Olympus CX2 Mikroskop	Olympus (Hamburg, DE)
Pipetus 100-240 Volt	Hirschmann Laborgeräte (Eberstadt, DE)
Sanyo MCO-18AIC UV Double Stack Inkubator	LabX (Midland, Kanada)
Sprout Minizentrifuge	Biozym Scientific (Hessisch Oldenburg, DE)
Sterilbank HERA - Safe HS12	Heraeus (Langenselbold, DE)
Zählkammer Neubauer - Improved	Laboroptik Ltd (Lancing, UK)
hemocytometer, Tiefe 0.1 mm, 0.0025 mm ²	
Ziegma Brucheis-Maschine	ZIEGRA Eismaschinen GmbH (Isernhagen, DE)

5.2. Methoden

Die Erstellung der Arbeit erfolgte unter Einhaltung der „Satzung der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis“ Nr. 208 vom 29. März 2018 und der allgemeinen Datenschutzbestimmungen.

5.2.1. Stichprobenbeschreibung

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden T-Zellen aus peripherem Blut isoliert und beschrieben. Die Blutproben wurden durch Venenpunktion von gesunden Kontrollpersonen gewonnen, die Rekrutierung der Probanden erfolgte per Email über verschiedene Institutsverteiler. Es wurden insgesamt 60 gesunde Kontrollpersonen in die Studie eingeschlossen, von insgesamt 46 dieser Spender wurden die absoluten T-Zell-Zahlen bestimmt. Zusätzlich wurden in Kooperation mit Prof. Il-Kang Na (Medizinische Klinik m. S. Hämatologie, Onkologie und Tumormunologie, Charité Universitätsmedizin Berlin) gekoppelte Blut- und Knochenmarksproben von vier Spendern nach Einsatz einer Hüftgelenksendoprothese gewonnen und hinsichtlich der T-Zellen untersucht.

Alle Spender gaben ihr schriftliches oder mündliches Einverständnis zur Probenentnahme und Studienteilnahme. Zur Studie liegt ein positives Ethikvotum der Charité Ethikkommission vor (Antragsnummer EA4/063/11, EA4/091/19 und EA1/269/14). Die Blutproben wurden nach Abnahme bei Raumtemperatur in Dunkelheit gelagert und innerhalb von maximal 4 Stunden weiterverarbeitet. Die Isolation des Knochenmarks erfolgte aus den resezierten Femurköpfen (siehe Abschnitt 5.2.4).

Der gesamte Ablauf der Gewinnung und Weiterverarbeitung der Blut- und Knochenmarkszellen wurde unter sterilen Bedingungen einer Sicherheitswerkbank durchgeführt.

Tabelle 6. Stichprobenbeschreibung der Gesamtkohorte

		Stichproben größe	Mittel- wert	Alter Standard- abweichung	Max	Min
T-Zell-Frequenzen						
Gesamtkohorte		60	42,8	15,915	24	82
CMV- Status	positiv	47	41,829	15,222	24	81
	negativ	13	46,308	17,765	24	82
Absolute Zellzahlen						
Gesamtkohorte		46	41,13	13,16	24	82
CMV- Status	positiv	37	50,11	18,45	26	82
	negativ	9	38,95	10,76	24	58

5.2.2. Bestimmung der absoluten T-Zell Zahl

Zur Bestimmung der absoluten Anzahl an T-Zellen im Vollblutvolumen wurde eine Vollblut-Färbung durchgeführt. Dafür wurde 50 µL Heparinblut mit 48 µL PBS in einem Falcon Rundbogen-Tube verdünnt. Anschließend wurde die Probe mit zwei µL Anti-CD3 PE für 10 Minuten bei 4°C in Dunkelheit gefärbt. Danach wurden 500 µL Erythrozytenlyse-Puffer (Qiagen) pro Tube zu der Probe hinzugegeben. Die Zellsuspension wurde für 15 Minuten in Dunkelheit bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend mit Hilfe des MACSQuant (Miltenyi Biotech) gemessen. Das Aufnahmevervolumen betrug 200 µL mit einer Maximalgeschwindigkeit von 4000 Zellen/Sekunde.

Die absolute Zellzahl wurde anhand folgender Gleichung bestimmt:

$$\text{Absolute Zellzahl} = \text{Verdünnung} * (\text{Frequenz der CD3}^+ \text{ T-Zellen} / \text{Aufnahmevervolumen})$$

5.2.3. Isolation peripherer mono-nukleärer Blutzellen (PBMC)

Der Term Periphere mononukleare Blutzellen (engl. peripheral blood mononuclear cells=PBMC) beschreibt eine Gruppe von einkernigen Blutzellen, die B- und T-

Lymphozyten, dendritische Zellen, Monozyten und natürliche Killerzellen umfasst. Im Gegensatz dazu sind Erythrozyten und Thrombozyten kernlos und Granulozyten mehrkernig. Die Isolation von PBMC aus venösem Vollblut erfolgte mit Hilfe einer Dichtegradientenzentrifugation durch ein hydrophiles Kolloid (Biocollreagent). Zunächst wurden 15 mL Biocollreagent in ein 50 mL Falcon Tube gegeben. Anschließend wurde das Heparinblut in einem weiteren 50 mL Falcon Tube im Verhältnis 1:1 mit sterilem PBS verdünnt. Das Gemisch von einem maximalen Volumen von 35 mL wurde vorsichtig auf das Biocoll geschichtet und bei 800 x g für 20 Minuten bei Raumtemperatur (21°C) unter Ausschaltung der Bremse zentrifugiert. Die Blutbestandteile ordnen sich entsprechend ihrer Dichte (siehe Tabelle 7) an. Somit können die leichteren Lymphozyten, Monozyten, Thrombozyten sowie das Plasma von den schwereren Granulozyten und Erythrozyten getrennt werden (siehe schematische Abbildung 2).

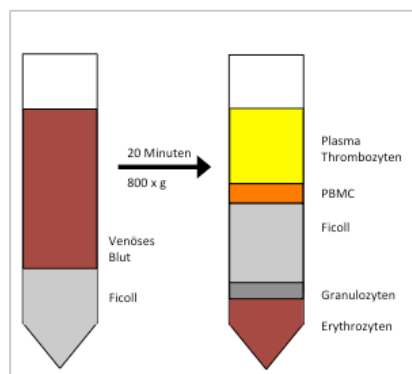


Abbildung 2. Schematische Darstellung der PBMC Isolation durch Dichtegradientenzentrifugation. Infolge der Dichtegradientenzentrifugation schichten sich die Blutbestandteile entsprechend ihrer mittleren Dichte oberhalb bzw. unterhalb des Biocollreagent auf.

Tabelle 7. Mittlere Dichte von Blutbestandteilen

Blutbestandteile und -zellen	Mittlere Dichte [g/cm ³]
Plasma	1.026
Thrombozyten	1.058
Monozyten	1.065
Lymphozyten	1.070
Basophile Granulozyten	1.079
Neutrophile Granulozyten	1.082
Eosinophile Granulozyten	1.092
Erythrozyten	1.1
Biocollreagent	1.077

Der Interphasenring, welcher die PBMC enthält, wurde mittels Pasteur Transferpipette in ein neues 50 mL Falcon Tube überführt. Danach folgten drei Waschschriffe um Überstände und Verunreinigung durch Biocoll und Blutbestandteile zu beseitigen. Dazu wurde die Zellsuspension des Interphasenrings mit PBS 1:2 verdünnt und für 10 Minuten bei 4° C und 400 x g zentrifugiert. Ein zweiter 15-minütiger Waschschriff bei 183 x g erfolgte zur Beseitigung der noch enthaltenen Thrombozyten. Nach jedem Durchgang wurde dekantiert, das Zellpellet re-suspendiert und erneut mit 50 mL PBS versetzt. Nach dem zweiten Waschvorgang erfolgte die Zellzählung.

Im Anschluss an den letzten Waschschriff wurde die Zellsuspension mit Kulturmedium (VLE-RPMI, 10% FCS, 1% P/S) auf eine Zellkonzentration von 5×10^6 Zellen/mL eingestellt. Hiervon wurde je Ansatz 1 mL abgenommen, in ein Falcon-Rundbogen-Tube überführt und bis zur Stimulation in einem befeuchteten Inkubator bei 37° C und 5 % CO₂ in einem Winkel von 45° in Zellkultur belassen.

5.2.4. *Isolation mononukleärer Blutzellen aus dem Knochenmark (BMNC)*

Die Ausschabung des Hüftkopfes erfolgte mithilfe eines scharfen Metalllöffels, der zuvor 10 Minuten in 96% Ethanol desinfiziert und anschließend 10 Minuten steril luftgetrocknet wurde. Die Knochenfragmente sowie das Knochenmark wurden in einem mit 20 mL warmen Kulturmedium (VLE-RPMI, 10% FCS, 1% P/S) befüllten 50 mL Falcon Tube gesammelt. Anschließend erfolgte die Filtrierung durch ein 100 µm Zellsieb in ein neues 50 mL Falcon Tube (Methode zur Isolation der BMNC nach Prof. Il-Kang Na, Medizinische Klinik m. S. Hämatologie, Onkologie und Tumorummunologie, Charité Universitätsmedizin Berlin). Die Isolation der BMNC erfolgte analog zur Isolation von PBMC, die in Abschnitt 5.2.3. beschrieben wurde.

5.2.5. *Zellzählung*

Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte mithilfe der Neubauer Zählkammer. 10 µl der vorher resuspendierten Zellsuspension wurden 1:2 mit Trypan-Blau verdünnt. Dieser Farbstoff färbt tote Zellen an, was die lichtmikroskopische Auszählung viabler Zellen

als helle homogene Kreise ermöglicht. Die gezählte Zellzahl wurde aufgrund der Verdünnung verdoppelt, sodass sich eine Zellzahl $\times 10^4/\text{mL}$ ergab.

5.2.6. Antigen-spezifische Stimulation

In der vorliegenden Arbeit wurden PBMC antigen-spezifisch mithilfe der überlappenden Peptide-Poole pp65 (Phosphoprotein 65) und IE-1 (Immediate Early Protein 1) des humanen Cytomegalievirus ($\text{CMV}_{\text{pp65/IE1}}$, beides JPT Peptide Technologies, Berlin, DE) stimuliert.¹⁵⁵ Diese Poole beinhalten die Gesamt-Aminosäuresequenz der CMV pp65 und IE-1-Proteine und bestehen aus Peptiden einer Größe von 15 mer, die sich in mindestens 9 Aminosäuren überlappen. 15 mer Peptide können von MHC II gebunden werden und CD4^+ T-Zellen aktivieren. Zusätzlich schneiden extrazelluläre Peptidasen 15 mer Peptide in 9 mer Peptide, die von MHC I gebunden werden und CD8^+ T-Zellen aktivieren können.^{100,161} Zusätzlich erfolgt eine endogene APC-Prozessierung.

Die lyophilisierten Peptide werden in Dimethylsulfoxid (DMSO) gelöst. Die Peptide-Pools wurden mit einer Konzentration von $1\mu\text{g}/\text{mL}$ je Peptid eingesetzt.

Parallel zu jeder Probe wurden eine Positiv- und eine nicht-stimulierte Negativkontrolle durchgeführt. Erstere dient der Überprüfung von Zellvitalität, Zytokin-Sekretionsfähigkeit, sowie zur Validierung der Zytokin-Antikörperbindungen, letztere der Distinktion von spezifischer und unspezifischer Aktivierung.

Für die Positivkontrolle wurden der Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA) (Sigma, München, DE) zusammen mit Ionomycin (Sigma, München, DE), welche den Calcium-Einstrom aktivieren, eingesetzt. Die Konzentrationen in der Positivkontrolle betragen $0.01\mu\text{g}/\text{mL}$ PMA und $4\mu\text{g}/\text{mL}$ Ionomycin. Als Negativkontrolle diente DMSO, da es als Lösungsmittel für die Peptide-Pools eingesetzt wurde.

Die Zellen wurden für 16 Stunden in einem befeuchteten Inkubator bei 37°C und 5% CO_2 in einem Winkel von 45° belassen. Nach Ablauf der ersten Stunde wurde Brefeldin A (BFA, Sigma, München, DE) in einer Konzentration von $10\mu\text{g}/\text{mL}$ zu jeder Probe hinzugegeben, welches in den Proteintransport vom endoplasmatischen

Retikulum zum Golgi-Apparat eingreift und die Proteinsekretion hemmt. Somit können die akkumulierten Proteine intrazellulär gemessen werden.^{162,163}

5.3. Färbung

5.3.1. Paneletablierung und -design

Nach Ablauf der Stimulation wurden die Zellen mit jeweils 3 mL PBS pro Falcon Rundbogen-Tube bei 4°C mit einer Beschleunigung von 400 x g für zehn Minuten zentrifugiert. Anschließend wurde dekantiert, das Zellpellet resuspendiert und laut dem nachfolgenden Protokoll gefärbt.

In der vorliegenden Arbeit wurde ein multiparametrisches Panel bestehend aus 16 fluoreszenz-gekoppelten Antikörpern etabliert. Es wurden sowohl Einfach- als auch Tandemkonjugate verwendet und die Kombinationen von Fluoreszenz und Antikörper dabei entsprechend eines geringstmöglichen spektralen Überlappungsbereichs und einer optimalen Signalstärke gewählt.

10 der eingesetzten fluoreszenz-gekoppelten Antikörper wurden titriert um die optimal einzusetzende Konzentration zu ermitteln. Diese wurde einerseits anhand der optischen Trennbarkeit und andererseits anhand des Färbeindex' (*Stain index*, *SI*), der anhand der mittleren Fluoreszenzintensität (*Mean Fluorescence Intensity*; *MFI*) berechnet wird, bewertet. Anhand der MFI lassen sich Rückschlüsse auf die Höhe der Proteinmarkerdichte auf den T-Zellen ziehen. Der Färbeindex ist ein Maß für die Trennbarkeit von positiver (MFI_{POS}) und negativer Population (MFI_{NEG}) und errechnet sich wie folgt:

$$SI = \frac{MFI_{POS} - MFI_{NEG}}{2 \times SD_{NEG}}$$

Formel 1. Berechnung des Färbeindex. SI = Stain index; MFI = Mean Fluorescence Intensity; SD = Standardabweichung; POS = positive Population; NEG = negative Population

Für die verbleibenden 6 Antikörper wurden etablierte Konzentrationen aus Vorgängerexperimenten übernommen.¹⁹

In Abbildung 3 ist die Titration exemplarisch für den Marker CX3CR1 Al647 dargestellt.

Alle titrierten Antikörper, deren mittlere Fluoreszenzintensitäten sowie Färbeindizes sind in den Tabelle 8 und 9 aufgeführt. Die in der vorliegenden Arbeit eingesetzten Konzentrationen der Antikörper sind getrennt nach Oberflächen- und Intrazellulärfärbung in den Tabellen 10 und 11 ersichtlich.

Anschließend wurden für jeden verwendeten fluoreszenz-gekoppelten Antikörper Einzelfärbungen und sogenannte FMO (engl. Fluorescence minus one)-Kontrollen durchgeführt. Dies dient einerseits der Definition der positiven und negativen Population. Andererseits können unspezifische Antikörperbindungen und falsch-positive Messergebnisse kontrolliert werden. Anhand der FMO-Kontrollen kann die Hintergrundfluoreszenz, die durch Spektralüberlagerung anderer Fluorochrome entsteht, gemessen und entsprechend kompensiert werden. Abbildung 4. veranschaulicht die Einzelfärbung und FMO-Kontrolle beispielhaft für den Antikörper CD95 (PE-Cy7). Für jeden Spender wurde die Kompensationsmatrix anhand von Einzelfärbungen und FMOs (*Fluorescence minus one*) bestimmt und angepasst.

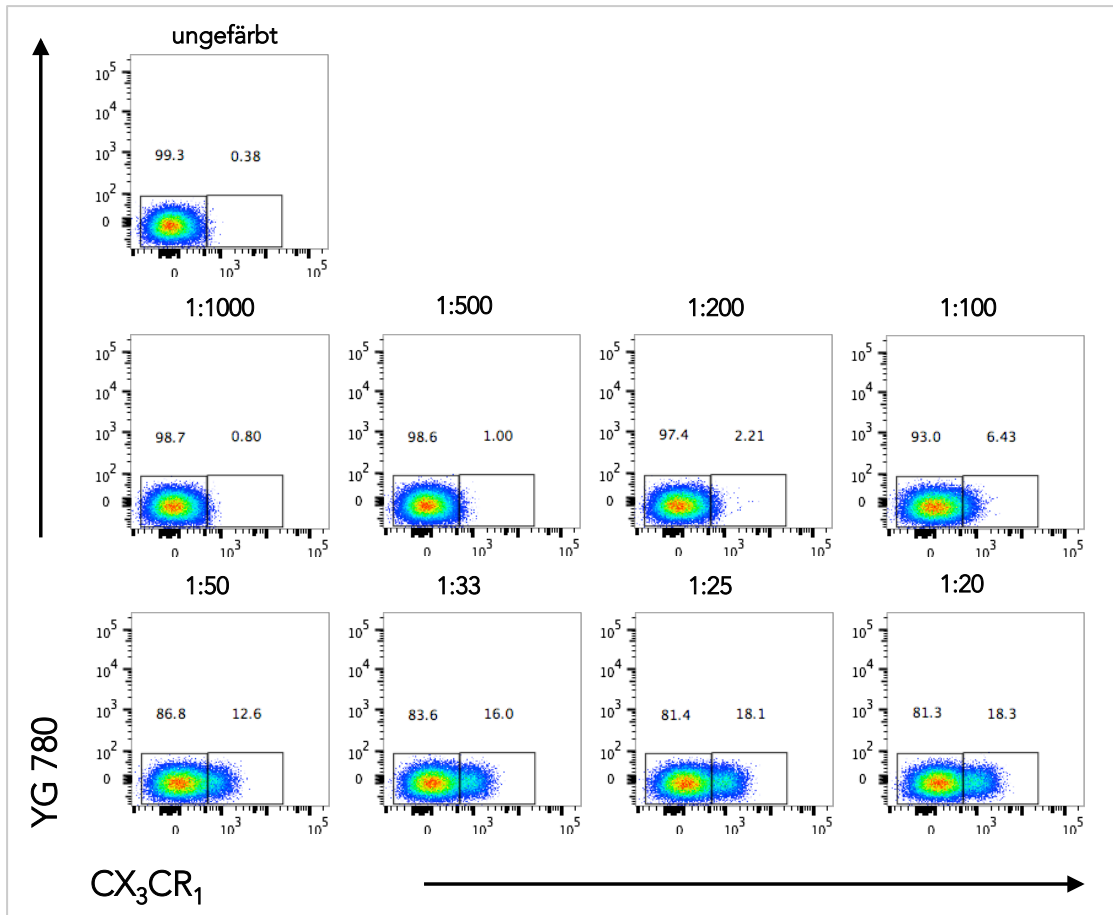


Abbildung 3. Titration des Antikörpers CX3CR1 (Al 647). Exemplarische Darstellung der optischen Trennbarkeit der Antikörper am Beispiel von CX3CR1.

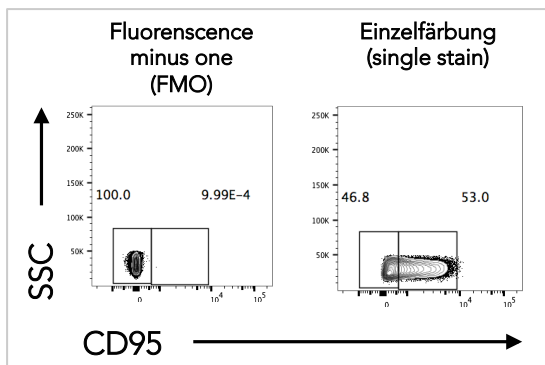


Abbildung 4. Fluorescence minus one (FMO) und Einzelfärbung (Single Stain) des Antikörpers CD95 (PE-Cy7). Anhand von FMO und Einzelfärbung erfolgte die Festlegung der Kompensationsmatrix eines jeden Markers, hier beispielhaft dargestellt für CD95.

Im folgenden Abschnitt wird das Färbeprotokoll näher erläutert. Während der Färbung wurden alle verwendeten Antikörper ständig auf Eis und unter Ausschluss des Sonnenlichts gelagert.

Tabelle 8. Titration der Aktivierungsmarker

Marker	Titrationststufe	MFI _{POS}	MFI _{NEG}	SD _{NEG}	STAIN INDEX
CD137 PE-Cy5	1:100	49916	941	946	25,89
	1:50	48594	739	983	24,34
	1:33	58393	1881	1064	26,56
	1:25	60773	2581	1098	26,50
	1:20	59827	2310	997	28,85
CD154 BC711	1:100	3394	170	225	7,16
	1:50	4225	209	213	9,43
	1:33	5326	274	221	11,43
	1:25	5245	304	235	10,51
	1:20	5664	436	251	10,41
IFN γ BV 605	1:100	9018	770	401	10,28
	1:50	14468	1026	426	15,78
	1:33	15164	1254	483	14,40
	1:25	14823	1286	460	14,71
	1:20	16752	1407	470	16,32
IL-2 BV421	1:100	3031	236	172	8,13
	1:50	3138	276	183	7,82
	1:33	3195	491	224	6,04
	1:25	2968	424	204	6,24
	1:20	3128	498	215	6,12
TNF α AI700	1:100	4592	74,2	151	14,96
	1:50	5505	104	154	17,54
	1:33	5930	139	155	18,68
	1:25	6176	148	155	19,45
	1:20	5976	177	164	17,68

Anmerkungen. MFI= Mittlere Fluoreszenzintensität, SD= Standardabweichung, POS= positiv, NEG= negativ.

Tabelle 9. Titration von Oberflächen- und intrazellulären Markern

Marker	Titrationstufestufe	MFI _{POS}	MFI _{NEG}	SD _{NEG}	STAIN INDEX
CCR7 PE	1:100	3926	86,4	150	12,80
	1:50	6000	164	154	18,95
	1:33	7687	255	187	19,87
CD95 PE-Cy7	1:1000	268	21,4	30,3	4,07
	1:750	262	20,6	30,3	3,98
	1:500	322	25,9	29,6	5,00
	1:200	915	170	69,9	5,33
	1:100	988	236	79,6	4,72
	1:50	1070	192	69	6,36
	1:33	1157	211	59,6	7,94
CXCR3 AI488	1:1000	302	91	37,8	2,79
	1:750	316	93	40,4	2,76
	1:500	317	93,2	43,8	2,55
	1:200	381	132	41,5	3,00
	1:100	1661	636	139	3,69
	1:50	2015	797	83,7	7,28
	1:33	2785	774	106	9,49
	1:25	4125	740	138	12,26
PD-1 APC/Cy7	1:100	778	72,5	123	2,87
	1:50	785	105	128	2,66
	1:33	759	129	122	2,58
	1:25	745	145	120	2,50
	1:20	735	170	115	2,46
CX3CR1 AI647	1:1000	641	69,5	148	1,93
	1:500	662	77,9	147	1,99
	1:200	694	96,3	157	1,90
	1:100	748	124	167	1,87
	1:50	917	128	163	2,42
	1:33	1054	133	157	2,93
	1:25	1142	144	158	3,16
	1:20	1171	154	155	3,28

Anmerkungen. MFI= Mittlere Fluoreszenzintensität, SD= Standardabweichung, POS= positiv, NEG= negativ.

5.3.1.1. Oberflächen-Färbung

Das Volumen der Zellsuspension pro Falcon Rundbogen-Tube betrug 100 µL mit einer Konzentration von 5×10^6 Zellen. Im ersten Schritt wurde die Oberfläche der Zellen gefärbt. Dazu wurde ein Mastermix aus den entsprechenden Antikörpern zusammengestellt (siehe Tabelle 9). Jedes Falcon Rundbogen-Tube wurde mit diesem Mastermix gefärbt, gevortext und für 30 Minuten bei 4° C in Dunkelheit inkubiert. Die Erstellung eines Mastermixes verbessert die Praktikabilität der Färbung und gewährleistet die Vergleichbarkeit der Proben, durch Minimierung des Fehlerrisikos.

Tabelle 10. Mastermix: Oberflächenmarker

Marker	Fluorochrom	Konzentration [µL/100 µL]	Klon
LD	UV	1	
CXCR3	Al488	1	G025H7
CX3CR1	AL647	4	2A9-1
PD-1	APC/Cy7	1	EH12.2H7
CD45RA	PE-Dazzle 594	1	HI100
CD45RO	BV785	1	UCHL1
CCR7	PE	2	G043H7

5.3.1.2. Fixierung und Permeabilisierung

Im Anschluss an die Oberflächenfärbung wurden die Zellen fixiert. Zur Permeabilisierung der Zellmembran wurde das FoxP3/Transcription Factor Staining Buffer Set (Thermo Fisher Scientific, US) entsprechend der Herstellerangaben verwendet (500 µL Fixierungs/Permeabilisierungs-Konzentrat/Probe für 30 Minuten bei Raumtemperatur und unter Lichtabschluss inkubiert.). Anschließend erfolgte unter Zugabe von 2 mL Permeabilisierungs-Puffer die Zentrifugierung mit 450 x g bei 4° C für 10 Minuten.

5.3.1.3. Intrazelluläre Färbung

Nach Dekantieren des Überstands wurde die intrazelluläre Färbung durchgeführt. Dazu wurde ein Mastermix entsprechend des Färbepanels (siehe Tabelle 11)

hergestellt und zu jeder Probe hinzugegeben. Nach erneutem Vortexen erfolgte die Inkubation der Zellen für 30 Minuten bei 4° C und unter Lichtabschluss.

Anschließend wurden die Zellen ein zweites Mal mit dem Permeabilisierungspuffer (siehe Fixierung und Permeabilisierung) für 10 Minuten bei 4° C mit einer Beschleunigung von 450 x g gewaschen. Nach dem Abgießen des Überstandes wurden die Zellen bei 4° C gelagert und umgehend durchflusszytometrisch gemessen.

Tabelle 11. Mastermix: Intrazelluläre Marker

Marker	Fluorochrom	Konzentration [µL/100 µL]	Klon
CD3	PE	2	OKT3
CD4	PerpCP-Cy5.5	1	SK3
CD8	BV605	1	RPA-T8
CD95	PE-Cy7	0.5	DX2
CD137	PE-Cy5	1	4B4-1
IFN γ	BV605	3	4S.B3
TNF α	Al700	3	Mab11
IL-2	BV421	1	MQ1.17H12
CD154	BV711	2	24-31

5.4. Durchflusszytometrische Messung

Die Durchflusszytometrie ist ein Messverfahren zur Charakterisierung und Einteilung einzelner Zellen anhand verschiedener Eigenschaften wie Größe, Struktur und Expression intra- und extrazellulärer Antigene.¹⁶⁴ In der Immunologie wird diese Methode unter anderem genutzt um Immunzellen und deren Untergruppen qualitativ und quantitativ zu bestimmen. Grundlage des Durchflusszytometers ist die Erfassung von mit fluoreszenz-gekoppelten Antikörpern markierten Zellen durch einen Laserstrahl. Die Probenflüssigkeit wird dazu druckgesteuert in einem sehr dünnen Strahl durch eine Messküvette geleitet, wobei jede einzelne Zelle von einem Wassertropfen umschlossen wird. Diese Aufteilung des Flüssigkeitsstroms in sogenannte Flow Cells wird als hydrodynamische Fokussierung bezeichnet und ist Grundlage dafür, dass jede Zelle einzeln den fokussierenden Laserstrahl passiert. Abhängig von Größe und Granularität der Zelle, wird das Laserlicht zunächst unabhängig von der Fluoreszenzmarkierung gestreut. Anhand der vorwärts abgelenkten Strahlen (engl. Forwardscatter; Abk.: FSC) können Aussagen über die Größe getroffen werden; das Seitwärtsstreulicht (engl. Sidescatter; Abk: SSC) gibt Aufschluss über die Granularität der Zelle. Abb. 5 zeigt ein typisches Verteilungsmuster humaner Immunzellen.

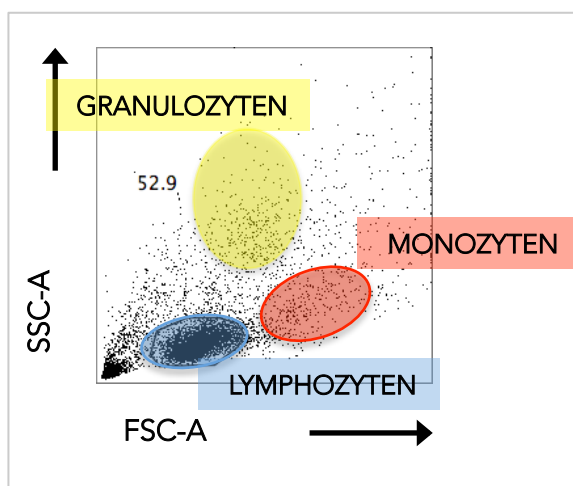


Abbildung 5. Typisierung humaner Immunzellen anhand von Vorwärts- und Seitwärtsstreuung des Laserstrahls. Lymphozyten zeichnen sich im Vergleich zu

Granulozyten durch eine geringere Granularität und im Vergleich zu Monozyten durch eine geringere Größe aus.

Zur Erfassung der Expressionsmuster verschiedener Antigene dienen fluoreszenzgekoppelte Antikörper. Wird eine entsprechend markierte Zelle von einem Laserstrahl erfasst und angeregt, emittiert das Fluorochrom daraufhin Licht einer bestimmten Wellenlänge. Mithilfe verschiedenfarbiger Laser und Filter können mehrere Farbstoffe pro Messung eingesetzt werden, sofern sich die Wellenlängen des emittierten Lichtes nicht überlagern.

Mithilfe von Linsen wird das streuende und fluoreszierende Licht gesammelt und anhand von Filtern zu entsprechenden Detektoren (Photomultiplier, PMT) geleitet. Dort werden die optischen Signale zunächst in elektronische und danach in digitale Signale umgewandelt, die mit Hilfe eines Computers ausgewertet werden. Die Messungen wurden am BD LSR Fortessa™ Cell Analyzer durchgeführt. Dieses Gerät verfügt über fünf Laser und 18 verschiedene Kanäle. Die violetten Filter wurden wie folgt getauscht: BP 525/50 gegen BP 565/50 sowie LP 505 gegen LP 550. Die Daten wurden mit der BD FACS Diva Software Version 8.0.2 erfasst. Im Rahmen der Panel-Etablierung wurden die eingesetzten Spannungen sowie die Kompensation der spektralen Überlappung optimal eingestellt. Zu Beginn jeder Messung wurde die Kompensation überprüft.

Pro Messung wurden 1×10^6 T-Zellen mit einer Geschwindigkeit von maximal 10.000 Events/Sekunde aufgenommen.

5.5. Statistische Auswertung

Die Auswertung der Datensätze erfolgte mit der Software FlowJo 10.2 sowie Microsoft Excel für Mac, Version 14.0.0.

Zur statistischen Auswertung und visuellen Darstellung wurden die Software GraphPad Prism 7.0e für Mac, GraphPad Software, La Jolla California USA, www.graphpad.com sowie die freie Software R für Mac, www.gnu.org genutzt.

Die Normalverteilung der Variablen wurde zunächst visuell anhand von Histogrammen sowie der Schiefe beurteilt und zudem mittels D'Agostino-Pearson-Test überprüft (Konfidenzintervalle bei 95%). Bei vorliegender Normalverteilung ($p >$

0.05) wurden Gruppenunterschiede mit one-way ANOVAS berechnet. Bei signifikantem Gruppenunterschied erfolgten weiterführende post-hoc t-Tests. Multiples Testen wurde anhand des Dunn-Tests korrigiert. Für nicht-parametrische Daten wurden Gruppenunterschiede mittels Kruskal-Wallis-Test und anschließend post-hoc Wilcoxon-Mann-Whitney-Tests berechnet. Korrelative Zusammenhänge wurden für parametrische Daten anhand der Pearson-Korrelation berechnet, für nicht-parametrische Daten wurde die Spearman-Korrelation verwendet.

Mithilfe von R wurden mittels ancGpar-Test für nicht-parametrische Daten robuste Regressionen mit zwei Variablen berechnet. Weiterführende Analysen erfolgten mittels Spearman-Korrelation hinsichtlich des Alterseffekts sowie Wilcoxon-Mann-Whitney-Test adjustiert für Alterseffekte für den Einfluss einer CMV-Infektion.

Für alle Tests wurde ein Signifikanzniveau von $p < 0,05$ festgelegt. Im Ergebnisteil sind die unterschiedlichen Signifikanzen mittels ein oder mehrerer Sternchen dargestellt. (* = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$ und *** = $p < 0,005$).

6. Ergebnisse

6.1. Differenzierung und Charakterisierung von CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen

In der vorliegenden Arbeit wurden humane T-Zellen aus peripher gewonnenem Blut von 60 Spendern phänotypisch und funktional untersucht. Abbildung 6 zeigt die durchflusszytomterische Gating-Strategie, welche in der vorliegenden Arbeit zur Phänotypisierung der T-Zellen angewandt wurde. Die T-Zell-Subpopulationen waren wie folgt definiert: T_{CM} sind CD45RO⁺ und CCR7⁺, T_{EM} sind CD45RO⁺ und CCR7⁻, T_{EMRA} re-exprimieren CD45RA (CD45RA⁺) und sind negativ für CCR7 (CCR7⁻). T_{CM}, T_{EM} und T_{EMRA} sind positive für CD95 (CD95⁺). Naive T-Zellen sind CD45RA⁺ sowie CCR7⁺ und CD95⁻. Die T_{SCM}-Zellen befinden sich phänotypisch im *naive-like* T-Zell-Pool und werden daher aus der Population naiver T-Zellen bestimmt. Sie sind negativ für CD45RO (CD45RO⁻) und werden anhand der Expression von CD95⁺ sowie eines mittleren Expressionsniveaus von CCR7 (CCR7^{dim}) von den naiven T-Zellen (T_{Naive}) abgegrenzt^{30,19}. T_{Naive-Like} beinhaltet neben naiven T-Zellen auch T_{SCM}. Die Frequenzen sowie absoluten Zellzahlen dieser T-Zell-Subpopulationen wurden innerhalb der CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen erfasst (Abbildung 7). Innerhalb der CD4⁺ T-Zellen wurde ein T_{CM}- Anteil von 26,11% ±8,44, ein T_{EM}- Anteil von 22,10% ±10,21, ein T_{EMRA}- Anteil von 2,15% ±2,10 und ein Anteil naiver T-Zellen von 44,60% ±13,04 gemessen. Die Frequenz der T_{SCM} betrug 1,58% ±0,78. Der CD8⁺ T-Zell-Pool setzte sich aus 3,63% ±2,96 T_{CM}, 34,73% ±14,36 T_{EM}, 24,05% ± 17,06 T_{EMRA} sowie 33,59% ± 16,80 naiven T-Zellen zusammen. Die Frequenz der T_{SCM} ergab 1,09% ±0,61. Im nächsten Schritt wurde der Anteil der T-Zell-Subpopulationen am gesamten T-Zell-Pool ermittelt. Für die CD4⁺ T-Zellen zeigten sich folgende Frequenzen: T_{CM} 15,86% ±5,51, T_{EM} 12,90% ±5,43, T_{EMRA} 1,24% ±1,15, naiver T-Zellen 27,98% ±12,01 T_{SCM} 1,00% ±0,55. Die Frequenzen der CD8⁺ T-Zellen ergaben: T_{CM} 0,99% ±0,87, T_{EM} 10,60% ±5,87, T_{EMRA} 8,36% ±7,39, naiver T-Zellen 9,71% ±4,95 T_{SCM} 0,30% ±0,14. Bei 46 von 60 Spendern wurden zudem die absoluten Zellzahlen pro Milliliter Vollblut ermittelt. Dazu wurden über eine Vollblutfärbung mittels CD3-Antikörper die T-Zell-Counts und analog zur PBMC-Färbung die Anzahl der Zellen pro µL bestimmt (genauere Angaben siehe

Kapitel 5.2.2). Alle Mittelwerte und Standardabweichungen von Frequenzen und absoluten Zellzahlen sind in Tabelle 12 aufgeführt.

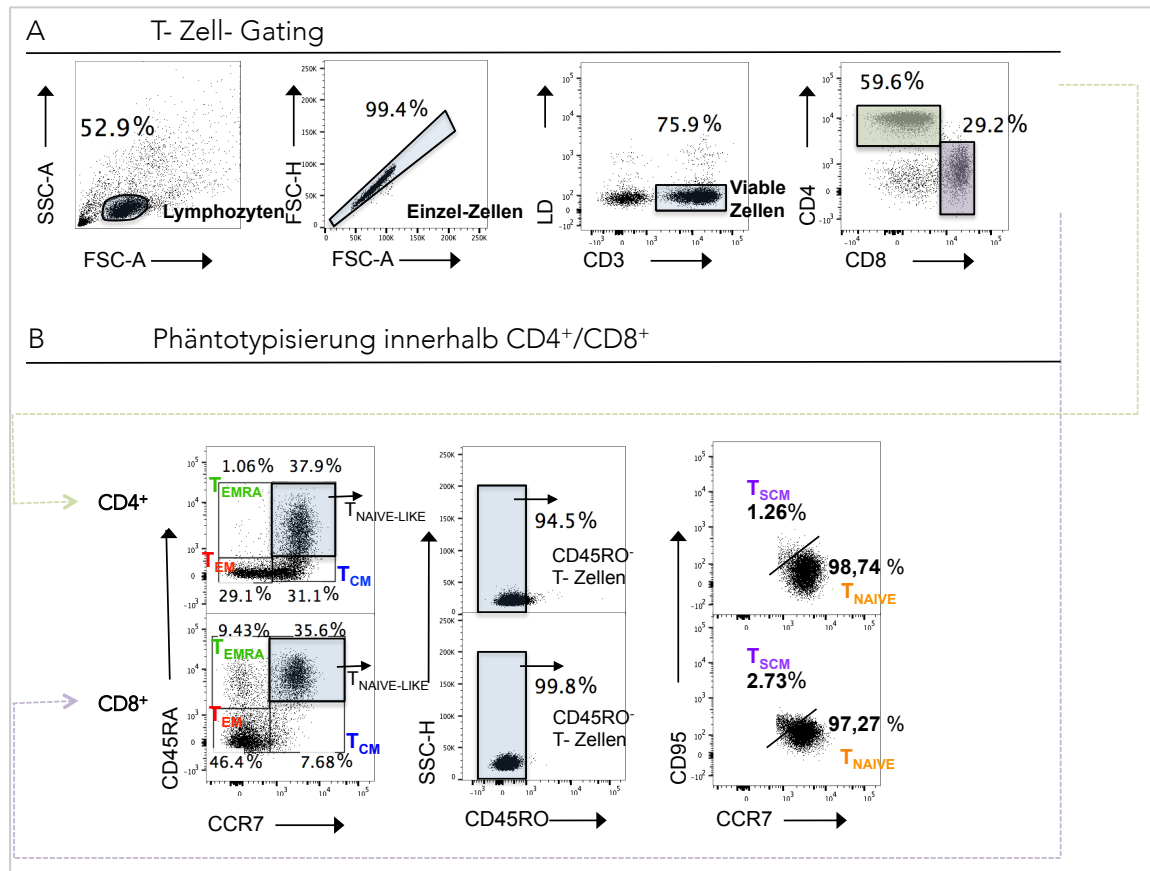


Abbildung 6. Gating Strategie für $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zell Populationen und Subsets. A) Durchflusszytometrische Analyse von PBMCs aus humanem Spenderblut eines repräsentativen Spenders zur Differenzierung von $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellen. Zunächst Definition von Lymphozyten anhand von Größe und Granularität der Zellen mit Hilfe des Vorwärts- und Seitwärtsstreulichtes, anschließend Ausschluss von Dubletten im Einzelzellgate (FSC-A, FSC-H) sowie Einschluss viabler T-Zellen anhand von Live/Dead (LD)⁻ und $CD3^+$. Diskriminierung von $CD4^+$ und $CD8^+$. B) Differenzierung der T-Zellen in terminal ausdifferenzierte (T_{EMRA}), Central/Effektor-Gedächtnis- (T_{CM} , T_{EM}) und *naïve-like* T-Zellen anhand der Gedächtniszellmarker $CD45RO/RA$ sowie des Homing-Rezeptors $CCR7$. Aus dem *naïve-like* T-Zell-Pool, dem Ausschluss von $CD45RO$ exprimierenden T-Zellen ($CD45RO^-$) und $CD95$ erfolgte die Bestimmung der T_{SCM} . T_{SCM} weisen ein mittleres Expressionsniveau von $CCR7$ auf ($CCR7^{DIM}$) und exprimieren zudem den Gedächtnis-T-Zellmarker $CD95$ ($CD95^+$). Die naiven T-Zellen wurden als Differenz aus $T_{NAIVE-LIKE}$ abzüglich der T_{SCM} berechnet.

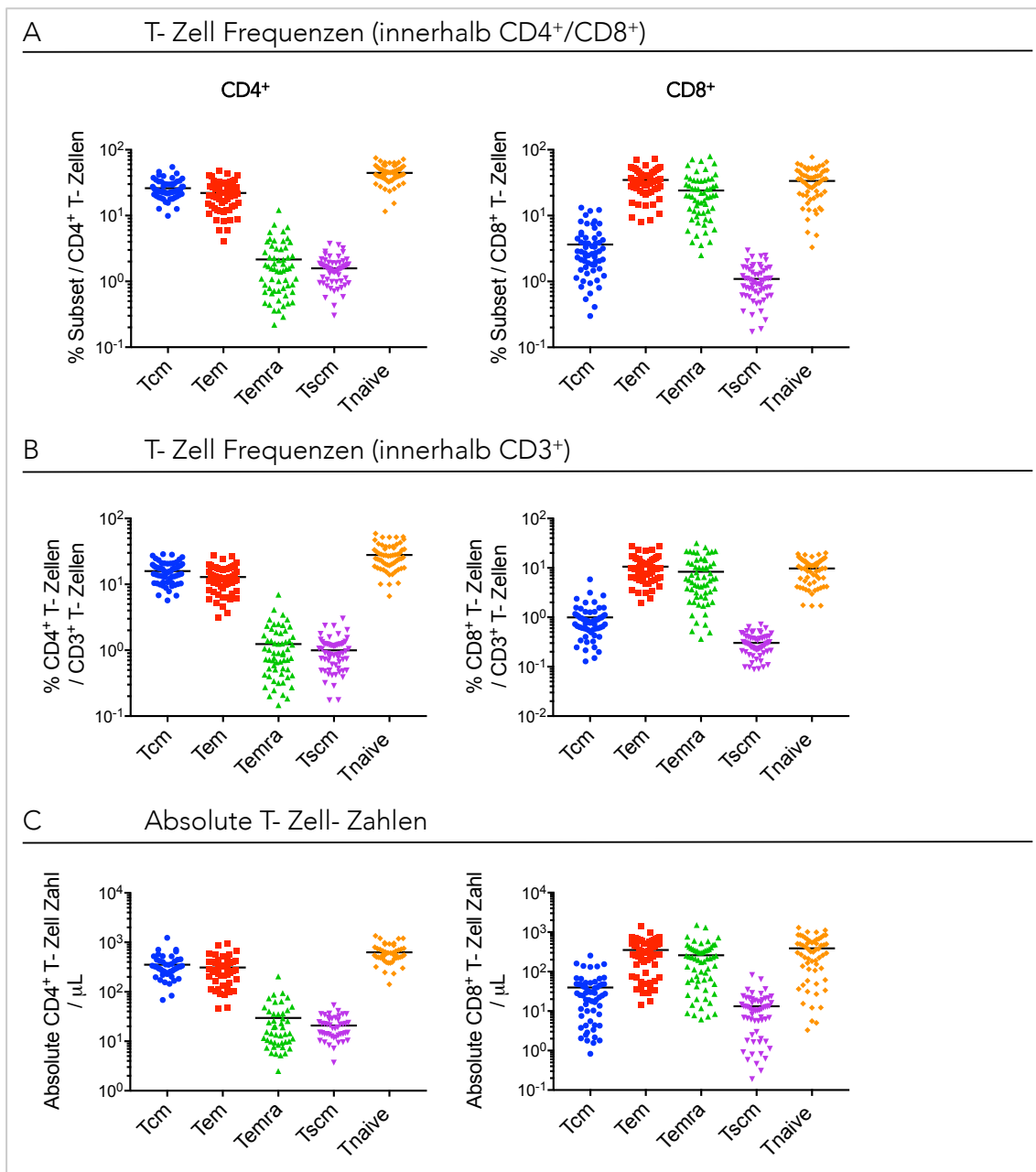


Abbildung 7. Frequenzen und absolute Zellzahl der CD4⁺- und CD8⁺ T-Zell Populationen. (A) Bestimmung der Frequenzen der T-Zellsubpopulationen entsprechend Abbildung 6. Verteilung der CD4⁺- und CD8⁺ T-Zell Subset-Frequenzen (n=60; Mittelwerte und Standardabweichungen der Subsets in Tabelle 12). (B) Zusammensetzung des Gesamt-T-Zell-Pools anhand des prozentualen Anteils der CD4⁺- und CD8⁺ T-Zell Subset (n=60; Mittelwerte und Standardabweichungen der Subsets in Tabelle 12). (C) Verteilung der absoluten CD4⁺- und CD8⁺ T-Zellzahlen pro Subsets pro μL Vollblut (n=46; Mittelwerte und Standardabweichungen der Subsets in Tabelle 12).

Tabelle 12. Mittelwerte und Standardabweichungen der entsprechend Abbildung 6 erfassten CD4⁺ und CD8⁺ T- Zell- Subset Frequenzen und absoluten Zellzahlen pro μL Vollblut.

T-Zell-Subpopulation	% T- Zell- Subset		% T- Zell- Subset/ CD3		Absolute T- Zell- Subsets	
	M (in %)	SD (in %)	M (in %)	SD (in %)	M	SD
CD4 T _{CM}	26,11	8,44	15,86	5,51	352,22	197,32
CD4 T _{EM}	22,10	10,21	12,90	5,43	310,97	199,15
CD4 T _{EMRA}	2,15	2,10	1,24	1,15	29,74	34,95
CD4 T _{SCM}	1,58	0,71	1,00	0,55	20,74	10,40
CD4 T _{NAIVE}	44,60	13,04	27,98	12,01	628,08	266,95
CD8 T _{CM}	3,63	2,96	0,99	0,87	50,43	49,16
CD8 T _{EM}	34,73	14,36	10,60	5,87	448,20	249,08
CD8 T _{EMRA}	24,05	17,60	8,36	7,39	330,71	294,47
CD8 T _{SCM}	1,09	0,61	0,30	0,14	16,96	14,43
CD8 T _{NAIVE}	33,59	16,80	9,71	4,95	496,44	289,15

Anmerkungen. M= Mittelwert, SD= Standardabweichung.

6.2. Einfluss von Alter und CMV-Infektionsstatus auf T-Zellen

6.2.1. Grundlagen der statistischen Analyse und globale Zellzahlen von CD3⁺, CD4⁺ und CD8⁺

Um mögliche Einflüsse des Alters und persistierender Virusinfektionen (exemplarisch anhand von CMV) auf Frequenzen und absolute Zellzahlen der T_{SCM} aufzuzeigen, wurden die Daten von 60 Spendern anhand der im Folgenden aufgeführten statistischen Analysen ausgewertet. Nach einer kurzen Ausführung zur statistischen Analyse werden zunächst Effekte auf globale CD3⁺, CD4⁺ und CD8⁺ präsentiert um einen ersten Überblick zu ermöglichen bevor anschließend auf die T_{SCM} und weitere T-Zell-Subpopulationen fokussiert wird. Die statistische Analyse wurde mit der Software R durchgeführt und wird im Folgenden kurz dargelegt: mittels ancGpar-Test für nicht-parametrische Daten wurden zunächst signifikante Interaktionseffekte zwischen Alter und CMV-Status getestet. Dieser Test untersucht, ob zwei Regressionslinien identisch sind. Ein signifikantes Ergebnis bedeutet demnach, dass die Regressionslinien verschieden sind und der Zusammenhang von Alter und T-Zell Frequenzen sich abhängig vom CMV-Status unterscheidet. In diesem Fall wurde der Alterseffekt getrennt nach CMV-Status mittels Spearman-Korrelation für nicht-parametrische Daten ermittelt. Bei nicht-signifikantem ancGpar-Test wurde die

Spearman-Korrelation für die gesamte Stichprobe berechnet. Der Effekt des CMV-Status auf die T-Zell-Frequenzen wurde mittels Wilcoxon Mann-Whitney Test für nicht-parametrische Daten adjustiert für den Alterseffekt ermittelt.

Abbildung 8 zeigt die Alters-, CMV- und Interaktionseffekte hinsichtlich der CD3⁺, CD4⁺ und CD8⁺ T-Zell-Frequenzen von CMV⁺ und CMV⁻ Donoren. In Abbildung 8A sind zunächst die globalen CD3⁺, CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen dargestellt. CMV⁺ Donoren zeigten insgesamt signifikant geringere Frequenzen an CD4⁺ T-Zellen ($p=0,023$) und signifikant höhere Frequenzen an CD8⁺ T-Zellen ($p<0,000$) als CMV⁻ Spender. Unabhängig vom CMV-Status war die Frequenz der CD4⁺ T-Zellen positiv mit dem Alter korreliert ($p=0,005$). Hinsichtlich der CD3⁺ T-Zell Frequenzen wurden keine signifikanten Unterschiede ermittelt. Die genauen Signifikanzwerte sind in Tabelle 13 aufgeführt. In Abbildung 9 sind die absoluten T-Zell-Zahlen dargestellt. Es zeigten sich keine signifikanten Effekte von Alter und CMV-Status auf die absoluten CD3⁺, CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen-Zahlen. Im folgenden Kapitel werden die Ergebnisse hinsichtlich der T_{SCM} präsentiert.

6.2.2. T_{SCM} als stabile Population

In Abbildung 8B und C sind die T-Zell-Subsets innerhalb der CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen dargestellt. Es zeigte sich kein signifikanter Einfluss von Alter oder CMV-Status auf CD4⁺ und CD8⁺ T_{SCM} Frequenzen. Zwei Tendenzen deuten innerhalb der CD4⁺ T_{SCM} auf eine mögliche positive Alterskorrelation unabhängig vom CMV-Status ($p=0,08$) sowie geringere Frequenzen bei Vorliegen eines positiven CMV-Status ($p=0,057$). Die Signifikanzanalysen sind in Tabelle 13 aufgeführt). Es wurde keine Korrelation zwischen CD4⁺ und CD8⁺ T_{SCM} nachgewiesen ($r=0,25$, $p=0,056$).

In der Analyse der absoluten Zell-Zahlen wurden keine signifikanten Ergebnisse nachgewiesen (siehe Abbildung 9). Bei Betrachtung des gesamten T-Zell-Pools ergab sich eine positive Alterskorrelation für CD4⁺ T_{SCM} Frequenzen ($p=0,02$) sowie eine negative Alterskorrelation für CD8⁺ T_{SCM} Frequenzen ($p=0,041$) (siehe Abbildung 10). Die jeweiligen Signifikanzanalysen sind in Tabelle 14 und 15 aufgeführt. In einem weiteren Schritt wurden die T_{SCM} zu den T_{NAIVE} ins Verhältnis gesetzt und ebenfalls hinsichtlich der Effekte von Alter und CMV-Status untersucht. Bei positivem CMV-

Infektionsstatus konnte sowohl innerhalb von CD4⁺ ($p=0,001$) als auch CD8⁺ ($p=0,000$) eine positive Alterskorrelation nachgewiesen werden. Bei letzteren konnte auch innerhalb der CMV⁻ Kohorte eine positive Alterskorrelation gezeigt werden (siehe Abbildung 11 sowie Tabelle 16).

Zusammenfassend zeigten sich stabile absolute und relative T-Zell-Zahlen innerhalb des CD4⁺ und CD8⁺ T-Zell-Pools, jedoch steigende CD4⁺ T_{SCM} und sinkende CD8⁺ T_{SCM} in Bezug auf den Gesamt-T-Zell-Pool. Zudem konnte sowohl für CD4⁺ als auch CD8⁺ gezeigt werden, dass insbesondere bei positivem CMV-Status das Verhältnis von T_{SCM} zum naiven T-Zell-Pool mit steigendem Alter zunimmt.

Im folgenden Abschnitt werden daher Effekte von Alter und CMV-Status auf die Ausdifferenzierung der T-Zellen aus dem naiven T-Zell-Pool vorgestellt.

6.2.3. Höhere absolute und relative CD8⁺ T_{EMRA} mit zunehmendem Alter bei positivem CMV-Status

Die Analyse der CD8⁺ T_{EMRA} Frequenzen ergab einen signifikanten Interaktionseffekt von Alter und CMV-Status ($p=0,001$): CMV⁺ Donoren wiesen im Vergleich zu den CMV⁻ Spendern einen größeren *Intercept* und Anstieg auf. Es zeigte sich zudem unabhängig vom Alter ein signifikanter Gruppenunterschied mit höheren CD8⁺ T_{EMRA} Frequenzen für CMV⁺ Spender ($p=0,000$). Dieses Ergebnis zeigte sich auch bei Betrachtung des gesamte T-Zell-Pools ($p=0,000$). Des Weiteren ergab sich für die CD8⁺ T_{EMRA} eine positive Alterskorrelation für das CMV⁺ Spenderkollektiv ($p=0,039$), nicht aber für die CMV⁻ Spender. Eine positive Alterskorrelation zeigte sich auch hinsichtlich der CD4⁺ T_{EMRA} ($p=0,02$), allerdings unabhängig vom CMV-Status sowohl innerhalb des CD4⁺ als auch des globalen CD3⁺ T-Zell-Pools ($p=0,001$). Zusätzlich wurde eine signifikant geringere Frequenz an naiven CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen innerhalb der CMV⁺ Donoren (jeweils $p=0,013$) sowie eine inverse Alterskorrelation unabhängig vom CMV-Status innerhalb der CD8⁺ naiven T-Zell-Frequenzen ($p<0,0001$) nachgewiesen. Letztere zeigte sich auch bezogen auf den gesamten T-Zell-Pool ($p=0,000$). Weiterhin wurden bezogen auf den gesamten T-Zell-Pool signifikant geringere Frequenzen von CD4⁺ T_{NAIVE} nachgewiesen. Signifikanzwerte und grafische Darstellung siehe Tabelle 13 und 15 sowie Abbildungen 8 und 10. Die

Analyse (siehe Abbildung 9) der absoluten Zell-Zahlen ergab einen signifikanten Interaktionseffekt mit positiver Korrelation von biologischem Alter und $CD8^+ T_{EMRA}$ Zellzahl für Donoren mit positivem CMV-Infektionsstatus ($p=0,004$). Die absolute $CD8^+ T_{EMRA}$ Zellzahl war zudem auch unabhängig vom Alterseffekt signifikant höher bei CMV^+ Spendern im Vergleich zu negativem Infektionsstatus ($p=0,004$). Hinsichtlich der absoluten $CD4^+ T_{EMRA}$ wurden keine signifikanten Ergebnisse nachgewiesen. Des Weiteren zeigte sich unabhängig vom CMV-Status eine signifikant inverse Korrelation der absoluten $CD8^+ T_{NAIVE}$ Zellzahlen mit dem biologischen Alter ($p<0,001$). Alle Signifikanzwerte siehe Tabelle 14. Um einen möglichen Zusammenhang zwischen der Abnahme der T_{NAIVE} und der Zunahme der T_{EMRA} aufzuzeigen, wurden Verhältnisse gebildet und hinsichtlich des Einflusses von CMV-Status und Alter analysiert. Es zeigten sich für die $CD8^+ T_{EMRA}/T_{NAIVE}$ eine signifikant höhere ($p<0,001$) und mit dem Alter positiv korrelierte Ratio ($p=0,002$) für die CMV^+ Spender. Für die CMV^- Donoren zeigte sich kein solcher Alterseffekt. Die $CD4^+ T_{EMRA}/T_{NAIVE}$ Ratio zeigte unabhängig vom CMV-Status eine signifikant positive Alterskorrelation ($p=0,013$).

Zusammenfassend konnten in der erfassten Stichprobe sowohl isolierte Einflüsse von CMV-Status und biologischem Alter als auch Interaktionseffekte beider Faktoren auf den naiven T-Zell-Pool und die T_{EMRA} nachgewiesen werden. Ein positiver Infektionsstatus ging dabei insbesondere mit einer geringeren Frequenz von $CD4^+$ und $CD8^+ T_{NAIVE}$ sowie einer höheren und innerhalb $CD8^+$ positiv alterskorrelierten Frequenz an T_{EMRA} einher. Das Verhältnis von $CD8^+ T_{EMRA}/T_{NAIVE}$ war im CMV^+ Spenderkollektiv höher und positiv alterskorreliert.

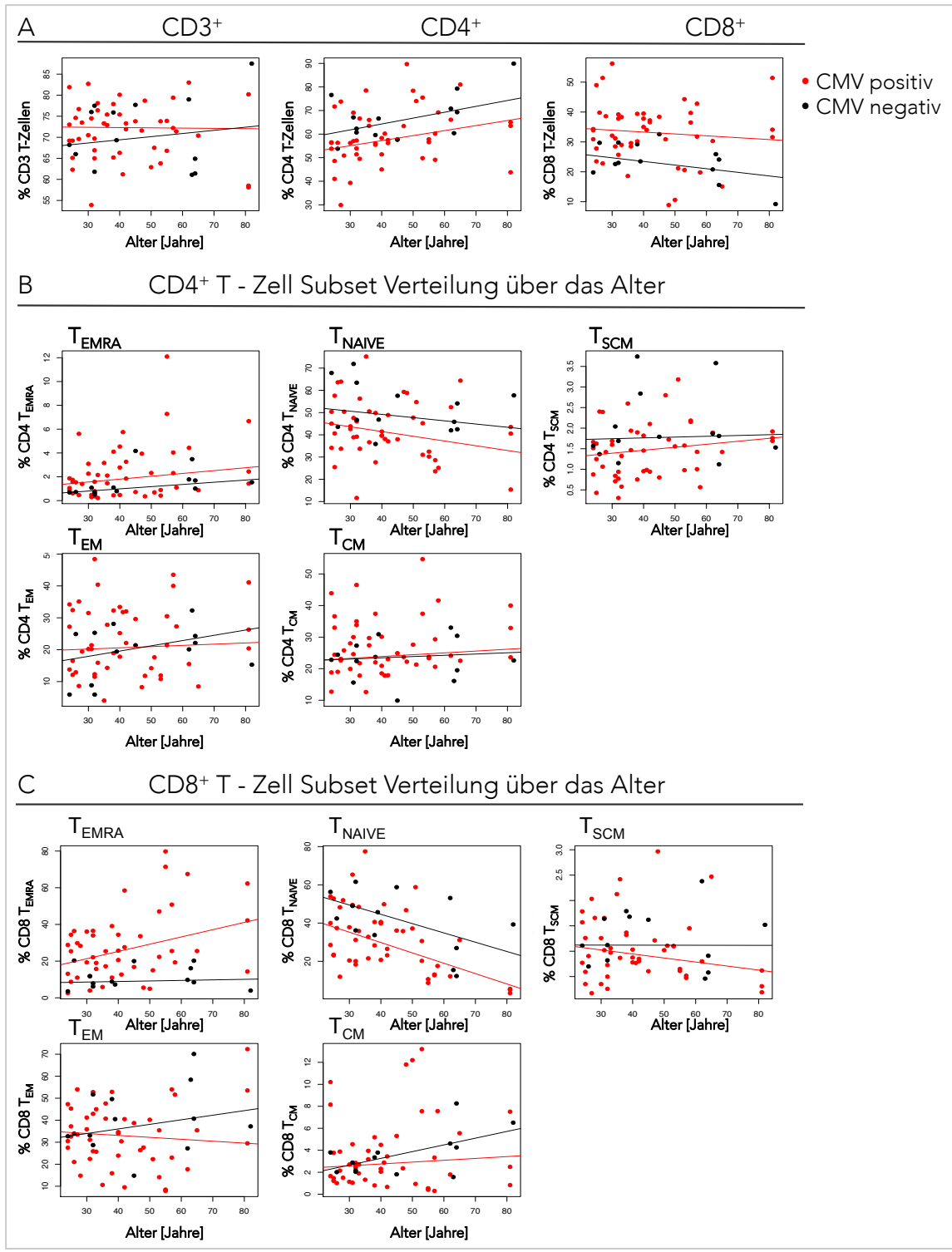


Abbildung 8. CMV-Status und Alter korreliert mit CD4⁺ und CD8⁺ T_{EMRA} und naiven T-Zell-Frequenzen. Bestimmung der T-Zell-Frequenz entsprechend **Abbildung 6**. Robuste Regressionsanalyse von PBMCs CMV⁺ und CMV⁻ Donoren über das Alter mit Darstellung der Regressionsgeraden (rote und schwarze Linien). Statistische Berechnung mit R wie unter 4.2.1. erläutert. A) Positive Alterskorrelation CMV⁺ Donoren innerhalb CD4⁺. B) Positive Alterskorrelation innerhalb der CD4⁺ T_{EMRA}, CMV⁺ Donoren weisen geringere naive CD4⁺ T-Zell-Frequenzen auf. C) Inverse Beziehung naiver CD8⁺ T-Zellen und Alter; innerhalb CMV⁺-Donoren geringere Frequenzen von CD8⁺ T_{NAIVE}. Höhere und positiv-alterskorrelierte

CD8⁺ T_{EMRA} innerhalb der CMV⁺-Spender. Signifikanzanalysen siehe Tabelle 13. Analyse von PBMCs aus humanem Spenderblut von 47 CMV⁺ und 13 CMV⁻ Donoren.

Tabelle 13. Signifikanzanalysen von Alter und CMV-Serostatus innerhalb der CD3⁺/4⁺/8⁺ T-Zell-Frequenzen.

T-Zell Subset	Interaktion CMV vs. Alter P-Wert	Gesamt	Alter		CMV Serostatus P-Wert
			P-Wert CMV +	CMV -	
CD3	0,655	0,98			0,887
CD8	0,794	0,245			0,001
CM	0,052	0,244	0,719	0,132	0,467
EM	0,002		0,68	0,245	0,212
EMRA	0,006		0,039	0,77	0,000
SCM	0,735	0,374			0,175
NAIVE	0,976	0,000			0,013
CD4	0,441	0,005			0,023
CM	0,82	0,726			0,254
EM	0,034		0,757	0,441	0,355
EMRA	0,48	0,02			0,148
SCM	0,51	0,08			0,057
NAIVE	0,497	0,29			0,013

Anmerkungen. Um Alters- und CMV-Effekte auf die T-Zell-Frequenzen zu differenzieren bzw. Interaktionen beider Variablen aufzuzeigen, wurden mittels ancGpar Test für nicht-parametrische Stichproben der Software R zunächst Interaktionseffekte (Alter:CMV) berechnet. Bei signifikanter Interaktion wurden nachfolgende Spearman-Korrelationen zu Alterseffekten getrennt nach CMV-Status berechnet, bei nicht-signifikantem Ergebnis für die gesamte Kohorte. Der Einfluss des CMV-Status auf T-Zell-Frequenzen wurde mittels Wilcoxon Mann-Whitney Test adjustiert für das Alter berechnet. P-Wert = Signifikanz.

Tabelle 14. Signifikanzanalysen von Alter und CMV-Status innerhalb der CD3⁺/4⁺/8⁺ absoluten T-Zell-Zahlen.

T-Zell Subset	Interaktion CMV:Alter P-Wert	Gesamt	Alter		CMV Status
			P-Wert CMV +	CMV -	P-Wert
CD3	0,191	0,469			0,089
CD8	0,347	0,125			0,097
CM	0,133	0,901			0,709
EM	0,577	0,351			0,956
EMRA	0,004		0,17	0,912	0,004
SCM	0,567	0,189			0,740
NAIVE	0,889	0,036			0,446
CD4	0,816	0,736			0,346
CM	0,008		0,598	0,178	0,066
EM	0,252	0,493			0,945
EMRA	0,524	0,652			0,193
SCM	0,722	0,988			0,245
NAIVE	0,085	0,499			0,239

Anmerkungen. Um Alters- und CMV-Effekte auf die T-Zell-Frequenzen zu differenzieren bzw. Interaktionen beider Variablen aufzuzeigen, wurden mittels ancGpar Test für nicht-parametrische Stichproben der Software R zunächst Interaktionseffekte (Alter:CMV) berechnet. Bei signifikanter Interaktion wurden nachfolgende Spearman-Korrelationen zu Alterseffekten getrennt nach CMV-Status berechnet, bei nicht-signifikantem Ergebnis für die gesamte Kohorte. Der Einfluss des CMV-Status auf T-Zell-Frequenzen wurde mittels Wilcoxon Mann-Whitney Test adjustiert für das Alter berechnet. P-Wert = Signifikanz.

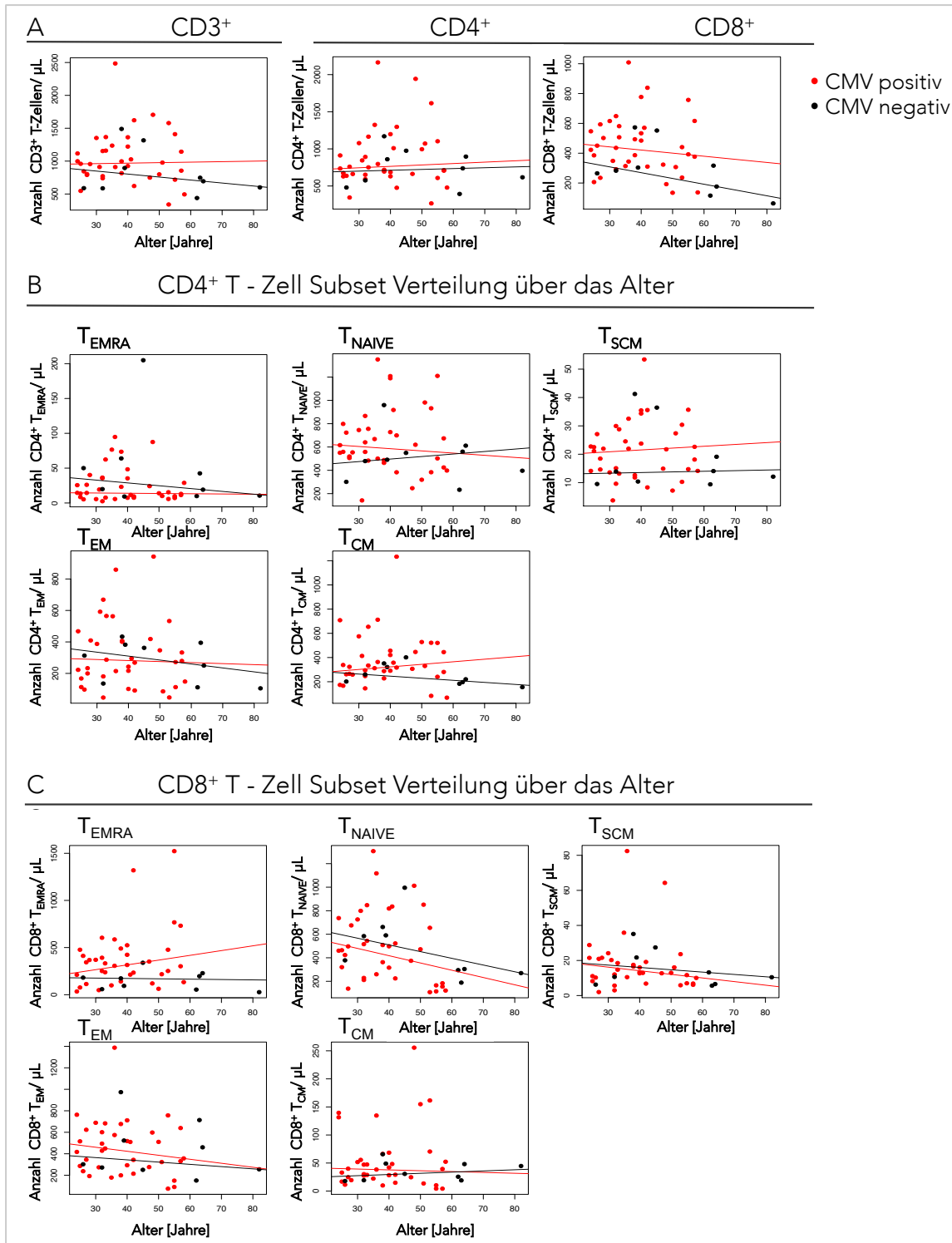


Abbildung 9. CMV⁺ Donoren zeigen höhere absolute CD4⁺ und positiv alterskorrelierte CD8⁺ T_{EMRA} Zellzahlen. Bestimmung der absoluten T-Zell-Zahlen anhand der in **Abbildung 6** erfassten T-Zell-Frequenzen pro μ L Vollblut. Robuste Regressionsanalyse von PBMCs CMV⁺ und CMV⁻ Donoren über das Alter mit Darstellung der Regressionsgeraden (rote und schwarze Linien). Statistische Berechnung mit R wie unter 6.2.1 erläutert. A) Höhere CD8⁺ T-Zell-Zahlen für CMV⁺-Spender. B) Höhere T_{EMRA} und geringere T_{NAIVE} innerhalb CMV⁺ CD4⁺ T-Zellen. C) CMV⁺ Donoren zeigen höhere und positiv-alterskorrelierte CD8⁺ T_{EMRA}. Genauere

Angaben zu den Signifikanzanalysen siehe Tabelle 14. Analyse von PBMCs aus humanem Spenderblut von 37 CMV⁺ und 9 CMV⁻ Donoren.

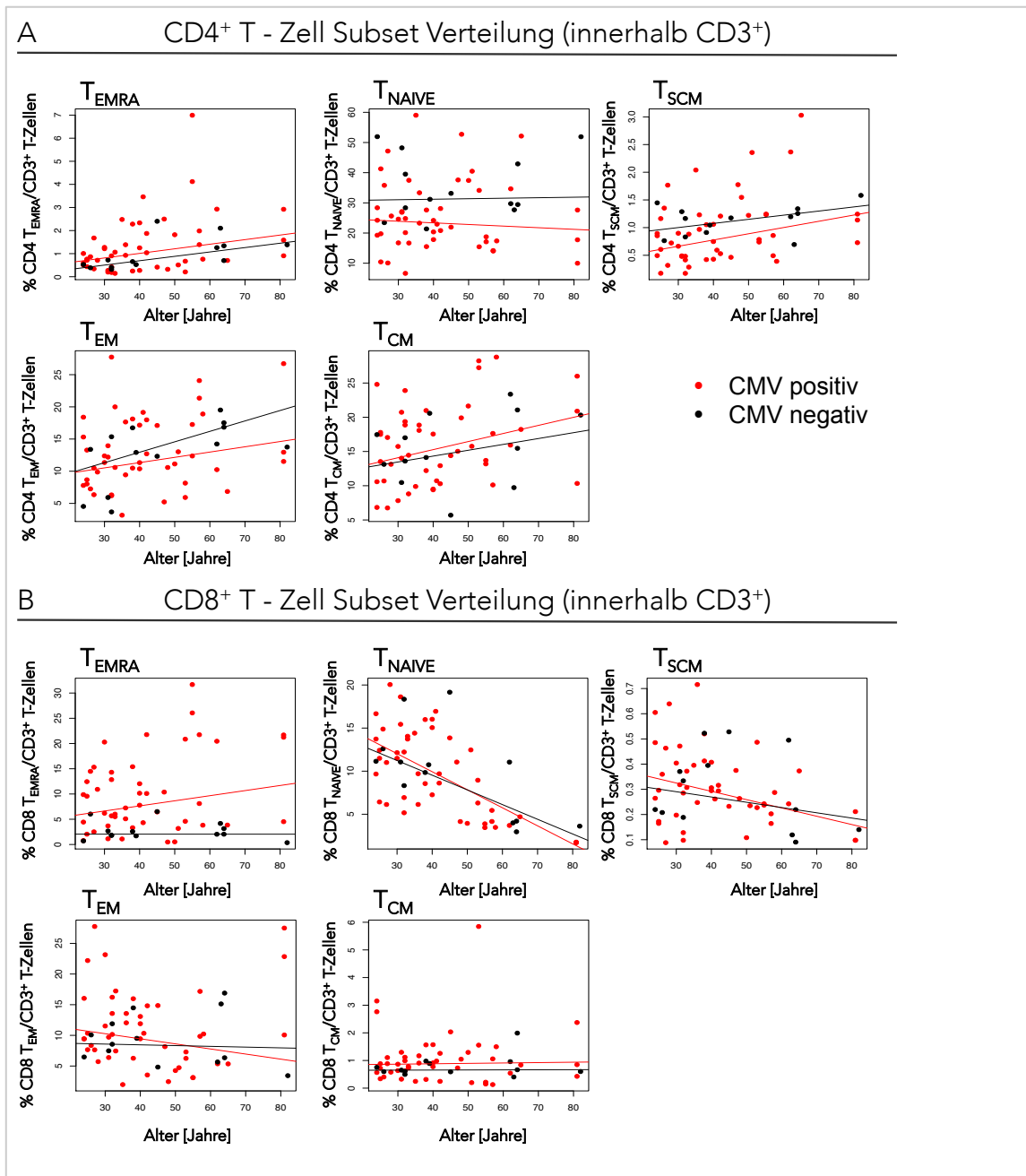


Abbildung 10. Auswirkungen von CMV- Status und Alter auf die proportionalen Anteile des Gesamt- T-Zell-Pools. Bestimmung der T-Zell-Frequenz entsprechend Abbildung 6. Robuste Regressionsanalyse von PBMCs CMV⁺ und CMV⁻ Donoren über die Altersspanne mit Darstellung der Regressionsgeraden (rote und schwarze Linien). Statistische Berechnung mit R wie unter 6.2.1. erläutert. A) CMV⁺ Donoren weisen höhere CD8⁺ T_{EMRA} Frequenzen auf, sowie inverse Alterskorrelationen für T_{SCM} und T_{NAIVE}. B) Positive Beziehung zwischen Alter und Frequenz CD4⁺ T_{EM}, T_{EMRA} und T_{SCM}. Zudem geringere Frequenz naiver CD4⁺ T-Zellen bei CMV⁺-Spendern. Signifikanzanalysen siehe

Tabelle 15. Signifikanzanalysen von Alter und CMV- Status bezogen auf den gesamten T- Zell- Pool.

T-Zell Subset	Interaktion CMV:Alter P-Wert	Alter		CMV Status
		Gesamt	P-Wert CMV +	CMV - P-Wert
CD8				
CM	0,971	0,864		0,298
EM	0,001		0,207	0,615
EMRA	0,052	0,509	0,150	0,971
SCM	0,790	0,041		0,886
NAIVE	0,126	0,000		0,615
CD4				
CM	0,459	0,057		0,809
FM	0,051	0,014	0,152	0,019
EMRA	0,401	0,001		0,333
SCM	0,100	0,020		0,101
NAIVE	0,999	0,866		0,006

Anmerkungen. Test auf Interaktionseffekte von Alter und CMV-Status mittels ancGpar-Test für nicht-parametrische Stichproben. Alterseffekt mittels Spearman-Korrelation für nicht-parametrische Stichproben für die gesamte Stichprobe oder bei signifikantem ancGpar Test getrennt nach CMV-Status. CMV-Status mittels Wilcoxon Mann-Whitney Test adjustiert für das Alter. P-Wert = Signifikanz. Analyse von PBMCs 47 CMV⁺ und 13 CMV⁻ Spender.

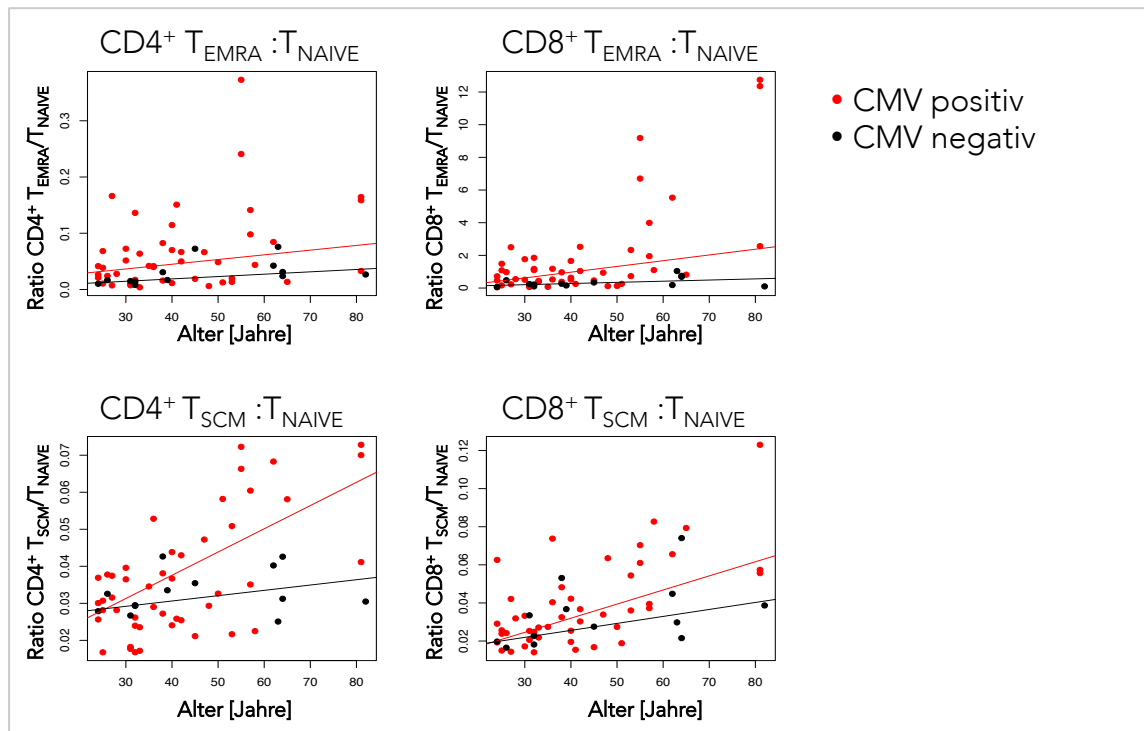


Abbildung 11. Das Verhältnis von T_{EMRA} bzw. T_{SCM} zu naiven $CD8^+$ T-Zellen ist innerhalb CMV^+ Spender positiv alterskorreliert. Bestimmung der T-Zell-Frequenz entsprechend Abbildung 6. Robuste Regressionsanalyse von PBMCs CMV^+ und CMV^- Donoren über die Altersspanne mit Darstellung der Regressionsgeraden (rote und schwarze Linien). Statistische Berechnung mit R wie unter 6.2.1. erläutert. Signifikante Interaktionseffekte und positive Alterskorrelationen für die Ratios von $CD8^+ T_{EMRA}/T_{NAIVE}$ sowie $CD4^+$ und $CD8^+ T_{SCM}/T_{NAIVE}$. Signifikanzanalysen siehe Tabelle 16. Analyse von PBMCs aus humanem Spenderblut von 47 CMV^+ und 13 CMV^- Donoren.

Tabelle 16. Signifikanzanalysen der Ratios von T_{EMRA} bzw. T_{SCM} zu naiven T-Zellen innerhalb CD4⁺ und CD8⁺.

	Interaktion CMV:Alter P-Wert	Alter		CMV Status P-Wert	
		Gesamt	P-Wert CMV + CMV -		
CD8 T _{EMRA} /T _{NAIVE}	0,010		0,002	0,211	0,0000
CD8 T _{SCM} /T _{NAIVE}	0,000		0,000	0,048	0,151
CD4 T _{EMRA} /T _{NAIVE}	0,38	0,013			<i>0,067</i>
CD4 T _{SCM} /T _{NAIVE}	0,016		0,001	0,314	0,239

Anmerkungen. Test auf Interaktionseffekte von Alter und CMV-Status mittels ancGpar-Test für nicht-parametrische Stichproben. Alterseffekt mittels Spearman-Korrelation für nicht-parametrische Stichproben für die gesamte Stichprobe oder bei signifikantem ancGpar Test getrennt nach CMV-Status. CMV-Status mittels Wilcoxon Mann-Whitney Test adjustiert für das Alter. P-Wert = Signifikanz. Analyse von PBMCs 47 CMV⁺ und 13 CMV⁻ Spender.

6.3. CMV-spezifische T-Zell-Antwort

Im folgenden Kapitel werden die Ergebnisse zu den Peptidstimulationsversuchen dargestellt. Zunächst wird kurz die Gating-Strategie erläutert und im weiteren Verlauf die Verteilung der antigen-spezifischen Zellen innerhalb des T-Zell-Pools sowie die Polyfunktionalität der einzelnen Subsets aufgezeigt.

6.3.1. Gating-Strategie und virus-spezifische Reaktivität der T-Zell-Subsets

Um spezifische Aktivierung anzunehmen, wurde $\text{IFN}\gamma$ gegen den Aktivierungsmarker CD137 ausgewertet. $\text{IFN}\gamma$ wird sowohl von CD4^+ als auch CD8^+ T-Zellen nach Antigenkontakt produziert und wurde deshalb zur Bestimmung der CMV-spezifischen T-Zellen genutzt.¹⁰⁰ Neben $\text{IFN}\gamma$ wurden als weitere Zytokine $\text{TNF}\alpha$ sowie IL-2 gemessen, welche im Rahmen der Polyfunktionalitätsanalyse der T-Zell Subsets (siehe Abschnitt 4.1.3.2.) ausgewertet wurden. Abbildung 12 zeigt die Gating-Strategie zur Identifizierung antigen-spezifischer CD4^+ und CD8^+ T-Zellen. Die Unterteilung in Effektor-, Gedächtnis- und naive T-Zellen anhand der Marker CCR7, CD45RA/RO und CD95 erfolgte analog zur Gating-Strategie in Abbildung 6. Es wurden der Anteil der einzelnen Subsets an der Gesamt-Zytokin-Immunantwort sowie die Frequenzen CMV-spezifischer Zellen pro T-Zell Subset bestimmt. Die dargestellten Frequenzen $\text{IFN}\gamma^+$ CD137^+ T-Zellen sind Differenzwerte aus stimulierten Proben abzüglich unstimulierter Proben um unspezifische Aktivierung auszuschließen.

Die mittlere Frequenz an $\text{IFN}\gamma^+$ CD137^+ Zellen innerhalb der CD4^+ T-Zellen in der gemessenen Kohorte betrug $0,13 \pm 0,18\%$. Der Anteil an T_{CM} betrug $9,8 \pm 15,9\%$; T_{EM} $66,1 \pm 25,6\%$; T_{EMRA} $14,9 \pm 19,1\%$ und T_{SCM} $0,76 \pm 1,28\%$ innerhalb der $\text{IFN}\gamma^+$ CD137^+ Zellen. Für die CD8^+ T-Zellen wurde eine mittlere Frequenz an $\text{IFN}\gamma^+$ CD137^+ Zellen von $0,66 \pm 1,07\%$ ermittelt. Der Anteil an T_{CM} betrug $2,45 \pm 4,33\%$; T_{EM} $59,9 \pm 24,8\%$; T_{EMRA} $32,9 \pm 24,9\%$ und T_{SCM} $1,16 \pm 2,57\%$ (siehe Abbildung 13 und Tabelle 17).

Die Analyse $\text{IFN}\gamma^+$ CD137^+ Zellen pro T-Zell Subset ergab für CD4^+ T-Zellen folgende Frequenzen: T_{CM} $0,03\% \pm 0,06$; T_{EM} $0,34\% \pm 0,68$; T_{EMRA} $0,64\% \pm 1,21$ und T_{SCM} $0,1\% \pm 0,29$. Innerhalb der CD8^+ T-Zellen wurden Frequenzen von T_{CM} $0,19\% \pm 0,34$; T_{EM} $1,13\% \pm 2,34$; T_{EMRA} $0,71\% \pm 1,37$ und T_{SCM} $0,17\% \pm 0,26$ gemessen. Es zeigte sich eine

starke interindividuelle Streuung insbesondere innerhalb der CD8⁺ Effektor T-Zellen mit Minimalwerten von 0,005% und Maximalwerten von 7,67% (T_{EMRA}) bzw. 0,002% und 14,3% für T_{EM}. Zusammenfassend wurden sowohl innerhalb der CD4⁺ als auch CD8⁺ T-Zellen höchste Frequenzen an IFN γ ⁺ CD137⁺ Zellen für T_{EMRA} und T_{EM} gemessen (siehe Abbildung 13 und Tabelle 17).

Die weitere Analyse der Daten ergab innerhalb der naiven T- Zellen antigenspezifische Zellen, die phänotypisch nicht den T_{SCM} zugeordnet werden konnten. 61% der Donoren wiesen CMV-spezifische naive CD8⁺ T-Zellen auf und 47% CMV-spezifische CD4⁺ T-Zellen. Ferner ergaben Korrelationsanalysen einen schwach positiven Zusammenhang zwischen dem Alter und der Frequenz antigen-spezifischer naiver CD8⁺ T-Zellen (Abbildung 14).

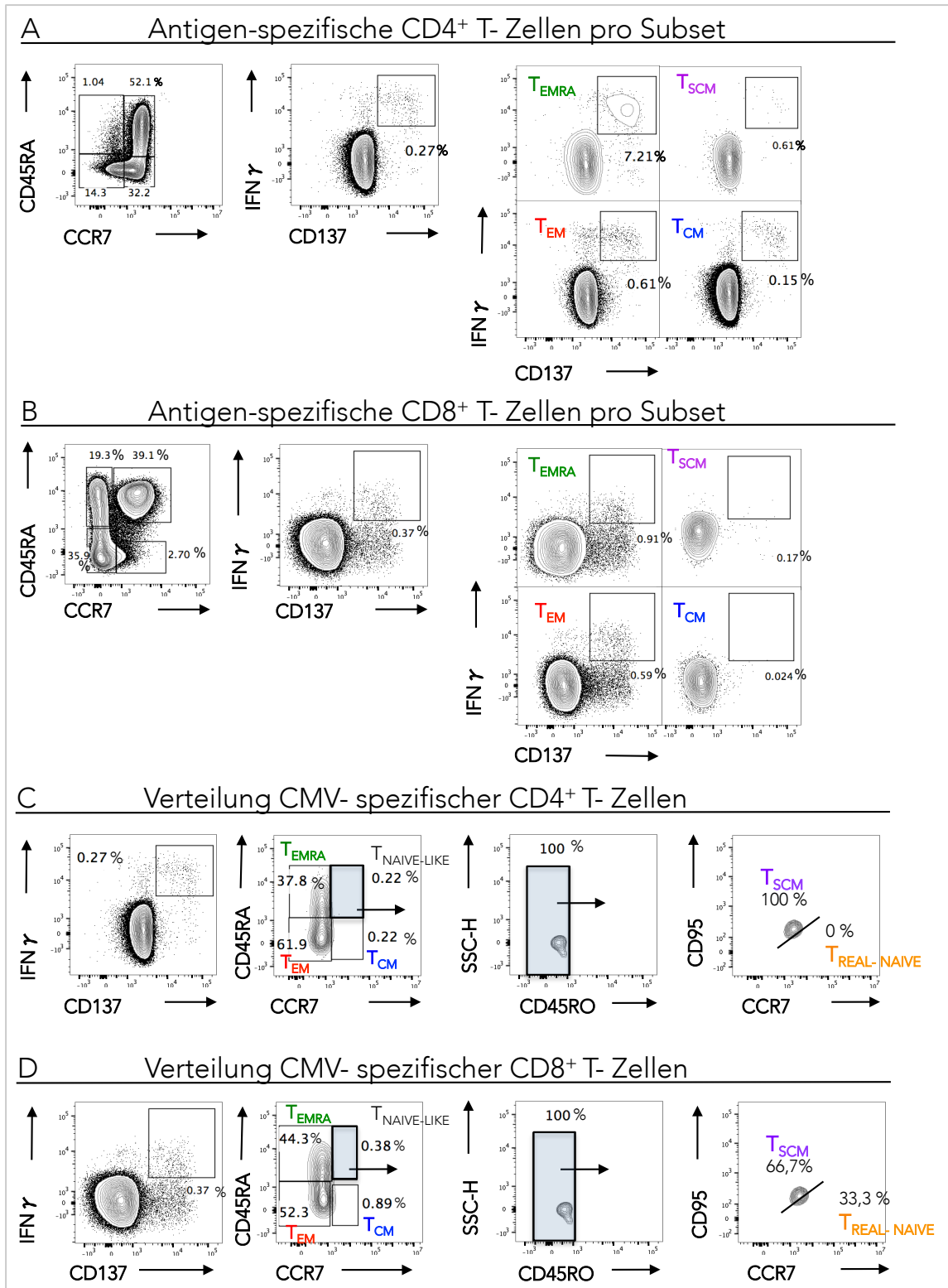


Abbildung 12. Gating-Strategie zur Identifikation CMV- spezifischer CD4⁺ und CD8⁺ T- Zellen. A) und B). Die durchflusszytometrische Analyse von PBMCs aus humanem Spenderblut eines repräsentativen Spenders zur Differenzierung und Phänotypisierung von CD4^{POS} und CD8^{POS} T-Zellen erfolgte entsprechend Abbildung 6. Zur Identifikation CMV- spezifischer Zellen (IFN γ ^{POS}CD137^{POS}) pro *Subset* wurde die Coexpression des Aktivierungsmarkers CD137 und des Zytokins IFN γ für jedes *Subset* ausgewertet. C) und D) Innerhalb der *bulk* CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen wurden die CMV-spezifischen Zellen (IFN γ ^{POS}

und CD137^{POS}) bestimmt. Anschließend erfolgte die Differenzierung der Zellen in Effektor- (T_{EMRA}), Memory- (T_{CM}, T_{EM}) und naïve-like T- Zellen anhand der Gedächtniszellmarker CD45RO/RA sowie des Homing-Rezeptors CCR7. Die Bestimmung der T_{SCM} erfolgte anhand von CCR7^{DIM} und dem Gedächtnis-T-Zellmarker CD95 (CD95⁺).

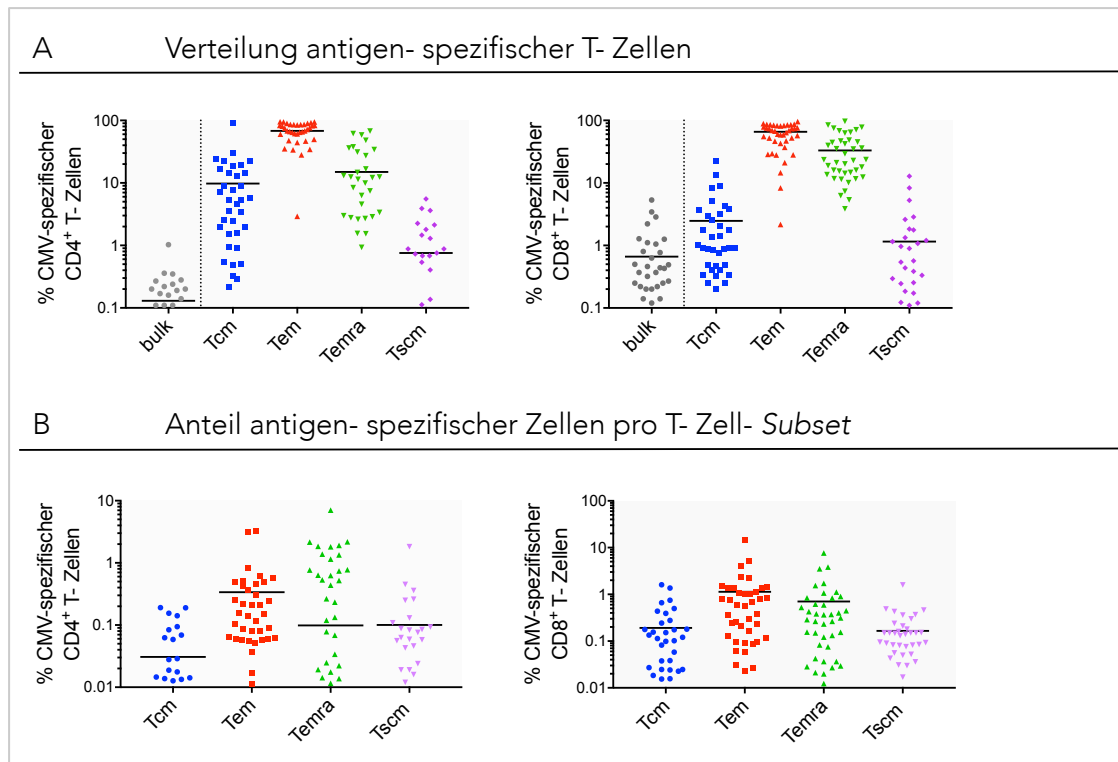


Abbildung 13. Frequenzen antigen-spezifischer CD4⁺ und CD8⁺ T- Zellen nach CMV-spezifischer Stimulation (pp65 und IE-1). Die Bestimmung der IFN γ ⁺ CD137⁺Zellen erfolgte entsprechend der in Abbildung 12 dargestellten Gating-Strategie. A) Verteilung der *bulk* Zytokin-Antwort (IFN γ ⁺, CD137⁺) innerhalb der CD4⁺/CD8⁺ T-Zell subsets. B) Anteil CMV- spezifischer CD4⁺/CD8⁺ T- Zellen pro Subset. N= 40, dargestellt ist der Mittelwert, aufgrund der logarithmischen Skalierung sind keine Nullwerte dargestellt.

Tabelle 17. Mittelwerte und Standardabweichungen der CMV-spezifischen T-Zell-Antwort. Anteil der Subsets an Gesamt-Zytokinantwort und Anteil an CMV-spezifischen T-Zellen pro Subset.

T-Zell-Subset	Verteilung der Gesamt-Zytokinantwort		Anteil je Subset	
	M (in %)	SD (in %)	M (in %)	SD (in %)
CD4 Gesamt (Bulk)	0,13	0,18		
CD4 T _{CM}	9,81	15,88	0,03	0,05
CD4 T _{EM}	66,08	24,65	0,34	0,68
CD4 T _{EMRA}	14,98	19,06	0,64	1,22
CD4 T _{SCM}	0,75	1,28	0,1	0,29
CD8 Gesamt (Bulk)	0,66	1,07		
CD8 T _{CM}	4,88	16,02	0,19	0,34
CD8 T _{EM}	59,9	24,8	1,13	2,34
CD8 T _{EMRA}	33	24,88	0,71	1,37
CD8 T _{SCM}	1,15	2,47	0,17	0,26
CD8 bulk	0,66	1,07		

Anmerkungen: M= Mittelwert, SD= Standardabweichung

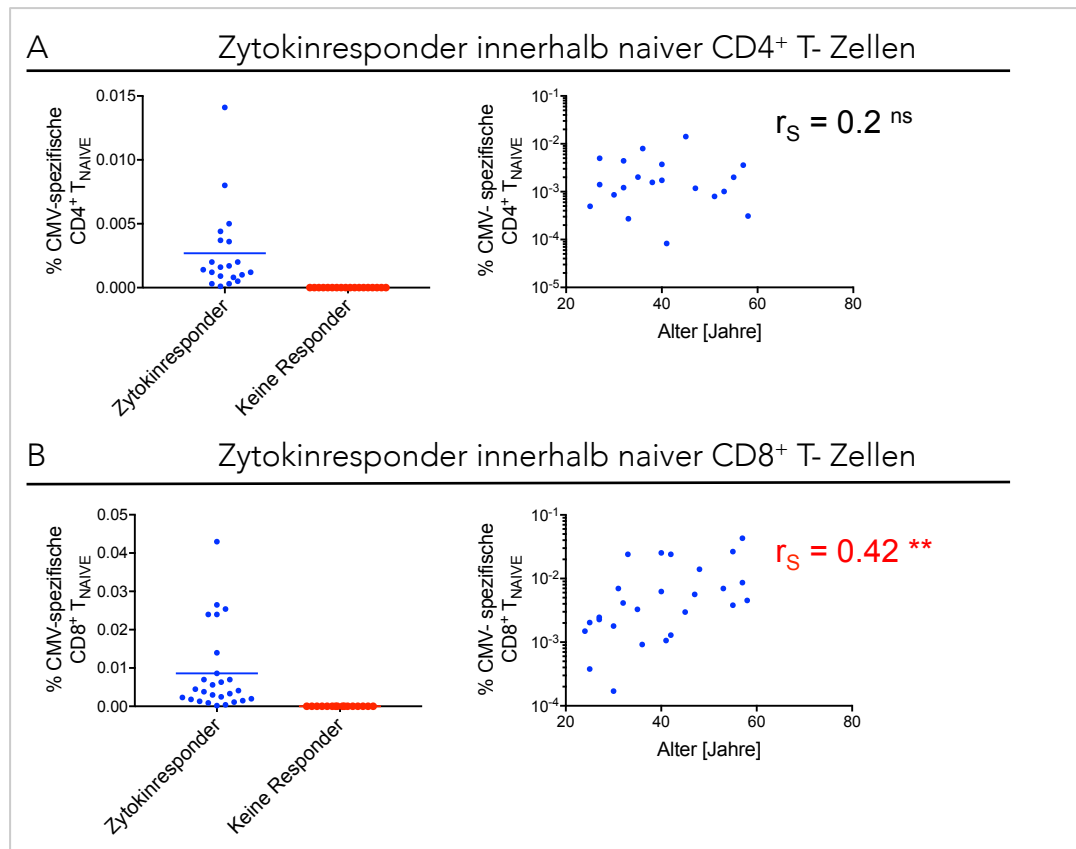


Abbildung 14. CMV-spezifische T-Zellen (IFN γ ⁺ CD137⁺) innerhalb CD4⁺ und CD8⁺ naiver T-Zellen. Die durchflusszytometrische Analyse von PBMCs aus humanem Spenderblut zur Differenzierung und Phänotypisierung von CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen erfolgte entsprechend Abbildung 6. Die Identifikation CMV- spezifischer Zellen (IFN γ ⁺CD137⁺) innerhalb des naiven CD4⁺ und CD8⁺ T-Zell Kompartments erfolgte anhand der Coexpression des Aktivierungsmarkers CD137 und des Zytokins IFN γ entsprechend Abbildung 12. Dargestellt ist die Anzahl an Donoren, die nach Stimulation IFN γ ⁺ CD137⁺ T-Zellen innerhalb des naiven CD4⁺ und CD8⁺ T-Zell Kompartments aufweisen. Korrelationsanalyse zu Frequenzen antigen-spezifischer naiver T-Zellen und dem Alter. Spearman- Korrelation; **= $p < 0.01$. Analyse von PBMCs aus humanem Spenderblut von 42 Donoren.

Weiterhin wurden Zusammenhänge zwischen globalen und antigen-spezifischen T-Zell-Frequenzen untersucht. Hinsichtlich der CD4⁺ T-Zellen konnte eine schwach signifikant inverse Korrelation ($p < 0,05$) zwischen globalen und CMV-spezifischen T-Zellen nachgewiesen werden, für CD8⁺ T-Zellen zeigte sich kein signifikanter Zusammenhang (siehe Abbildung 15). Ferner zeigte sich eine positive Korrelation zwischen der *bulk* Zytokinantwort und der Zytokinantwort innerhalb der T_{SCM} sowohl hinsichtlich CD4⁺ als auch CD8⁺ T-Zellen (CD4⁺: $p < 0,05$; CD8⁺: $p < 0,01$, siehe Abbildung 16).

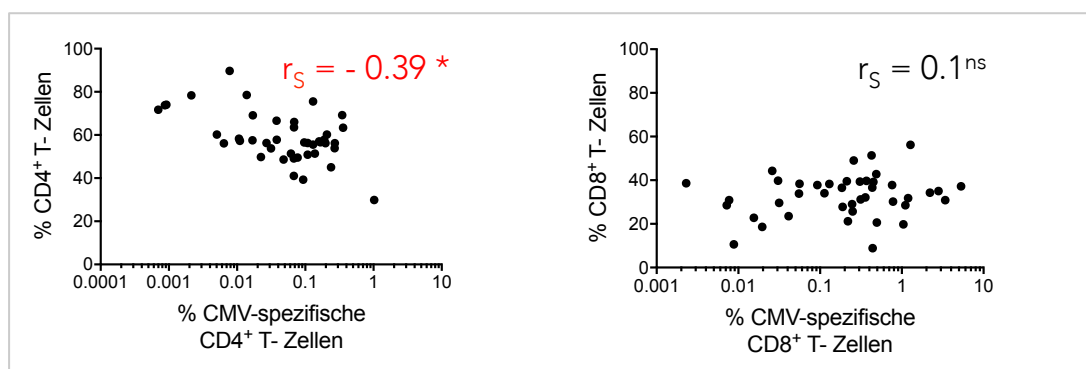


Abbildung 15. CD4⁺ T-Zell-Gesamtfrequenz ist invers mit den CMV-spezifischen CD4⁺ T-Zellen korreliert. Die durchflusszytometrische Analyse von PBMCs aus humanem Spenderblut zur Differenzierung und Phänotypisierung von CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen erfolgte entsprechend Abbildung 6. Die Identifikation CMV-spezifischer Zellen (IFN γ ⁺CD137⁺) innerhalb der CD4⁺ und CD8⁺ T-Zell Subsets erfolgte anhand der Coexpression des Aktivierungsmarkers CD137 und des Zytokins IFN γ entsprechend Abbildung 12. Spearman-Korrelation; * = $p < 0.05$. Analyse von PBMCs aus humanem Spenderblut von 42 Donoren.

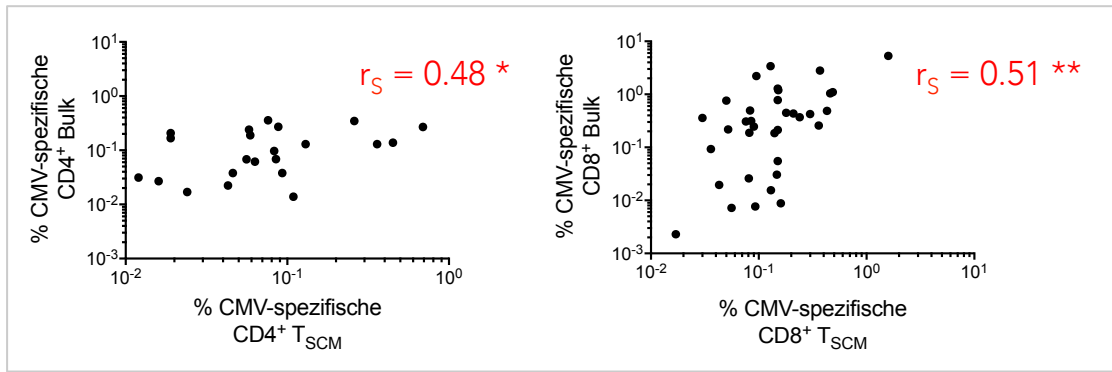


Abbildung 16. CMV- spezifische CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen sind positiv mit dem Anteil CMV- spezifischer CD4⁺ und CD8⁺ T_{SCM} korreliert. Die durchflusszytometrische Analyse von PBMCs aus humanem Spenderblut zur Differenzierung und Phänotypisierung von CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen erfolgte entsprechend Abbildung 6. Die Identifikation der CMV- spezifischen CD8⁺ T_{EMRA} erfolgte anhand der Coexpression des Aktivierungsmarkers CD137 und des Zytokins IFN γ entsprechend Abbildung 12. Spearman-Korrelation; * = p<0.05, **= p< 0.01. Analyse von PBMCs aus humanem Spenderblut von 42 Donoren.

6.3.2. Polyfunktionales Potential der T-Zell-Subsets

Die Fähigkeit von T-Zellen mehrere Effektor-Zytokine zu produzieren und zu sekretieren ist mit einer langfristig-protaktiven Immunantwort verbunden. Ferner zeigen sich Unterschiede zwischen den T-Zell Subsets hinsichtlich dieser Polyfunktionalität, dahingehend dass fröhddifferenzierte Gedächtniszellen (T_{CM}) polyfunktionaler sind als Effektorzellen.¹⁵⁶ In der vorliegenden Arbeit wurden die $CD8^+$ T-Zellen bezüglich ihrer Zytokinprofile untersucht. Dazu wurden innerhalb der aktivierten $CD137^+$ T-Zellen die Zytokine $IFN\gamma$, $TNF\alpha$ und IL-2 bestimmt. Mithilfe von *Boolean-Gating Analysen (FlowJo)* wurden die Zellen bestimmt, die positiv für zwei Zytokine waren. Diese Funktion detektiert anhand von „and“-Gates die Zell- Populationen, die positiv für zwei oder mehr Marker sind, deren Kombinationen genau definiert werden können. Anschließend wurden Prozentanteile gebildet aus den jeweiligen Zytokinen und dem Summenwert aller einfach bzw. zweifach-positiven T-Zellen. Die Ergebnisse sind in Abbildung 17 dargestellt. Die Analyse der einfach positiv aktivierten T-Zellen ($CD137^+TNF\alpha^+$, $CD137^+IFN\gamma^+$ und $CD137^+IL-2^+$) zeigt, dass $TNF\alpha$ insbesondere von Effektorzellen (T_{EM} 42,8%; T_{EMRA} 40,4%) produziert wird (im Vergleich T_{CM} 9,6% und T_{SCM} 7,2%). Hinsichtlich der IL-2 Produktion zeigten sich höchste Werte innerhalb der T_{CM} (30,6%) und T_{EM} (36,7%); der Anteil an T_{SCM} betrug 16,9% und T_{EMRA} 15,7%. Den höchsten Anteil an $IFN\gamma$ hatten T_{EM} (49,7%) und zu ähnlichen Teilen T_{EMRA} (20,3%) und T_{CM} (19,9%). Die Analyse der zweifach-Zytokin-positiven aktivierten T-Zellen ($CD137^+TNF\alpha^+IFN\gamma^+$, $CD137^+TNF\alpha^+IL-2^+$ und $CD137^+IFN\gamma^+IL-2^+$) ergab, dass der Anteil $IFN\gamma^+ TNF\alpha^+$ T-Zellen in allen Subsets am höchsten war: T_{EM} 96,9%, T_{EMRA} 96,4%, T_{SCM} 83,6% und T_{CM} 82,8% (Tabelle 18). Sowohl $IFN\gamma^+ IL-2^+$ Zellen als auch $TNF\alpha^+ IL-2^+$ T-Zellen fanden sich insbesondere innerhalb T_{CM} ($IFN\gamma^+IL-2^+$ 9%; $TNF\alpha^+IL-2^+$ 4,6%) und T_{SCM} ($IFN\gamma^+IL-2^+$ 9,8%; $TNF\alpha^+IL-2^+$ 3,7%).

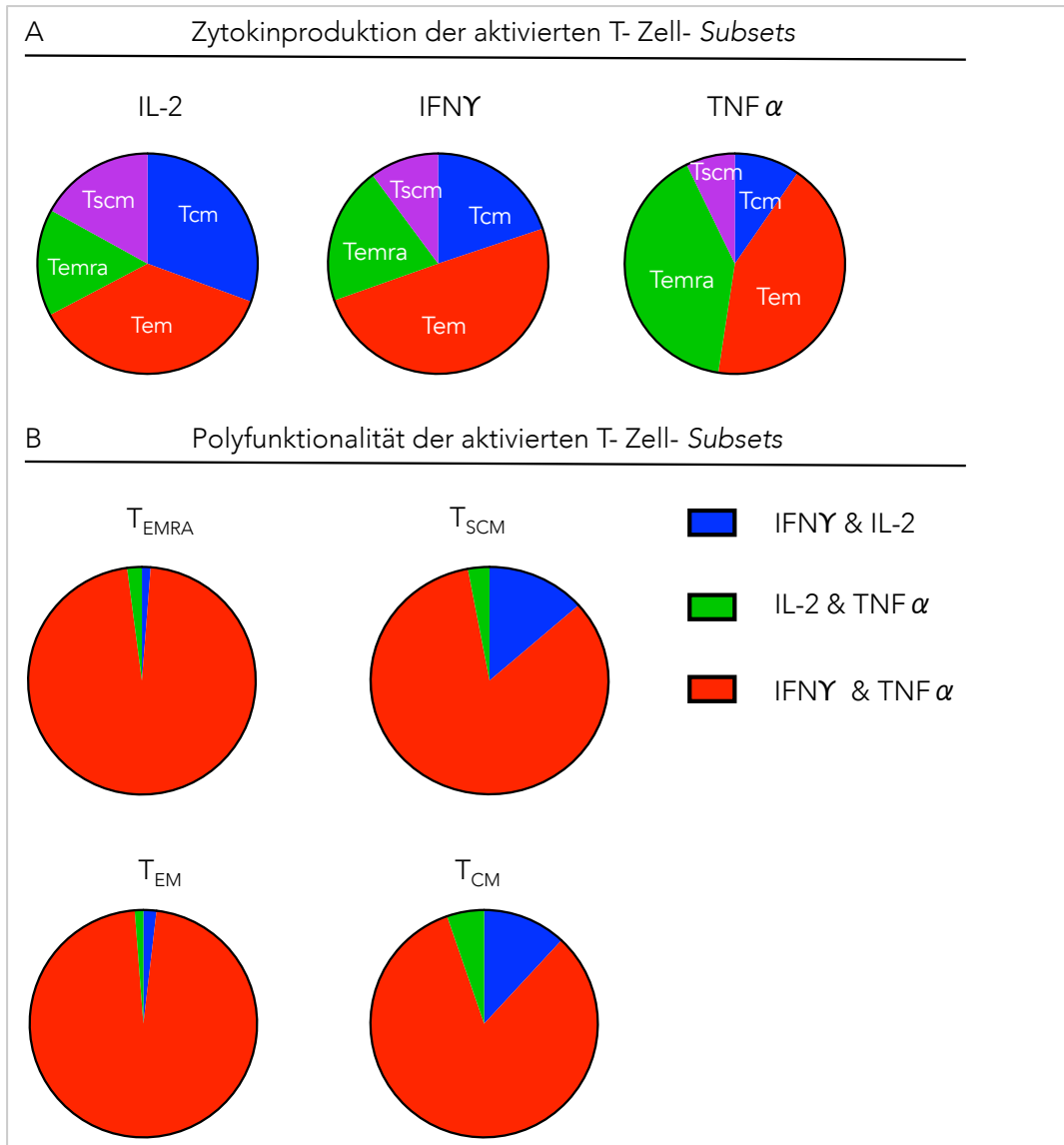


Abbildung 17. Polyfunktionalitätsanalysen der CD8⁺ T-Zell-Subsets. Die durchflusszytometrische Analyse von PBMCs aus humanem Spenderblut zur Differenzierung und Phänotypisierung von CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen erfolgte entsprechend der Abbildung 6. Es wurden zunächst die aktivierten T-Zellen (CD137⁺ CD8⁺) bestimmt und innerhalb dieser dann die Gates für die Zytokine IL-2, IFN γ und TNF α festgelegt. Für jedes Zytokin wurde dann die Verteilung der T-Zell-Subsets bestimmt (A). Mittels Boolean-Gating wurden dann die bifunktionalen T-Zellen innerhalb der einzelnen T-Zell-Subsets untersucht. Dargestellt sind die Anteile der jeweiligen Zytokin-Kombinationen an der Gesamtheit der bifunktionalen T-Zellen (B). Prozentwerte siehe Tabelle 18.

Tabelle 18. Prozentualer Anteil einfach und zweifach positiver CD8⁺ T-Zellen

T-Zell Subset	Einfach positive CD137 ⁺ T-Zellen (in %)			Zweifach positive CD137 ⁺ T-Zellen (in %)		
	TNFα ⁺	IFNγ ⁺	IL-2 ⁺	IFNγ ⁺ TNFα ⁺	IFNγ ⁺ IL-2 ⁺	TNFα ⁺ IL-2 ⁺
T _{CM}	9,6	19,9	30,6	82,8	9	4,6
T _{EM}	42,8	49,7	36,7	96,9	1,9	1,5
T _{EMRA}	40,4	20,3	15,7	96,4	1,3	2,3
T _{SCM}	7,2	10,2	16,9	83,6	9,8	3,9

6.4. Funktionalitätsanalyse der T_{scm}

Die funktionellen Eigenschaften der T_{SCM}, dabei insbesondere der CD8⁺ T_{SCM}, wurden hinsichtlich der drei Oberflächenproteine CXCR3, CX₃CR₁ und PD-1 untersucht. CXCR3 ermöglicht Rückschlüsse über die Migrations- und Homingkapazität in Entzündungsgebiete mit hoher CXCL9-111 Konzentration (IFNgamma-induzierte Entzündung), CX₃CR₁ über die Proliferations (niedrig)- vs. zytotoxische Effektorkapazität (hoch) und PD-1 über die T-Zell-Aktivierung sowie Suszeptibilität gegenüber Exhaustion (Checkpoint). Im Folgenden sind die Ergebnisse zur mittleren Fluoreszenzintensität (*Mean Fluorescence Intensity*; MFI) zunächst global für alle T-Zell-Subsets und anschließend hinsichtlich der Einflüsse von Alter und CMV-Infektionsstatus aufgeführt. Die MFI ermöglicht Rückschlüsse über die Höhe der Proteinmarkerdichte auf den T-Zellen.

6.4.1. Analyse der CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen hinsichtlich der o.g. Aktivierungsmarker

Im Folgenden sind die Ergebnisse zur mittleren Fluoreszenzintensität (*Mean Fluorescence Intensity*; MFI) zunächst global für alle T-Zell-Subsets und anschließend hinsichtlich der Einflüsse von Alter und CMV-Infektionsstatus aufgeführt. Die MFI ermöglicht Rückschlüsse über die Höhe der Proteinmarkerdichte auf den T-Zellen.

6.4.1.1. CXCR3 ist hoch exprimiert in CD8⁺ T_{CM} und T_{SCM}

In der untersuchten Stichprobe ergaben sich innerhalb der CD8⁺ T-Zellen die höchsten MFI-Werte von CXCR3 für T_{CM} (718,8 ± 199,5) und T_{SCM} (663,3 ± 177). Innerhalb der Effektor-CD8⁺-T-Zellen wurden MFI-Werte in Höhe von 537,9 ± 146,3

für T_{EM} , $520,6 \pm 145,3$ für T_{EMRA} und $522,3 \pm 140,6$ für naive T-Zellen gemessen. Die MFI-Werte für T_{SCM} waren signifikant höher als für naive T-Zellen ($p < 0,0001$), T_{EM} ($p = 0,0003$) sowie T_{EMRA} ($p < 0,0001$) (siehe Abbildung 18 und Tabelle 19). Innerhalb der $CD4^+$ T-Zell-Populationen zeigten sich die höchsten MFI-Werte innerhalb der T_{CM} ($528,9 \pm 149,8$) und die niedrigsten MFI-Werte innerhalb der naiven T-Zellen ($395,3 \pm 133,8$). Die CXCR3-MFI der $CD4^+$ T_{SCM} ergab $468,2 \pm 142,8$. Die Werte der $CD4^+$ T_{SCM} waren signifikant höher als die der naiven T-Zellen ($p = 0,0006$).

6.4.1.2. *CXCR3 ist in $CD8^+$ T_{CM} und T_{SCM} invers alterskorreliert*

Es zeigte sich für CXCR3 innerhalb der Populationen, die in der globalen Analyse die höchste MFI aufwiesen (T_{CM} und T_{SCM}) unabhängig vom CMV-Status eine signifikant inverse Alterskorrelation (T_{CM} $p = 0,002$; T_{SCM} $p = 0,04$), die bei Auftrennung nach CMV-Status ausschließlich für die CMV^+ Donoren Signifikanz erreichte (T_{CM} $p = 0,015$; T_{SCM} $p = 0,034$). Der CMV-Status allein hatte keinen signifikanten Einfluss auf die MFI von CXCR3 innerhalb dieser Subsets. Für die anderen $CD8^+$ T-Zell-Subsets wurden keine signifikanten Effekte von Alter und CMV-Status auf die Proteindichte von CXCR3 nachgewiesen. Die Analyse der globalen $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellen ergab einen signifikanten Interaktionseffekt von Alter und CMV-Infektionsstatus ($CD4^+$ $p = 0,0003$, $CD8^+$ $p = 0,0004$), dahingehend, dass ein positiver CMV-Status eine inverse und ein negativer CMV-Status eine positive Beziehung zum Alter aufwies. Es zeigte sich aber kein signifikanter Einfluss des Alters oder CMV-Status allein.

Zusammenfassend wurden in der vorliegenden Stichprobe höchste Proteindichten gemessen anhand der MFI innerhalb der fröhendifferenzierten $CD8^+$ -T-Zell-Populationen (T_{CM} und T_{SCM}) gezeigt, die insbesondere bei positivem CMV-Status invers alterskorreliert waren.

6.4.1.3. *CX_3CR_1 ist hoch exprimiert auf $CD8^+$ Effektor-T-Zellen und gering auf fröh-differenzierten T-Zellen*

Unterschiede bezüglich der MFI von CX_3CR_1 ergaben sich insbesondere innerhalb der $CD8^+$ T-Zell Subsets mit Werten in Höhe von $546,3 \pm 219$ für T_{EMRA} und $246,9 \pm 158,7$ für T_{EM} sowie $43,16 \pm 53,58$ für naive T-Zellen und $94,66 \pm 107,4$ für T_{CM} . Der MFI-Mittelwert für $CD8^+$ T_{SCM} betrug $156,4 \pm 128$ und war signifikant höher als von

naiven T-Zellen ($p < 0,0001$) und signifikant geringer als von T_{EMRA} ($p < 0,0001$) sowie T_{EM} ($p = 0,018$). Innerhalb der $CD4^+$ T-Zellen wiesen T_{SCM} eine signifikant geringere MFI als die T_{EMRA} auf ($p = 0,0001$) ansonsten ergaben sich keine signifikanten Mittelwertunterschiede. Alle Mittelwerte und Standardabweichungen der übrigen $CD4^+$ T-Zell Subsets sowie Signifikanzniveaus aller T-Zell Subsets siehe Abbildung 18 und Tabelle 19.

6.4.1.4. *Positiver CMV-Status geht mit höherer MFI von CX_3CR_1 auf $CD8^+$ T-Zellen einher*

Die Analyse der globalen $CD8^+$ T-Zellen ergab, dass ein positiver CMV-Status unabhängig vom Alter mit einer höheren Expression von CX_3CR_1 assoziiert ($p = 0,007$) war (siehe Abbildung 19 und Tabelle 20). Bei weiterführender Betrachtung der $CD8^+$ T-Zell-Subsets zeigten sich signifikante Interaktionseffekte innerhalb der $CD8^+$ T_{CM} ($p = 0,013$), T_{EM} ($p = 0,008$), T_{EMRA} ($p = 0,000$) und naiven T-Zellen ($p = 0,035$), nicht aber innerhalb der T_{SCM} . Bei letzteren wurde eine signifikant positive Alterskorrelation innerhalb der T_{SCM} unabhängig vom CMV-Status (siehe Abbildung 20 und Tabelle 21).

Für die globalen $CD4^+$ T-Zellen zeigte sich kein signifikanter Einfluss von Alter oder CMV-Infektionsstatus.

Zusammenfassend wurde in der vorliegenden Kohorte auf den $CD8^+$ T_{SCM} eine geringe MFI gemessen im Vergleich zu Effektor-T-Zellen, die eine positive Alterskorrelation aufwies. Insgesamt war innerhalb der globalen $CD8^+$ -T-Zellen ein positiver CMV-Status mit einer höheren MFI von CX_3CR_1 assoziiert.

6.4.1.5. *PD-1 Expression steigt mit zunehmender T-Zell-Differenzierung*

Hinsichtlich der Expression von PD-1 wurde mit zunehmendem Differenzierungsstatus der $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellen eine steigende MFI gemessen ($T_{EM} > T_{CM} > T_{EMRA} > T_{SCM} > T_{naive}$). Die MFI von PD-1 naiver T-Zellen ($CD4^+$ $177,3 \pm 34,67$; $CD8^+$ $171,6 \pm 36,6$) war signifikant geringer als von T_{SCM} ($CD4^+$ $224,6 \pm 57,58$; $p = 0,01$; $CD8^+$ $225,2 \pm 59,79$, $p = 0,0015$). Innerhalb der T_{CM} ($CD4^+$ $323,2 \pm 80,07$; $p < 0,0001$; $CD8^+$ $323 \pm 90,17$; $p < 0,0001$), T_{EM} ($CD4^+$ $454,8 \pm 108,6$; $p < 0,0001$; $CD8^+$

407,2 ± 104,5; p<0,0001) und T_{EMRA} (CD4⁺ 313,9 ± 96,43; p<0,0001) wurde eine signifikant höhere MFI gemessen als für T_{SCM}. Die MFI der CD8⁺ T_{EMRA} (253,1 ± 80,26) unterschied sich nicht signifikant von den T_{SCM}. Mittelwerte, Standardabweichungen und Signifikanzniveaus siehe Abbildung 18 und Tabelle 19.

Tabelle 19. Mittelwerte, Standardabweichungen und Signifikanzniveaus der Mittleren Fluoreszenzintensität der Aktivierungsmarker CXCR3, CX₃CR₁ und PD-1.

	Aktivierungs- marker	Mittlere Fluoreszenzintensität M	SD	Signifikanz
CD4 T _{CM}	CXCR3	528,9	149,8	ns.
CD4 T _{EM}		520,5	141,1	ns.
CD4 T _{EMRA}		476,1	139,4	ns.
CD4 T _{SCM}		468,2	142,8	ns.
CD4 T _{NAIVE}		395,3	113,8	p=0,026
CD8 T _{CM}		718,8	199	ns.
CD8 T _{EM}		537,9	146,3	p=0,0003
CD8 T _{EMRA}		520,6	142,8	p<0,0001
CD8 T _{SCM}		663,3	177	ns.
CD8 T _{NAIVE}		522,3	140,6	p<0,0001
CD4 T _{CM}	CX ₃ CR ₁	123,2	67,36	ns.
CD4 T _{EM}		166,2	96,49	ns.
CD4 T _{EMRA}		292,6	207,2	p=0,0001
CD4 T _{SCM}		139,4	110	ns.
CD4 T _{NAIVE}		102	68,22	ns.
CD8 T _{CM}		94,66	107,4	ns.
CD8 T _{EM}		246,9	158,7	p=0,018
CD8 T _{EMRA}		546,3	219	p<0,0001
CD8 T _{SCM}		156,4	128	ns.
CD8 T _{NAIVE}		43,16	53,58	p<0,0001
CD4 T _{CM}	PD-1	323,2	80,07	p<0,0001
CD4 T _{EM}		454,8	108,6	p<0,0001
CD4 T _{EMRA}		313,9	96,43	p<0,0001
CD4 T _{SCM}		224,6	57,58	ns.
CD4 T _{NAIVE}		177,3	34,67	p=0,01
CD8 T _{CM}		323	90,17	p<0,0001
CD8 T _{EM}		407,2	104,5	p<0,0001
CD8 T _{EMRA}		253,1	80,26	ns.
CD8 T _{SCM}		225,2	59,79	ns.
CD8 T _{NAIVE}		171,6	36,66	p=0,015

Anmerkungen. M= Mittelwert, SD= Standardabweichung ns.= nicht signifikant; p≥0,05. Testung auf signifikante Gruppenunterschiede zwischen T_{SCM} und den übrigen T-Zell Subsets mittels One-way-Anova und Kruskal-Wallis-Test für parametrische und nicht-parametrische Daten sowie post-hoc T-Tests sowie Wilcoxon-Mann-Whitney Tests. Test auf Normalverteilung mittels D'Agostino Pearson Test. Adjustierte p-

Werte für multiple Testung (Dunn's-Test). Analyse von PBMCs aus humanem Blut von 42 CMV⁺ und 12 CMV⁻ Spendern.

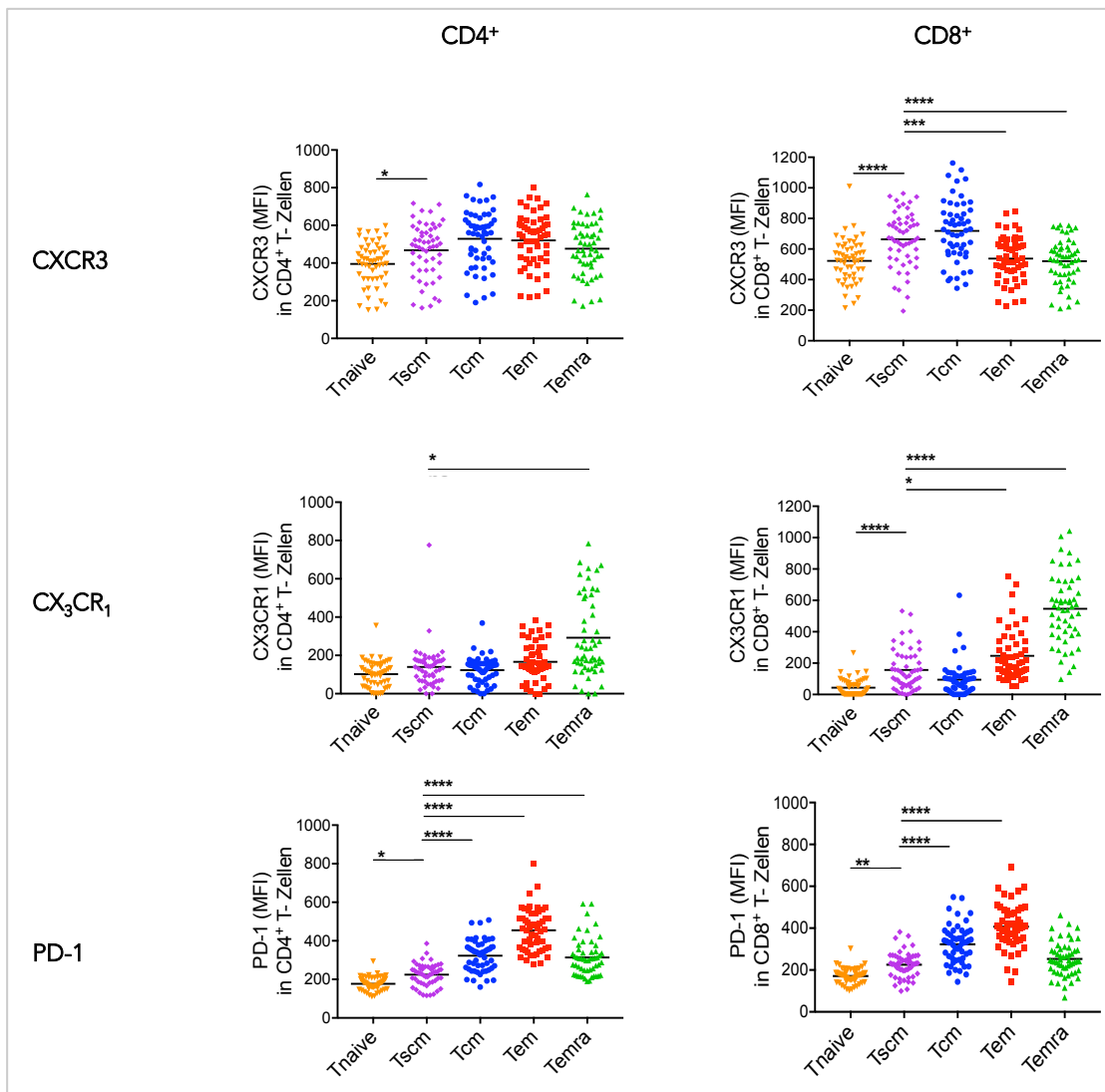


Abbildung 18. Mittlere Fluoreszenzintensität von CXCR3, CX₃CR₁ und PD-1 innerhalb der CD4⁺ und CD8⁺ T- Zell Subsets. Differenzierung der T-Zellen in terminal ausdifferenzierte (T_{EMRA}), Central/Effektor-Gedächtnis- (T_{CM}, T_{EM}) und *naïve-like* T-Zellen und T_{SCM} anhand der Gedächtniszellmarker CD45RO/RA sowie des Homing-Rezeptors CCR7 und CD95 entsprechend Abb.1. Innerhalb jedes Subsets erfolgte die Bestimmung der mittleren Fluoreszenzintensität, deren Mittelwerte dargestellt sind. Testung auf signifikante Gruppenunterschiede zwischen T_{SCM} und den übrigen T-Zell Subsets mittels One-way-Anova und Kruskal-Wallis-Test für parametrische und nicht-parametrische Daten sowie post-hoc T-Tests sowie Wilcoxon-Mann-Whitney Tests. Test auf Normalverteilung mittels D'Agostino Pearson Test. Adjustierte p-Werte für multiple Testung (Dunn's-Test). ns.= nicht signifikant, * p<0.05 ** p< 0.01, *** p<0.005, **** p< 0.001. Analyse von PBMCs aus humanem Blut von 42 CMV⁺ und 12 CMV⁻ Spendern.

6.4.1.6. MFI von PD-1 ist positiv alterskorreliert in CD4⁺ und CD8⁺

Hinsichtlich PD-1 zeigte sich unabhängig vom CMV-Status eine positive Alterskorrelation innerhalb der CD8⁺ T-Zellen (P=0,008) sowie innerhalb der CMV-CD4⁺ T-Zellen (P=0,014). Es konnte kein Einfluss des CMV-Status nachgewiesen werden. Die Analyse der CD8⁺ T-Zell-Subsets ergab in allen *Subsets* außer den naiven T-Zellen signifikante Interaktionseffekte von Alter und CMV-Status (siehe Abbildung 20 und Tabelle 21).

Zusammenfassend wurde in der vorliegenden Stichprobe bezüglich PD-1 eine mit zunehmendem Differenzierungsstatus steigende MFI gezeigt, die innerhalb der globalen CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen positiv alterskorreliert war. Die MFI innerhalb der CD8⁺ T_{EMRA} war allerdings geringer als die der T_{EM} und unterschied sich nicht signifikant von der MFI der früh-differenzierten T_{SCM}.

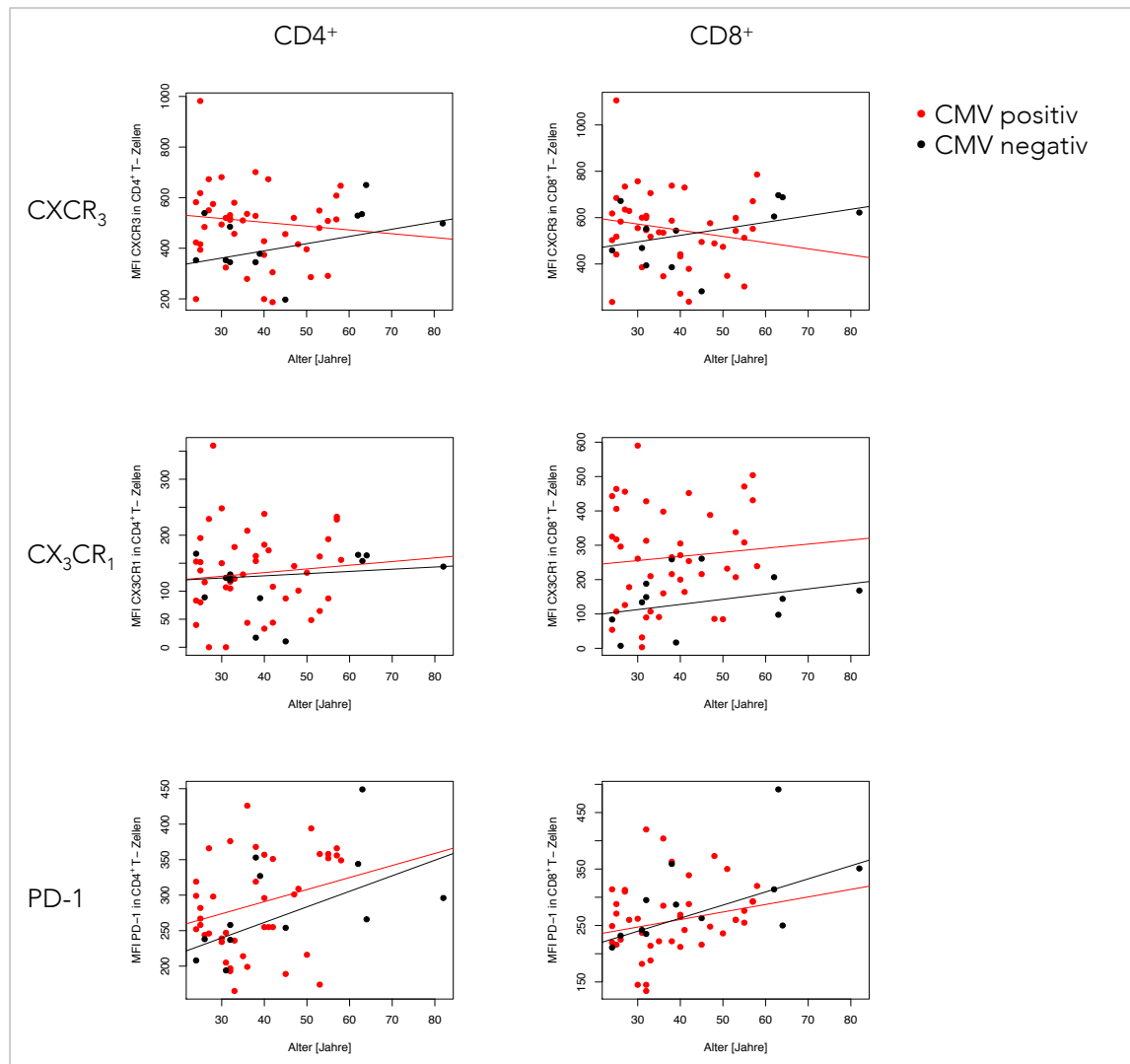


Abbildung 19. Einfluss von CMV- Status und Alter auf die MFI von CXCR3, CX₃CR₁ und PD-1 innerhalb CD4+ und CD8+ T- Zellen. Bestimmung der T-Zell-Frequenz entsprechend Abbildung 6. Robuste Regressionsanalyse von PBMCs CMV+ und CMV--Donoren über die Altersspanne mit Darstellung der Regressionsgeraden (rote und schwarze Linien). Statistische Berechnung mit R wie unter 4.2.1.erläutert. Signifikante Interaktionseffekte für CXCR3 CD4+ und CD8+. Signifikant höhere Expression von CX3CR1 in CMV-spezifischen CD8+ T-Zellen. Signifikant positive Korrelation zwischen der PD-1 Expression in CD8+ T-Zellen und CMV- CD4+ T-Zellen und dem Alter. Signifikanzanalysen siehe Tabelle 20. Analyse von PBMCs aus humanem Spenderblut von 47 CMV+ und 13 CMV-Donoren.

Tabelle 20. Signifikanzanalysen von Alters- und CMV-Status-Effekten auf die Aktivierungsmarker CXCR3, CX3CR1 und PD-1.

	Interaktion CMV:Alter P-Wert	Gesamt	Alter P-Wert		CMV Status P-Wert
			CMV+	CMV-	
CD4					
CXCR3	0,0004		0,3667	0,265	0,294
CX3CR1	ns.	0,422			0,561
PD-1	0,019		0,080	0,013	0,465
CD8					
CXCR3	0,0003		0,227	0,174	0,927
CX3CR1	ns.	0,666			0,007
PD-1	<i>0,060</i>	0,008			0,365

Anmerkungen. Test auf Interaktionseffekte von Alter und CMV-Status mittels ancGpar-Test für nicht-parametrische Stichproben. Alterseffekt mittels Spearman-Korrelation für nicht-parametrische Stichproben für die gesamte Stichprobe oder bei signifikantem ancGpar Test getrennt nach CMV-Status. CMV-Status mittels Wilcoxon Mann-Whitney Test. P-Wert = Signifikanz. Analyse von PBMCs 47 CMV⁺ und 13 CMV⁻ Spender.

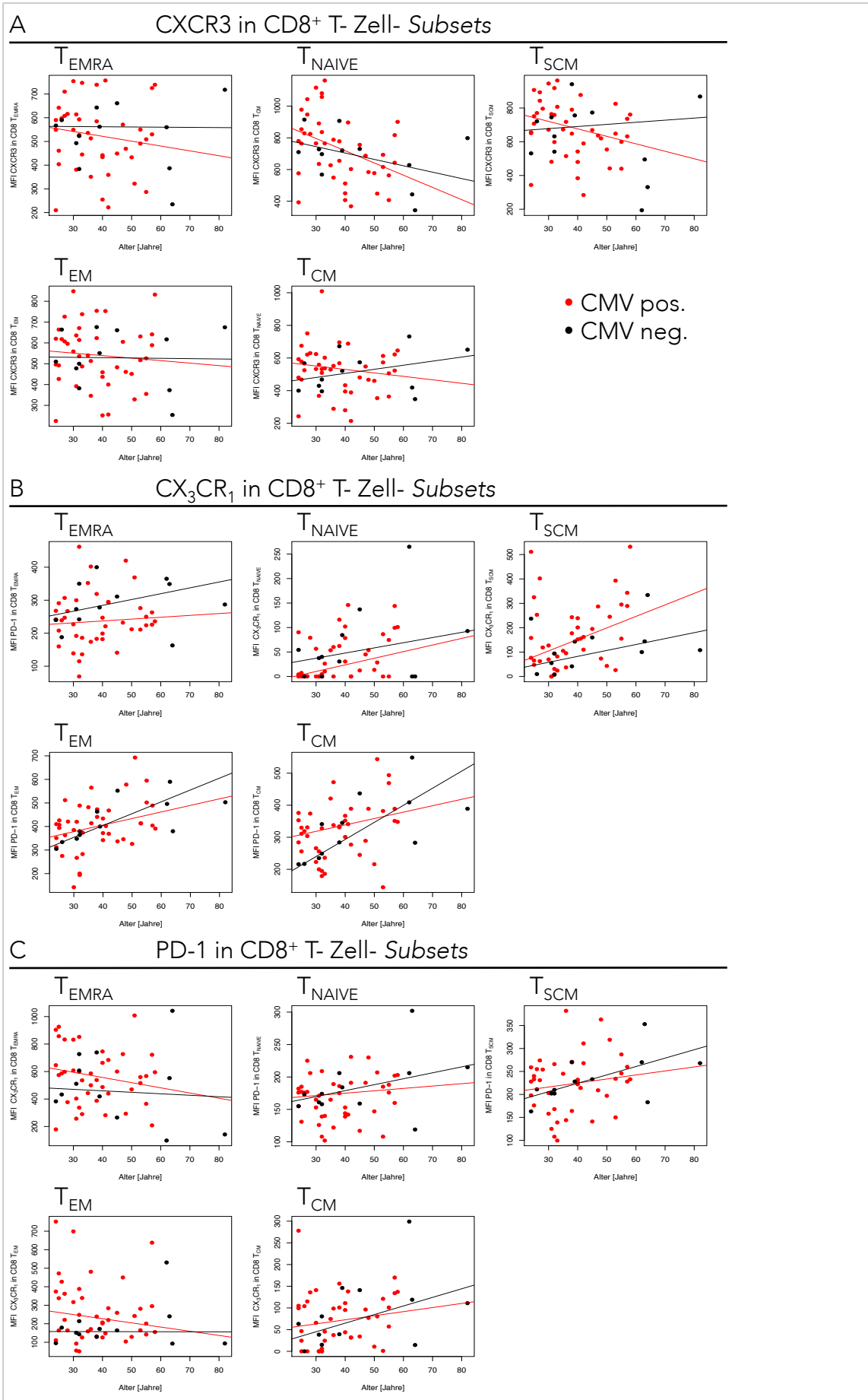


Abbildung 20. Einfluss von CMV- Status und Alter auf die MFI von CXCR3, CX₃CR₁ und PD-1 innerhalb der CD8⁺ T- Zell- Subsets. Robuste Regressionsanalyse von PBMCs CMV⁺ und CMV⁻ Donoren über die Altersspanne mit Darstellung der Regressionsgeraden (rote und schwarze Linien). Statistische Berechnung mit R wie unter 4.2.1. erläutert. CXCR3 ist in T_{CM} und T_{SCM} negativ mit dem Alter korreliert. PD-1 weist in allen T-Zell-Gedächtnis-Subsets signifikante Interaktionseffekte auf. Signifikante Interaktionseffekte für CXCR3 CD4⁺ und CD8⁺. Signifikanzanalysen siehe Tabelle 21. Analyse von PBMCs aus humanem Spenderblut von 47 CMV^{POS} und 13 CMV^{NEG} Donoren.

Tabelle 21. Signifikanzanalysen von Alters- und CMV-Status-Effekten auf die Aktivierungsmarker CXCR3, CX3CR1 und PD-1 innerhalb CD8⁺ T-Zell Subsets.

	Interaktion CMV:Alter		Alter		CMV Status
	P-Wert	Gesamt	P-Wert CMV+	CMV-	P-Wert
T_{CM}					
CXCR3	0,829	0,002	0,015	0,341	0,797
CX3CR1	0,013		0,324	0,166	0,975
PD-1	0,000		0,001	0,004	0,465
T_{EM}					
CXCR3	0,495	0,525			0,894
CX3CR1	0,000		0,273	0,803	0,090
PD-1	0,000		0,045	0,001	0,910
T_{EMRA}					
CXCR3	0,361	0,290			0,750
CX3CR1	0,008		0,246	0,753	0,393
PD-1	0,01		0,705	0,378	0,090
T_{SCM}					
CXCR3	0,646	0,041	0,034	0,871	0,674
CX3CR1	0,21	0,03			0,0862
PD-1	0,000		0,2816	0,077	0,992
T_{NAIVE}					
CXCR3	0,067	0,633			0,735
CX3CR1	0,035		0,008	0,530	0,6175
PD-1	0,11	0,152			0,662

Anmerkungen. Test auf Interaktionseffekte von Alter und CMV-Status mittels ancGpar-Test für nicht-parametrische Stichproben. Alterseffekt mittels Spearman-Korrelation für nicht-parametrische Stichproben für die gesamte Stichprobe oder bei signifikantem ancGpar Test getrennt nach CMV-Status. CMV-Status mittels Wilcoxon Mann-Whitney Test. P-Wert = Signifikanz. Analyse von PBMCs 47 CMV⁺ und 13 CMV⁻ Spender.

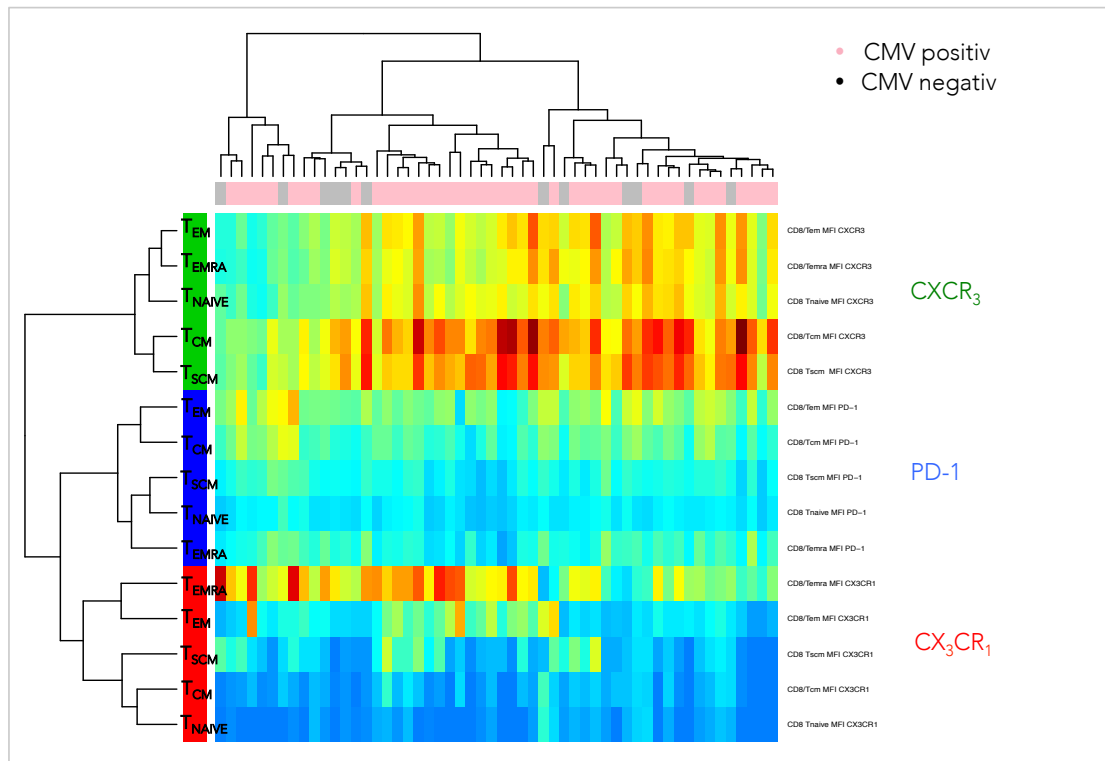


Abbildung 21. Heatmap zur MFI der Marker PD-1, CXCR3 und CX3CR1 in CD8⁺ T-Zellen. Jede Spalte stellt einen Donor dar, diese sind kodiert nach CMV- Infektionsstatus. Die Höhe der Balken zeigt das statistische Ausmaß der Ähnlichkeit bzw. Unähnlichkeit. Rot symbolisiert eine hohe MFI, blau eine niedrige. Höchste Expression von CX₃CR₁ in T_{EMRA} und CXCR3 in T_{CM} und T_{SCM}.

6.5. Knochenmark als Nische für CD8⁺ Memory- Zellen

Die Ergebnisse der vorliegenden Studie deuten darauf hin, dass sich T_{SCM} stabil über die Altersspanne verhalten. Möglicherweise könnte die Bestimmung im peripheren Blut die tatsächliche Anzahl existierender T_{SCM} unterschätzen. CD8⁺ T_{EM} nutzen das Knochenmark als Nische bevor es zu einem erneuten Antigenkontakt kommt.^{73,76,165} T_{SCM} als hoch-proliferative überdauernde T-Zell-Population könnte ebenso dort vermutet werden. Daher wurde in der vorliegenden Arbeit ein erster Versuch zur Identifizierung von T_{SCM} im Knochenmark anhand der Untersuchung gekoppelter Blut- und Knochenmarkproben von vier Spendern unternommen. Es zeigten sich geringere Expressionslevel von CCR7, CD62L sowie CD45RO/RA in den Knochenmarksproben im Vergleich zu den gekoppelten Blutproben, die eine klare Phänotypisierung und somit insbesondere einen Vergleich der T_{SCM} Frequenzen erschwerten. In Abbildung 22 sind die Frequenzen der CD4⁺ und CD8⁺ T-Zell-Subpopulationen im peripheren Blut und Knochenmark dargestellt. Dabei handelt es sich um eine rein explorative Darstellung. Da nur vier Spender in die Auswertung eingingen, ist keine statistische Auswertung erfolgt.

Innerhalb der CD4⁺ als auch CD8⁺ T-Zellen wurden in den Knochenmarksproben im Vergleich zu den gekoppelten PBMC höhere mittlere Frequenzen an T_{EM} (CD4⁺:34,73 ±7,09; CD8⁺:59,5 ±7,81) und niedrigere mittlere Frequenzen an naiven T-Zellen (CD4⁺:37,69±12,27; CD8⁺:9,82±6,51) gefunden. Die mittleren Frequenzen von CD8⁺ T_{EMRA} und T_{CM} wurden in den Knochenmarksproben (T_{EMRA}:24,73±7,01; T_{CM}:4,99±2,11) geringer gemessen als in den PBMC (T_{EMRA}: 37,35±8,06; T_{CM}: 8,58±4,19). Hinsichtlich der T_{SCM} zeigten sich keine eindeutigen Unterschiede zwischen BMMC und PBMC.

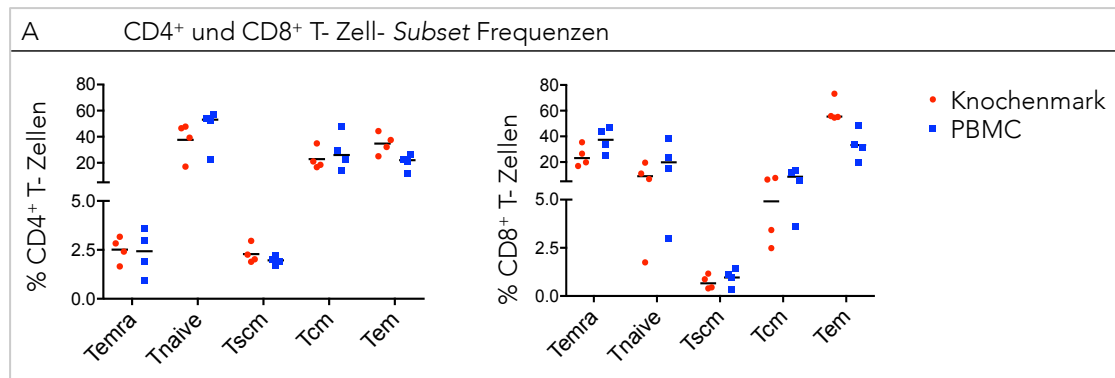


Abbildung 22. Vergleich der T- Zell- Frequenzen in Knochenmark und PBMCs in gekoppelten Proben. Phänotypisierung von PBMC und BMMC entsprechend Abbildung 6. A) T-Zell Subset Frequenzen und Mittelwerte innerhalb CD4⁺/8⁺. Höhere Frequenzen von CD8⁺ und CD4⁺ T_{EM} und geringere Frequenzen von naiven CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen im Knochenmark. Analyse von gekoppelten PBMC und BMMC Proben von vier Spendern.

Tabelle 22. Mittelwerte und Standardabweichungen von T-Zell-Frequenzen in gekoppelten PBMC und BMMC Proben von vier Spendern.

T- Zell- Subset	Knochenmark		PBMC	
	M (in %)	SD (in %)	M (in %)	SD (in %)
CD4 T _{CM}	22,8	7,16	28,58	12,36
CD4 T _{EM}	34,73	7,09	20,65	5,34
CD4 T _{EMRA}	2,52	0,56	2,35	1,01
CD4 T _{SCM}	2,29	0,41	1,97	0,18
CD4 T _{NAIVE}	37,69	12,27	46,45	13,9
CD8 T _{CM}	4,99	2,11	8,58	4,19
CD8 T _{EM}	59,7	7,81	33,33	10,32
CD8 T _{EMRA}	24,73	7,01	37,35	8,06
CD8 T _{SCM}	0,72	0,31	0,97	0,39
CD8 T _{NAIVE}	9,82	6,51	19,81	12,85

Anmerkungen. M= Mittelwert, SD= Standardabweichung

7. Diskussion

Im Zentrum der vorliegenden Arbeit stand die Bestimmung der relativen und absoluten Anzahl von CD4⁺ und CD8⁺ T_{SCM} sowie die Zusammensetzung des CD4⁺ und CD8⁺ T-Zell-Pools in einem breiten Altersrange und in Abhängigkeit vom CMV-Infektionsstatus. Des Weiteren wurde insbesondere die Funktionalität der CD8⁺ T_{SCM} anhand spezifischer Migrations-, Proliferations- und Aktivierungsmarker (CXCR3, CX₃CR₁ und PD-1) sowie der virus-spezifischen Reaktivität auf Peptidstimulation bestimmt. Dabei wurden ebenfalls mögliche Alters- und Infektionsstatureinflüsse untersucht. Ziel der Arbeit war eine genauere numerische und funktionale Typisierung dieser T-Zell-Population.

Die Ergebnisse werden entsprechend der in Kapitel 4 aufgeführten Hypothesen unter Berücksichtigung von Limitationen und Ausblick im Folgenden diskutiert.

7.1. CD4⁺ und CD8⁺ T-Zell-Pool

7.1.1. Validierung der Messung

Zur Validierung der Messungen (und des Panels) wurden zunächst relative und absolute T-Zell-Zahlen innerhalb CD4⁺ und CD8⁺ sowie die globale Zusammensetzung der CD3⁺ T-Zellen bestimmt. Der proliferative Charakter des CD4⁺ T-Zell-Pools spiegelt sich in dem großen Anteil naiver und fröhendifferenzierter T-Zellen wider (T_{CM}+T_{NAIVE} 70,71± 21,48%), nur 2,5±2,1% hatten einen terminal ausdifferenzierten Phänotyp. Der CD8⁺ T-Zell-Pool setzt sich neben einem Drittel T_{NAIVE} insbesondere aus spätdifferenzierten T-Zellen zusammen (gesamt T_{EM} und T_{EMRA} 58,78±31,96%), die unmittelbare zytotoxische Funktionen ausüben können.¹⁶⁶ Insgesamt entsprechen die gemessenen absoluten und relativen T-Zell-Zahlen den Daten des aktuellen Forschungsstandes.²⁶ Wie zuvor beschrieben, wurden die T_{SCM} aus der naive-like T-Zell-Population anhand einer mittelhohen Expression von CCR7 sowie der positiven Expression von CD95 bestimmt. Die gemessenen Frequenzen und absoluten Zellzahlen der T_{SCM} innerhalb CD4 und CD8 sind mit Ergebnissen früherer Studien vergleichbar.^{12,21,44,45}

Die dominierenden T-Zell-Populationen bei Analyse der CD3⁺ T-Zellen waren CD4⁺T_{NAIVE} und CD4⁺T_{CM} sowie CD8⁺T_{EMRA}. Letztere wiesen zusammen mit den

CD8⁺T_{NAIVE} die größten interindividuellen Differenzen auf, was sich auch in den absoluten T-Zell-Zahlen widerspiegelte. Die große Altersspanne des Spenderkollektivs sowie Unterschiede hinsichtlich des CMV-Infektionsstatus können mögliche Ursachen für die vorliegende breite Streuung darstellen.^{45,109} Um zwischen beiden Einflussfaktoren zu differenzieren, wurden robuste Regressionen mit den Variablen Alter und CMV-Status für die CD3⁺, CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen sowie deren Subpopulationen berechnet. Beim Vergleich zwischen T-Zell-Frequenzen und absoluten Zellzahlen muss beachtet werden, dass nicht für alle Donoren die absoluten T-Zellzahlen bestimmt werden konnten (46 der 60 Spender). Der Altersrange lag in der Gesamtstichprobe sowohl für Frequenzen als auch absolute Zellzahlen bei 24-82 Jahre. Sowohl in der Gesamt- als auch der CMV⁺ und CMV⁻ - Kohorten waren die Altersmittelwerte von Frequenzen und absoluten Zellzahlen nicht signifikant unterschiedlich. Somit sind Vergleiche zwischen Frequenzen und absoluten Zellzahlen möglich. 78% (Frequenzen) bzw. 80% (absolute Zellzahlen) der untersuchten Spender wiesen einen positiven CMV-Status auf.

7.2. T_{SCM} als altersunabhängiger stabiler Grundpfeiler der T-Zell-Immunität

In der vorliegenden Studie zeigte sich kein signifikanter Einfluss des Alters auf relative und absolute CD4⁺ und CD8⁺ T_{SCM}. Diese Ergebnisse bestätigen frühere Studien^{44,45,167} und deuten darauf hin, dass die T_{SCM} einen Grundpfeiler der T-Zell-Immunität bilden, der mit zunehmendem Alter stabil bestehen bleibt. In Bezug auf den Gesamt-T-Zell-Pool ergaben sich steigende Frequenzen von CD4⁺ T_{SCM} und sinkende Frequenzen von CD8⁺ T_{SCM} mit zunehmendem Alter. Die relative Abnahme der CD8⁺ T_{SCM} bezogen auf den Gesamt-T-Zell-Pool ist möglicherweise auf die starke Abnahme der absoluten naiven CD8⁺ T-Zellen mit steigendem Alter zurückzuführen. Dafür muss die zugrundeliegende Gating-Strategie berücksichtigt werden: die T_{SCM} werden aus der naiven T-Zell-Population heraus anhand der fehlenden Expression von CD45RO sowie der Expression von CCR7 und CD95 definiert. Zudem handelt es sich um eine sehr kleine Zell-Population, insbesondere im Verhältnis zum großen Anteil naiver T-Zellen. Somit könnte sich trotz stabiler absoluter CD8⁺ T_{SCM}-Zahlen infolge der starken Abnahme der naiven CD8⁺ T-Zellen eine relative Abnahme

ergeben. Dies würde gleichsam die steigende CD4⁺T_{SCM}-Frequenz erklären, da die relativen und absoluten naiven CD4⁺ T-Zellzahlen konstant bleiben.

Weiterführende Analysen der Ratios von CD4⁺ und CD8⁺ T_{SCM}/T_{NAIVE} ergaben eine signifikant positive Alterskorrelation, was bedeutet, dass bei relativer Abnahme der T_{NAIVE} der Anteil von T_{SCM} konstant bleibt. Die Analyse ergab darüberhinaus für beide T-Zell-Populationen einen Interaktionseffekt (CMV-Status:Alter) dahingehend, dass dieser Effekt bei vorliegender CMV-Infektion stärker ausgeprägt ist (Abbildung 19). Letzter könnte mit der CMV-bedingten zunehmenden Abnahme naiver T-Zellen zusammenhängen. Insgesamt deuten die vorliegenden Ergebnisse darauf hin, dass die T_{SCM} über eine breite Altersspanne hinweg trotz starker Abnahme naiver T-Zellen in konstanter Anzahl vorliegen.^{18,19,44} Dies könnte auf das höhere proliferative und homöostatische Potential der T_{SCM} im Vergleich zu den naiven T-Zellen zurückzuführen sein.⁴⁴

In der vorliegenden Studie zeigte sich kein signifikanter Einfluss einer CMV-Infektion auf relative oder absolute CD4⁺ und CD8⁺ T_{SCM}. Die ungleiche Stichprobengröße in den vorliegenden Kohorten könnte jedoch einen möglichen Effekt verschleiern. So zeigte sich innerhalb der CD4⁺ T_{SCM} Frequenzen ein Trend (p=0,057) hinzu einer geringeren Frequenz für CMV⁺-Spender. Dies könnte darauf hindeuten, dass im Zuge einer CMV-Infektion mehr T_{SCM} ausdifferenzieren und im Blut als Effektorzellen zirkulieren.

Die Analyse der Peptidstimulation ergab, dass 0,17 ±0,26% der CD8⁺ T_{SCM} eine CMV-spezifische Antwort präsentierten. Damit machten sie 1,15 ±2,47% an der CMV-gerichteten Gesamtantwort aus. Die in der vorliegenden Stichprobe gemessenen insgesamt geringen CMV-spezifischen T_{SCM} Frequenzen sind möglicherweise Ausdruck der häufigen Virusreaktivierung und der damit einhergehenden ständigen Ausdifferenzierung der T_{SCM}. Zudem ist die gesamte virusspezifische T-Zell-Antwort der Spender in der vorliegenden Studie als eher gering zu bewerten. Frühere Studien zeigten bereits eine ausgeprägte interindividuelle Varianz der CMV-spezifischen T-Zell-Frequenzen.^{168,169} Zudem könnte auch die Tatsache, dass mit lediglich zwei Antigenen stimuliert wurde ursächlich sein.

Spender mit einer höheren globalen CMV-Antwort wiesen in der vorliegenden Stichprobe signifikant höhere Frequenzen CMV-spezifischer CD8⁺ T_{SCM} auf. Ferner zeigte die Analyse zur Polyfunktionalität, dass der Anteil an IL-2 doppel-positiven T-Zellen (IL-2⁺IFN γ ⁺ und IL-2⁺TNF α ⁺) innerhalb der CD8⁺ T_{SCM} und T_{CM} größer war als innerhalb der T_{EM} und T_{EMRA}. Diese hohe Produktion an IL-2 deutet darauf hin, dass T_{SCM} Eigenschaften früh-differenzierter T-Zellen besitzen.^{12,169}

Insgesamt wurde in der vorliegenden Studie gezeigt, dass die CD4⁺ und CD8⁺ T_{SCM} als altersstabile Population vorliegen und über polyfunktionelles Potential verfügen.

7.2.1. T_{SCM} mit distinkten Expressionsmuster von CXCR3, CX₃CR₁ und PD-1

Hinsichtlich der drei Oberflächenmoleküle (CXCR3, CX₃CR₁ und PD-1) wurde die mittlere Fluoreszenzintensität pro Subset in der gesamten Kohorte bestimmt. Da bezüglich dieser Aktivierungsmarker keine eindeutigen Populationen abgrenzbar waren, wurde anhand der MFI Aussagen über die Proteindichte auf den Zellen getroffen. Die höchste MFI von CXCR3 wurde innerhalb der CD8⁺ T_{CM} und T_{SCM} gemessen. Zwischen diesen beiden Subsets zeigte sich in der vorliegenden Stichprobe kein signifikanter Unterschied der MFI. Im Vergleich zu den anderen drei T-Zell-Populationen (T_{NAIVE}, T_{EM}, T_{EMRA}) war die MFI der T_{SCM} signifikant höher. Zudem fand sich eine signifikant inverse Beziehung zwischen der MFI von CXCR3 in T_{CM} und T_{SCM} und dem Alter. CXCR3 bindet wie eingangs beschrieben drei Liganden (CXCL9, CXCL10 und CXCL11), die durch IFN γ induziert werden können und die Migration von T-Zellen in entzündliches Gewebe ermöglichen.^{137,139,140} Bislang wurde CXCR3 insbesondere in Maus-Modellen in peripheren Geweben und Lymphknoten untersucht.^{139,143,147} Es zeigte sich, dass CXCR3 auf Effektor-T-Zellen in entzündlichem Gewebe hoch exprimiert ist.¹⁷⁰ Zudem fanden Sung et al. (2012), dass T_{CM} CXCR3 benötigen um im Fall einer viralen Reaktivierung das Antigen in den spezifischen Bereichen lymphatischer Gewebe zu detektieren. Studien zur T-Zell-Expression von CXCR3 in humanen PBMCs ergaben die höchsten Expressionslevel von CXCR3 in frühdifferenzierten CD8⁺T-Zellen (T_{CM} und T_{SCM})^{19,26,171}, was diesen Subpopulationen eine schnelle Migration in Inflammationsgewebe sowie die Rekrutierung weiterer Immunzellen ermöglicht. Die in der vorliegenden Arbeit zeigte mit zunehmendem

Alter verringerte CXCR3-Expression auf den fröhddifferenzierten CD8⁺ T-Zellen könnte aufgrund der erschwerten Migration in entzündliche Gewebe zu einer verminderten oder verzögerten Immunantwort führen.

Endothelzellen gelten als Reservoir des Virus, die infolge einer Infektion hohe Mengen an CXCL10 und Fractalkine exprimieren, welche die chemotaktische Migration von T-Zellen bewirken und so mögliche virusbedingte Gefäßschädigungen bedingen.^{112,172} In der vorliegenden Arbeit zeigte sich für die globalen CD8⁺T-Zellen eine signifikant höhere MFI für CX₃CR₁ innerhalb der CMV⁺-Kohorte und signifikante Interaktionseffekte zwischen Alter und CMV-Infektionsstatus für die CD8⁺ T-Zell-Subpopulationen. Dies deutet daraufhin, dass eine CMV-Infektion zu Alterationen der CD8⁺ Effektor-T-Zellen führt, die sich insbesondere mit zunehmendem Alter zeigt. Hinsichtlich der CD8⁺ T_{SCM} ergab sich eine mittelhohe MFI, die signifikant höher war als für naive CD8⁺ T-Zellen und signifikant geringer als für T_{EM} und T_{EMRA}. Im Vergleich zu den T_{CM} ergab sich kein signifikanter Unterschied. Gerlach et al. (2016) hatten im Mausmodell ein T-Zell-Subset beschrieben, welches eine intermediäre CX₃CR₁-Expression aufwies, periphere Gewebe patrouillierte und ein hohes homöostatisches Potential aufwies. Diese Zellen waren jedoch negativ für CD62L und zeigten eine geringere Proliferationsfähigkeit sowie eine reduzierte Polyfunktionalität als T-Zellen mit geringster CX₃CR₁-Expression.¹⁴⁸ Anhand der gezeigten geringen Expression von CX₃CR₁ auf T_{SCM} kann daher angenommen werden, dass diese am ehesten ähnlich der T_{CM} als proliferative T-Zell-Subpopulation anzusehen sind.

Die Analyse der PD-1 Expression ergab für die CD8⁺ T_{SCM} ein Expressionslevel, das signifikant höher war als das naiver T-Zellen und signifikant geringer als die übrigen Gedächtnis-Zell-Subsets. PD-1 wird schnell nach Aktivierung naiver T-Zellen exprimiert und steigt mit zunehmendem Differenzierungsstatus.¹¹³ Die in der vorliegenden Arbeit gemessene PD-1-Expression von CD8⁺ T_{SCM} deutet auf einen frühen Differenzierungsstatus hin, der sich zwischen naiven T-Zellen und T_{CM} einordnen lässt. PD-1 ist einer der wichtigsten inhibitorischen Rezeptoren, der zur Immuntoleranz beiträgt und überschießende Immun-, insbesondere T-Zell-, Antworten bremst. Während der T-Zell-Aktivierung wird PD-1 innerhalb weniger

Stunden exprimiert und verhindert durch Bindung seiner Liganden PD-L1 und PD-L2 eine überschießende Aktivierung.¹⁷³ Im Rahmen chronischer Infektionen oder maligner Erkrankungen mit übermäßiger PD-1-Expression können PD-1-Inhibitoren und PD-L1-Inhibitoren als Immun-Checkpoint-Inhibitoren therapeutisch eingesetzt werden. So geht eine hohe PD-1-Expression auf T-Zellen mit einem *Exhaustion*-Status und einer verminderten viralen Kontrolle einher.¹⁷⁴ In der untersuchten Stichprobe wurde eine verringerte PD-1-Expression auf CD8⁺ T_{EMRA} im Vergleich zu CD8⁺ T_{EM} gemessen, welche sich nicht signifikant von der MFI von CD8⁺ T_{SCM} unterschied. Im Maus-Modell konnte gezeigt werden, dass PD-1 auf früh-aktivierten T-Zellen dosis-abhängig steigt, sodass die PD-1 Expression als eine Art negatives Feedback für die T-Zell-Aktivierung verstanden werden kann. Die Blockierung von PD-1 im Frühstadium einer HSV-Infektion resultierte in einer verstärkten viralen T-Zell-Antwort.¹⁷⁵ Dies könnte darauf hindeuten, dass insbesondere im Rahmen einer CMV-Infektion die PD-1-Expression auf spät-differenzierten Effektorzellen herunter reguliert wird um eine langfristige Kontrolle der Infektion zu gewährleisten. Die genauen Mechanismen der PD-1 Expression innerhalb der T-Zell-Immunität und insbesondere hinsichtlich der einzelnen T-Zell-Subpopulationen sind bislang nicht hinreichend aufgeklärt und stellen somit ein interessantes Target für künftige Studien dar. Die hier präsentierten Ergebnisse innerhalb einer breiten Alterskohorte unter Berücksichtigung einer latenten Virusinfektion können somit als Grundlage dienen. Zusammenfassend entspricht die Expression der untersuchten Oberflächenmarker dem früh-differenzierten Profil der T_{SCM}. Insbesondere die Expression von PD-1 und CX₃CR₁ ist auf den T_{SCM} in der Art nicht vorbeschrieben und unterstreicht den proliferativen Charakter dieses Subsets. Die steigende Ausprägung der Proteindichte von PD-1 mit zunehmendem Differenzierungsgrad folgt dem linearen Differenzierungsmodell der T-Zellen. Von besonderem Interesse erscheint die geringe MFI von PD-1 auf CD8 T_{EMRA} sowie der Einfluss des CMV-Infektionsstatus' und des Alters auf das Expressionslevel.

Der Einfluss eines positiven CMV-Infektionsstatus auf die Proteindichte der verschiedenen Oberflächenmarker deutet auf eine weitreichende Immunmodulation auf molekularer Ebene hin, die zusätzlich zu Veränderungen des T-Zell-Pools besteht.

Künftige Studien könnten hinsichtlich der Oberflächenmarker zusätzlich zur Proteindichte die Beschreibung ganzer Populationen anstreben und CMV im Vergleich zu anderen Virusinfektionen untersuchen um spezifische von generellen Alterationen des Immunsystems zu erfassen.

7.2.2. *CMV als Motor eines altersbedingt veränderten Gedächtnis-Pools*

Die globalen CD4⁺ T-Zell-Frequenzen waren unabhängig vom CMV-Infektionsstatus positiv mit dem biologischen Alter korreliert und innerhalb der CMV⁺ Spender signifikant geringer. Die Analyse der absoluten Zell-Zahlen ergab keine derartigen signifikanten Effekte. Dies spiegelt Ergebnisse früherer Studien wider.^{43,45} Die fehlende Veränderung der absoluten Zellzahl deutet darauf hin, dass der Anstieg der CD4⁺ T-Zell-Frequenz bei gleichbleibender Anzahl CD3⁺-Zellen durch eine relative Abnahme von CD4⁻ T-Zellen innerhalb der CD3⁺ Population bedingt ist. Die CD4⁺ Gedächtnis-Subset Frequenzen (T_{CM} , T_{SCM} , T_{EM} , T_{EMRA}) waren unabhängig vom CMV-Status insbesondere bei Betrachtung des Gesamt-T-Zell-Pools positiv mit dem Alter korreliert; die Analyse der absoluten T-Zell-Zahlen ergab dahingehend keine signifikanten Ergebnisse. Hinsichtlich der naiven CD4⁺ T-Zellen wurden für CMV⁺-Spender geringere Frequenzen gemessen. Zudem zeigte sich innerhalb der CMV⁺-Kohorte eine inverse Korrelation zwischen der Frequenz globaler CD4⁺ T-Zellen und der Frequenz CMV⁺-spezifischer CD4⁺ T-Zellen. Dies könnte auf eine Verminderung der naiven CD4⁺ T-Zell-Homöostase infolge einer CMV-Infektion mit steigenden antigen-spezifischen Zellen hindeuten.

Hinsichtlich des Alterseffekts auf relative und absolute globale CD8⁺ T-Zell-Zahlen ergibt sich eine heterogene Studienlage: einige Autoren berichten eine inverse Korrelation^{43,44}, andere zeigen keinen eindeutigen Zusammenhang zwischen Alter und CD8⁺ T-Zell-Anzahl insbesondere in höheren Altersgruppen auf.¹⁷⁶ Nicht in allen Studien wurde dabei der CMV-Status der Probanden berücksichtigt.⁴⁴ In der vorliegenden Arbeit zeigte sich kein signifikanter Abfall der CD8⁺ T-Zell-Population in Abhängigkeit des CMV-Status. Eine mögliche Ursache könnte die Überrepräsentation von CMV⁺-Spender sein (47 CMV⁺:13 CMV⁻). Di Benedetto et al.(2015) zeigten eine inverse Korrelation zwischen Alter und CD8-T-Zell-Frequenzen

nur für Spender mit negativem CMV-Infektionsstatus. Damit einhergehend ergaben sich in der vorliegenden Kohorte signifikant höhere CD8⁺ T-Zell-Frequenzen für CMV⁺-Spender im Vergleich zu CMV⁻ Spendern; innerhalb der absoluten Zell-Zahlen erreichte der Unterschied keine Signifikanz ($p=0.097$). Die Berücksichtigung des CMV-Status erscheint demnach bei der Beurteilung von Alterseffekten bedeutsam. Die prägnantesten Alters- und CMV- Effekte zeigten sich in dieser Studie für CD8⁺ T_{EMRA}: diese stiegen mit zunehmendem biologischen Alter signifikant an, jedoch ausschließlich für CMV⁺-Donoren. Der Interaktionseffekt war sowohl für die relativen als auch absoluten Zellzahlen signifikant. Dies lässt darauf schließen, dass die CMV-Infektion nicht nur zu einer relativen Umverteilung des CD8-T-Zell-Pools führt, sondern eine reale Akkumulierung der T_{EMRA} erfolgt, was möglicherweise die stabilen relativen und absoluten CD8 T-Zell-Zahlen erklärt. Eine weiterführende Korrelationsanalyse innerhalb des CMV⁺-Spenderkollektivs (Abb. 13) ergab eine signifikante schwach-positive Korrelation ($r_s=0,39$, $p=0.01$) zwischen CMV-spezifischen CD8⁺ T_{EMRA} und der globalen CD8⁺ T_{EMRA}, die zeigt, dass eine steigende Anzahl der T_{EMRA}-Gesamtpopulation mit steigenden CMV-spezifischen T_{EMRA} einhergeht. So war auch die Frequenz der CMV-spezifischen CD8⁺ T_{EMRA} positiv mit dem biologischen Alter korreliert. Diese Ergebnisse zeigen in der vorliegenden Stichprobe das zuvor beschriebene Phänomen der *Memory Inflation*.^{41,105,120,177} Dennoch scheint eine CMV-Infektion nicht nur eine Akkumulierung von T_{EMRA} zu induzieren, sondern darüberhinaus einen alterskorrelierten *Memory-Shift*: Interaktionseffekte (CMV-Status: Alter) zeigten sich auch hinsichtlich der CD8⁺T_{EM} und T_{CM}, allerdings mit inversen Korrelationen. CMV⁺ Donoren weisen demnach mit zunehmendem Alter weniger Central- und Effektormemory-Zellen auf. Smith et al. (2014) zeigten, dass MCMV-spezifische T_{CM} in lymphatischen Geweben ausdifferenzieren und der Großteil der MCMV⁺-T-Zellen als Effektorzellen in der Blutbahn zirkulieren. Die Autoren deuteten dies als effektive Überwachungsstrategie des Immunsystems zur Abwehr möglicher Virusreaktivierung.⁶⁷ Die Daten der vorliegenden Kohorte weisen darauf hin, dass mit zunehmendem Alter aufgrund wiederholter Virusreaktivierung mehr fröhendifferenzierte T-Zellen ausdifferenzieren und als T_{EMRA} im Gefäßsystem zirkulieren. Bereits bei den jüngsten Spendern unserer

Kohorte wurde eine signifikant höhere relative und absolute Anzahl an $CD8^+ T_{EMRA}$ gemessen. Dies könnte einerseits implizieren, dass eine CMV Infektion bereits früh in der Kindheit erfolgt und aufgrund von Reaktivierungen zur Memory Inflation führt. Andererseits könnte die T-Zell-Reaktion infolge einer CMV-Infektion auch sehr ausgeprägt sein und unmittelbar zu erhöhten Zellzahlen führen. Komatsu et al. (2006) hatten in einem großen pädiatrischen Kollektiv bereits im Kleinkindalter hohe Frequenzen von $CD8^+ T_{EMRA}$ gemessen, die vollständig funktionstüchtig waren und über lange Zeit erhalten blieben. Hinsichtlich der $CD8^+ T_{NAIVE}$ relativen und absoluten Zellzahlen zeigte sich eine inverse Korrelation mit dem Alter und darüber hinaus signifikant erniedrigte $CD8^+ T_{NAIVE}$ -Frequenzen in der CMV-positiven Kohorte. Somit scheint es mit zunehmendem Alter unabhängig vom Infektionsstatus zu einer prononcierten Abnahme naiver $CD8^+$ T-Zellen zu kommen⁴³, was Folge einer verminderten naiven T-Zell-Homöostase sowie der Thymusinvolution zu sein scheint.⁵¹ Ein positiver Infektionsstatus ging sowohl bei jüngeren als auch älteren Spendern mit einer geringeren Frequenz naiver $CD8^+$ T-Zellen einher, was als Folge eines frühzeitigen veränderten T-Zell-Pools aufgrund der Infektion gewertet werden kann. Für die Frequenzen der übrigen Gedächtnis-Subsets ergaben sich Interaktionseffekte (Alter: CMV-Status), die bei Betrachtung der Gesamt-T-Zell-Verteilung prononciert waren. In einem weiteren Schritt wurden neben den bereits in Abschnitt 5.1.2. berichteten Ratios zwischen T_{SCM}/T_{NAIVE} auch Ratios für T_{EMRA}/T_{NAIVE} berechnet und hinsichtlich eines möglichen Alterseffekts analysiert. Es zeigten sich erneut ein signifikanter Interaktionseffekt für Alter und CMV-Status für $CD8^+ T_{EMRA}$ dahingehend, dass die Ratio ausschließlich für CMV^+ Donoren positiv mit dem Alter korreliert war. Zudem zeigten die CMV^+ Spender signifikant höhere $CD8^+ T_{EMRA}$ Frequenzen als die negative Gruppe. Diese Ratios könnten als Ausdruck immunologischen Alters interpretiert werden, wobei steigende Ratio-Werte ein älteres Immunsystem abbilden.

In Zusammenschau mit den steigenden $CD8^+ T_{EMRA}$ ergibt sich das Bild einer relativen Umverteilung des $CD8$ -Gedächtniszell-Pools hinzu einem größeren Anteil spätdifferenzierter T-Zellen auf Kosten von T_{SCM} , T_{CM} und T_{EM} . Wie bereits zuvor erwogen, wäre ein Vergleich zu anderen Virusinfektionen (z.B. EBV, HIV, Varizella-

Zoster oder andere) interessant um zwischen CMV-spezifischen und generellen Einflüssen persistierender Virusinfektionen zu differenzieren.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass es im Rahmen einer CMV-Infektion neben der, zusätzlich altersassoziierten, Zunahme an CD8⁺ T_{EMRA} zu einer Art *Memory Shift* kommt: im Gegenzug zur zunehmenden Anzahl an CD8⁺ wurden reduzierte Frequenzen der anderen Memory-Subsets gemessen. Die vorliegenden Ergebnisse untermauern den seit vielen Jahren erforschten Einfluss der CMV-Infektion auf das Immunsystem und heben insbesondere die Interaktion zwischen Infektion und biologischem Alter hervor.

7.2.3. Das Knochenmark als mögliche Nische für T_{SCM}

In der vorliegenden Arbeit wurden gekoppelte PBMCs und BMMCs in einem kleinen *Sample* von vier Spendern untersucht um eine mögliche T_{SCM}-Nische innerhalb des Knochenmarks aufzuzeigen. Erwartungsgemäß wurden erhöhte Frequenzen an CD8⁺ T_{EM} und erniedrigte Frequenzen an CD8⁺ naiven T-Zellen im Knochenmark verglichen mit dem peripheren Blut gemessen.^{61,77,165} Es zeigten sich jedoch keine erhöhten Frequenzen von CD4⁺ und CD8⁺ T_{SCM} im Knochenmark im Vergleich zum peripheren Blut. Möglicherweise könnte ursächlich sein, dass in den BMMC-Proben eine deutlich geringere MFI von CCR7 und CD45RA im Vergleich zum peripheren Blut gemessen wurde. Dadurch war die genaue Phänotypisierung und Abgrenzung der T_{SCM} erschwert. Da das Knochenmark sowohl ein Reservoir inaktiver T-Zellen als auch Ort der Selbsterneuerung darstellen könnte⁶⁰, erscheint es insbesondere in Hinblick auf die T_{SCM} als möglicherweise entscheidendes Gewebe. Daher sollte die Frage nach einer möglichen Nische in künftigen Studien in einer größeren Kohorte adressiert werden. Mithilfe von Surrogatmarkern und Transkriptionsfaktoren könnte eine genauere Differenzierung erreicht werden. Zudem könnten RNA-Analysen z.B. mittels single cell RNA- oder CITE-sequencing zur Aufdeckung einer möglichen T_{SCM}-Nische im Knochenmark genutzt werden.

7.3. Limitationen und Ausblick

In der Auswertung von Studien zu humanen T-Zell-Populationen muss berücksichtigt werden, dass häufig der Zeitpunkt einer Infektion sowie die Anzahl und Zeitverläufe möglicher Reaktivierungen unbekannt sind. Der Großteil der Studien, wie auch die vorliegende, nutzt zur Bestimmung des T-Zell-Pools PBMC, aufgrund der Schwierigkeiten bei der Gewinnung von Gewebe, Lymphknoten oder Knochenmark.¹⁶⁶ Somit stellt jede ex vivo Messung eine Momentaufnahme der individuellen T-Zell-Zusammensetzung dar, die bereits aufgrund kleinster Infektionen, Tageszeit, o.ä. Faktoren variieren kann. Zudem erfolgt die Expression vieler Oberflächenproteine sehr kurz und in bestimmten Zeitfenstern. Somit sind Schwankungen unter Umständen auch auf kleinste Protokollabweichungen zurückzuführen. Ein weiterer kritischer Aspekt stellt die Gewebsverteilung der T-Zellen dar, die in Studien, welche PBMCs nutzen, nur unzureichend berücksichtigt wird. Insbesondere in Maus-Modellen konnte gezeigt werden, dass sich die Verteilung der T-Zellen im peripheren Blut von der Verteilung im Gewebe unterscheidet.¹⁷⁸ In einigen Studien zu menschlichen T-Zellen konnten unterschiedliche Verteilungsmuster in Abhängigkeit des Differenzierungsstatus gezeigt werden: so scheinen naive T-Zellen insbesondere in Blut, Milz und Lymphknoten zu zirkulieren während T_{EM} u.a. im Lungen- und Darmgewebe vorkam.¹⁷⁹ Auch hinsichtlich der CMV-Infektion scheinen insbesondere Epithelzellen primäre Orte der Virusreplikation zu sein.⁸⁶ Es ist somit also fraglich, wie sehr die Peripherie tatsächlich ein Abbild des Immunstatus ist, insbesondere bei Vorliegen eines entzündlichen Geschehens.

In der vorliegenden Studie wurde das Geschlecht nicht als unabhängige Variable definiert, möglicherweise spielen hormonelle Einflüsse aber eine Rolle hinsichtlich des T-Zell-Pools.¹⁸⁰ Dies sollte in zukünftigen Studien berücksichtigt werden. Die Stichprobengrößen der Gruppen abhängig vom CMV-Infektionsstatus waren aus methodischen Gründen nicht ausbalanciert. Dies könnte aufgrund der geringeren statistischen Power innerhalb der CMV- Population eine Verschleierung möglicher Effekte der Infektion begründen. Eine ausbalancierte Stichprobe mit einer größeren Probandenzahl wäre in künftigen Studien anzustreben. Die Bestimmung des CMV-

Infektionsstatus sollte zudem zusätzlich zur antigen-spezifischen T-Zell-Antwort serologisch erfolgen.

Hinsichtlich der Oberflächenmarker zeigte sich insbesondere innerhalb der fröhddifferenzierten und naiven T-Zell-Populationen eine geringe MFI von CX₃CR₁, sodass die Bewertung der statistischen Ergebnisse nur eingeschränkt erfolgen sollte. Künftige Studien sollten anstelle der Proteindichte eine Differenzierung von positiver und negativer Population anstreben.

Aus klinischer Sicht erscheint die Untersuchung der T_{SCM} bezüglich der Oberflächenmarker (CXCR3, CX₃CR₁ und PD-1) in einem Patientenkollektiv von großem Interesse. Eine geeignete Patientengruppe würden Patienten nach Solid-Organ-Transplantation darstellen, die häufig aufgrund von persistierenden Virusinfektionen wie CMV hospitalisiert werden müssen. Alterationen der Markerexpression im Vergleich zu gesunden Kontrollprobanden könnten u.a. zur Optimierung der adoptiven T-Zell-Therapie beitragen.

7.4. Zusammenfassung

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Charakterisierung von T_{SCM} in einer breiten Alterskohorte und in Abhängigkeit vom serologisch bestimmten CMV-Infektionsstatus. Es zeigte sich, dass T_{SCM} über das biologische Alter und unabhängig vom CMV-Status hinweg als stabile Population vorliegen. Zudem konnte eine steigende Ratio von T_{SCM}/T_{NAIVE} demonstriert werden, die auf das erhöhte Selbsterneuerungs- und Proliferationspotential der T_{SCM} zurückzuführen sein könnte. Die untersuchten Oberflächenmarker (CXCR3, CX₃CR₁ und PD-1) spiegeln das Profil einer früh-differenzierten T-Zell-Population mit hohem Proliferationspotenzial wider und scheinen sowohl innerhalb der T_{SCM} als auch der anderen T-Zell-Populationen durch Alter und CMV-Infektionsstatus beeinflusst. Von besonderer Relevanz erscheint dabei die geringere Expression von CXCR3 im Alter insbesondere bei Vorliegen eines positiven CMV-Infektionsstatus, welche auf eine verminderte Migrationsfähigkeit der T_{SCM} in IFN γ vermittelte inflammatorische Areale mit CXCL9-11 Expression hindeutet. Dies könnte eine reduzierte Immunabwehr im Gewebe im höheren Alter hervorrufen, aber auch ein Schutzmechanismus gegen überschießende Akkumulation dieser Zellen im entzündeten Gewebe darstellen. Hier wäre es interessant durch künftige Studien, die Expression anderer Chemokinrezeptoren zu untersuchen. Die vorliegenden Daten können in künftigen Studien als Baseline genutzt werden um die T_{SCM} in verschiedenen Geweben (u.a. dem Knochenmark) und in spezifischen Probandenkollektiven (insbesondere immunsupprimierte Patienten) genauer hinsichtlich ihrer Funktionalität als Pfeiler der T-Zell-Immunität zu untersuchen.

Literaturverzeichnis

1. Sha, W. C., Neslon, C. A., Newberry, R. D., Kranz, D. M., Russell, J. H. & Loh, D. Y. Positive and negative selection of an antigen receptor on T cells in transgenic mice. *Nature* **336**, 73–76 (1988).
2. Murphy, K., Weaver, C. & Janeway, C. *Janeway's immunobiology. 9th ed. Immunobiology* (Garland Sciences, 2016).
3. Brameshuber, M., Kellner, F., Rossboth, B. K., Ta, H., Alge, K., Sevcsik, E., Göhring, J., Axmann, M., Baumgart, F., Gascoigne, N. R. J., Davis, S. J., Stockinger, H., Schütz, G. J. & Huppa, J. B. Monomeric TCRs drive T cell antigen recognition. *Nature Immunology* **19** (5), 487–496 (2018).
4. De Simone, M., Rossetti, G. & Pagani, M. Single cell T cell receptor sequencing: Techniques and future challenges. *Frontiers in Immunology* **9**, 1–7 (2018).
5. Qi, Q., Liu, Y., Cheng, Y., Glanville, J., Zhang, D., Lee, J. Y., Olshen, R. A., Weyand, C. M., Boyd, S. D. & Goronzy, J. J. Diversity and clonal selection in the human T-cell repertoire. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **111**, 13139–13144 (2014).
6. Acuto, O. & Michel, F. CD28-mediated co-stimulation: a quantitative support for TCR signalling. *Nature Reviews Immunology* **3**, 939–951 (2003).
7. Lenschow, D. J., Walunas, T. L. & Jeffrey, A. Cd28 / B7 System of T Cell. *Annual review of immunology* **14**, 233–58 (1996).
8. Watts, T. H. TNF / TNFR family members in costimulation of T-cell responses. *Review Literature And Arts Of The Americas* 23–68 (2005)
9. Lanzavecchia, A. & Sallusto, F. Dynamics of T lymphocyte responses: Intermediates, effectors, and memory cells. *Science* **290**, 92–97 (2000).
10. Bannard, O., Kraman, M. & Fearon, D. Pathways of memory CD8+ T-cell development. *European Journal of Immunology* **39**, 2083–2087 (2009).
11. Kedzierska, K., Valkenburg, S. A., Doherty, P. C., Davenport, M. P. & Venturi, V. Use it or lose it: Establishment and persistence of T cell memory. *Frontiers in Immunology* **3**, 1–11 (2012).
12. Mahnke, Y. D., Brodie, T. M., Sallusto, F., Roederer, M. & Lugli, E. The who's who of T-cell differentiation: Human memory T-cell subsets. *European Journal of Immunology* **43**, 2797–2809 (2013).
13. Hammarlund, E., Lewis, M. W., Hansen, S. G., Strelow, L. I., Nelson, J. A., Sexton, G. J., Hanifin, J. M. & Slifka, M. K. Duration of antiviral immunity after smallpox vaccination. *Nature Medicine* **9**, 1131–1137 (2003).
14. Sallusto, F., Geginat, J. & Lanzavecchia, A. Central Memory and Effector Memory T Cell Subsets : Function, Generation, and Maintenance. *Annual Review of Immunology* **22**, 745–763 (2004).
15. Sallusto, F., Lenig, D., Förster, R., Lipp, M. & Lanzavecchia, A. Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials. *Letters to Nature* **401**, (1999).
16. Mehta, A. K., Gracias, D. T. & Croft, M. TNF activity and T cells. *Cytokine* **101**, 14–18 (2018).
17. Tian, Y., Babor, M., Lane, J., Schulten, V., Patil, V. S., Seumois, G., Rosales, S. L., Fu, Z., Picarda, G., Burel, J., Zapardiel-gonzalo, J., Tennekoon, R. N., Silva, A. D. De, Premawansa, S., Premawansa, G., Wijewickrama, A., Greenbaum, J. A., Vijayanand, P., Weiskopf, D., Sette, A. & Peters, B. Unique phenotypes and clonal expansions of. *Nature Communications* **8**, 1473–1481 (2017).
18. Gattinoni, L., Lugli, E., Ji, Y., Pos, Z., Paulos, C. M., Quigley, M. F., Almeida, J. R., Gostick, E., Yu, Z., Carpentino, C., Wang, E., Douek, D. C., Price, D., June, C. H., Marincola, F. M., Roederer, M. & Restifo, N.P. A human memory T-cell subset with stem cell-like properties. *Nature medicine* **17** (10), 1290–1297 (2012).
19. Schmueck-Henneresse, M., Sharaf, R., Vogt, K., Weist, B. J. D., Landwehr-Kenzel, S., Fuehrer, H., Jurisch, A., Babel, N., Rooney, C. M., Reinke, P. & Volk, H.-D. Peripheral Blood-Derived Virus-Specific Memory Stem T Cells Mature to Functional Effector Memory Subsets with Self-Renewal Potency. *The Journal of Immunology* **194**, 5559–5567 (2015).
20. Xu, L., Zhang, Y., Luo, G. & Li, Y. The roles of stem cell memory T cells in hematological malignancies. *Journal of Hematology and Oncology* **8**, 10–14 (2015).
21. Gattinoni, L., Speiser, D. E., Lichterfeld, M. & Bonini, C. T memory stem cells in health and disease. *Nature Medicine* **23**, 18–27 (2017).
22. Flynn, J. K. & Gorry, P. R. Stem memory T cells (TSCM)— their role in cancer and HIV immunotherapies. *Clinical & Translational Immunology* **3**, 20–7 (2014).
23. Restifo, N. P. & Gattinoni, L. Lineage relationship of effector and memory T cells. *Current opinion in immunology*, **25**, 556–563 (2014).
24. Roberto, A., Castagna, L., Zanon, V., Bramanti, S., Crocchiolo, R., McLaren, J. E., Gandolfi, S., Tentorio, P., Sarina, B., Timofeeva, I., Santoro, A., Carlo-Stella, C., Bruno, B., Carniti, C., Corradini, P., Gostick, L., Ladell, K., Price, D. A., Roederer, M., Mavilio, D. & Lugli, E. Role of naive-derived T memory stem cells in T-cell reconstitution following allogeneic transplantation. *Blood* **125**, 2855–2864 (2015).
25. Cieri, N., Oliveira, G., Greco, R., Forcato, M., Taccioli, C., Cianciotti, B., Valtolina, V., Noviglio, M., Vago, L., Bondanza, A., Lunghi, F., Markt, S., Bellio, L., Bordignon, C., Bicciato, S., Peccatori, J., Ciceri, F. & Bonini, C. Generation of human memory stem T cells after haploidentical T-replete hematopoietic stem cell transplantation. *Blood* **125**, 2865–2874 (2015).

26. Lugli, E., Dominguez, M. H., Gattinoni, L., Chattopadhyay, P. K., Bolton, D. L., Song, K., Klatt, N. R., Brenchley, J. M., Vaccari, M., Gostick, E., Price, D. A., Waldmann, T. A., Restifo, N. P., Franchini, G. & Roederer, M. Superior T memory stem cell persistence supports long-lived T cell memory. *Journal of Clinical Investigation* **123**, 594–599 (2013).
27. Gattinoni, L., Zhong, X., Palmer, D. C., Ji, Y., Hinrichs, C. S., Yu, Z., Wrzesinski, C., Boni, A., Cassard, L., Church, L., Paulos, M., Muranski, P. & Restifo, N. P. Wnt signaling arrests effector T cell differentiation and generates CD8⁺ memory stem cells. *Nature medicine* **15** (7), 808–813 (2009).
28. Cahroudi, A., Silvestri, G. & Lichterfeld, M. T memory stem cells and HIV: a long-term relationship. *Curr HIV/AIDS Rep.* **12**, 33–40 (2015).
29. Lugli, E., Gattinoni, L., Roberto, A., Mavilio, D., Price, D. A., Restifo, N. P. & Roederer, M. Identification, isolation and in vitro expansion of human and nonhuman primate T stem cell memory cells. *Nature Protocols* **8**, 33–42 (2013).
30. Oliveira, G., Ruggiero, E., Stanghellini, M. T. L., Cieri, N., D'Agostino, M., Fronza, R., Lulay, C., Dionisio, F., Mastaglio, S., Greco, R., Peccatori, J., Aiuti, A., Ambrosi, A., Biasco, L., Bondanza, A., Lambiase, A., Traversari, C., Vago, L., von Kalle, C., Schmidt, M., Bordignon, C., Ciceri, F. & Bonini, C. Tracking genetically engineered lymphocytes long-term reveals the dynamics of t cell immunological memory. *Science Translational Medicine* **7**, 1–14 (2015).
31. Biasco, L., Scala, S., Basso Ricci, L., Dionisio, F., Baricordi, C., Calabria, A., Giannelli, S., Cieri, N., Barzaghi, F., Pajno, R., Al-Mousa, H., Scarselli, A., Cancrini, C., Bordignon, C., Roncarolo, M. G., Montini, E., Bonini, C. & Aiuti, A. In vivo tracking of T cells in humans unveils decade-long survival and activity of genetically modified T memory stem cells. *Science Translational Medicine* **7**, 273ra13 (2015).
32. Fuertes Marraco, S. A., Sonesson, C., Cagnon, L., Gannon, P. O., Allard, M., Maillard, S. A., Montandon, N., Rufer, N., Waldvogel, S., Delorenzi, M. & Speiser, D. E. Long-lasting stem cell-like memory CD8⁺ T cells with a naïve-like profile upon yellow fever vaccination. *Science Translational Medicine* **7**, 282 (2015).
33. del Amo, P. C., Beneytez, J. L., Boelen, L., Ahmed, R., Miners, K. L., Zhang, Y., Roger, L., Jones, R. E., Marraco, S. A. F., Speiser, D. E., Baird, D. M., Price, D. A., Ladell, K., Macallan, D. & Asquith, B. Human T SCM cell dynamics in vivo are compatible with long-lived immunological memory and stemness. *PLoS Biology* **16**, 1–22 (2018).
34. Ahmed, R., Roger, L., Costa del Amo, P., Miners, K. L., Jones, R. E., Boelen, L., Fali, T., Elemans, M., Zhang, Y., Appay, V., Baird, D. M., Asquith, B., Price, D. A., Macallan, D. C. & Ladell, K. Human Stem Cell-like Memory T Cells Are Maintained in a State of Dynamic Flux. *Cell Reports* **17**, 2811–2818 (2016).
35. Mateus, J., Lasso, P., Pavia, P., Rosas, F., Roa, N., Valencia-Hernández, C. A., González, J. M., Puerta, C. J. & Cuéllar, A. Low Frequency of Circulating CD8⁺ T Stem Cell Memory Cells in Chronic Chagasic Patients with Severe Forms of the Disease. *PLoS Neglected Tropical Diseases* **9** (1), 3431–3441 (2015).
36. Ribeiro, S. P., Milush, J. M., Cunha-Neto, E., Kallas, E. G., Kalil, J., Somsouk, M., Hunt, P. W., Deeks, S. G., Nixon, D. F. & SenGupta, D. The CD8⁺ Memory Stem T Cell (TSCM) Subset Is Associated with Improved Prognosis in Chronic HIV-1 Infection. *Journal of Virology* **88**, 13836–13844 (2014).
37. Vigano, S., Negron, J., Ouyang, Z., Rosenberg, E. S., Walker, B. D., Lichterfeld, M. & Yu, X. G. Prolonged Antiretroviral Therapy Preserves HIV-1-Specific CD8 T Cells with Stem Cell-Like Properties. *Journal of Virology* **89**, 7829–7840 (2015).
38. Hosokawa, K., Muranski, P., Feng, X., Townsley, D. M., Liu, B., Knickelbein, J., Keyvanfar, K., Dumitriu, B., Ito, S., Kajigaya, S., Vi, J. G. T., Kaplan, M. J., Nussenblatt, R. B., Barrett, A. J., O'Shea, J. & Young, N. S. Memory Stem T Cells in Autoimmune Disease: High Frequency of Circulating CD8⁺ Memory Stem Cells in Acquired Aplastic Anemia Kohei. *Journal of Immunology* **196**, 1568–1578 (2016).
39. Gattinoni, L. The dark side of T memory stem cells. *Blood* **125**, 3519–3520 (2015).
40. Buzon, M. J., Sun, H., Li, C., Shaw, A., Seiss, K., Ouyang, Z., Martin-Gayo, E., Leng, J., Henrich, T. J., Li, J. Z., Pereyra, F., Zurakowski, R., Walker, B. D., Rosenberg, E. S., Yu, X. G. & Lichterfeld, M. HIV-1 persistence in CD4⁺ T cells with stem cell like properties. *Nature Medicine* **20**, 139–142 (2014).
41. Fülöp, T., Larbi, A. & Pawelec, G. Human T cell aging and the impact of persistent viral infections. *Frontiers in Immunology* **4**, 1–9 (2013).
42. Arnold, C. R., Wolf, J., Brunner, S., Herndler-Brandstetter, D. & Grubeck-Loebenstien, B. Gain and loss of T cell subsets in old age - Age-related reshaping of the T cell repertoire. *Journal of Clinical Immunology* **31**, 137–146 (2011).
43. Wertheimer, A. M., Bennett, M. S., Park, B., Uhrlaub, J. L., Martinez, C., Pulko, V., Currier, N. L., Nikolich-Zugich, D., Kaye, J. & Nikolich-Zugich, J. Aging and Cytomegalovirus Infection Differentially and Jointly Affect Distinct Circulating T Cell Subsets in Humans. *The Journal of Immunology* **192**, 2143–2155 (2014).
44. Li, M., Yao, D., Zeng, X., Kasakovski, D., Zhang, Y., Chen, S., Zha, X., Li, Y. & Xu, L. Age related human T cell subset evolution and senescence. *Immunity & Ageing* **16**, 1–7 (2019).
45. Di Benedetto, S., Derhovanessian, E., Steinhagen-Thiessen, E., Goldeck, D., Müller, L. & Pawelec, G. Impact of age, sex and CMV-infection on peripheral T cell phenotypes: results from the Berlin BASE-II Study. *Biogerontology* **16**, 631–643 (2015).
46. López-Otín, C., Blasco, M. A., Partridge, L., Serrano, M. & Kroemer, G. The hallmarks of aging. *Cell* **153**, 1194–1217 (2013).

47. Nikolich-Zugich, J. The twilight of immunity: Emerging concepts in aging of the immune system review-article. *Nature Immunology* **19**, 10–19 (2018).
48. Kverneland, A. H., Streitz, M., Geissler, E., Hutchinson, J., Vogt, K., Boës, D., Niemann, N., Pedersen, A. E., Schlickeiser, S. & Sawitzki, B. Age and gender leucocytes variances and references values generated using the standardized ONE-Study protocol. *Cytometry Part A* **89**, 543–564 (2016).
49. Palmer, D. B. The effect of age on thymic function. *Frontiers in Immunology* **4**, 1–6 (2013).
50. McElhaney, J. E., Kuchel, G. A., Zhou, X., Swain, S. L. & Haynes, L. T-cell immunity to influenza in older adults: A pathophysiological framework for development of more effective vaccines. *Frontiers in Immunology* **7**, 1–11 (2016).
51. Goronzy, J. J. & Weyand, C. M. Mechanisms underlying T cell ageing. *Nature Reviews Immunology* **19**, 573–583 (2019).
52. Crooke, S. N., Ovsyannikova, I. G., Poland, G. A. & Kennedy, R. B. Immunosenescence and human vaccine immune responses. *Immunity & Ageing* **16**, 1–16 (2019).
53. Blank, C. U., Haining, W. N., Held, W., Hogan, P. G., Kallies, A., Lugli, E., Lynn, R. C., Philip, M., Rao, A., Restifo, N. P., Schietinger, A., Schumacher, T. N., Schwartzberg, P. L., Sharpe, A. H., Speiser, D. E., Wherry, E. J., Youngblood, B. A. & Zehn, D. Defining 'T cell exhaustion'. *Nature Reviews Immunology* **19**, 665–674 (2019).
54. Seddon, B. & Yates, A. J. The natural history of naive T cells from birth to maturity. *Immunological Reviews* **285**, 218–232 (2018).
55. den Braber, I., Mugwagwa, T., Vrisekoop, N., Westera, L., Mögling, R., Bregje de Boer, A., Willems, N., Schrijver, E. H. R., Spierenburg, G., Gaiser, K., Mul, E., Otto, S. A., Ruiters, A. F. C., Ackermans, M. T., Miedema, F., Borghans, J. A. M., de Boer, R. J. & Tesselaar, K. Maintenance of Peripheral Naive T Cells Is Sustained by Thymus Output in Mice but Not Humans. *Immunity* **36**, 288–297 (2012).
56. Goronzy, J. J., Fang, F., Cavanagh, M. M., Qi, Q. & Weyand, C. M. Naive T Cell Maintenance and Function in Human Aging. *The Journal of Immunology* **194**, 4073–4080 (2015).
57. Link, A., Vogt, T. K., Favre, S., Britschgi, M. R., Acha-Orbea, H., Hinz, B., Cyster, J. G. & Luther, S. A. Fibroblastic reticular cells in lymph nodes regulate the homeostasis of naive T cells. *Nature Immunology* **8**, 1255–1265 (2007).
58. Johnson, P. L. F., Yates, A. J., Goronzy, J. J. & Antia, R. Peripheral selection rather than thymic involution explains sudden contraction in naive CD4 T-cell diversity with age. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **109**, 21432–21437 (2012).
59. Schönland, S. O., Zimmer, J. K., Lopez-Benitez, C. M., Widmann, T., Ramin, K. D., Goronzy, J. J. & Weyand, C. M. Homeostatic control of T-cell generation in neonates. *Blood* **102**, 1428–1434 (2003).
60. Baliu-Piqué, M., Verheij, M. W., Drylewicz, J., Ravesloot, L., de Boer, R. J., Koets, A., Tesselaar, K. & Borghans, J. A. M. Short lifespans of memory T-cells in bone marrow, blood, and lymph nodes suggest that T-cell memory is maintained by continuous self-renewal of recirculating cells. *Frontiers in Immunology* **9**, 1–14 (2018).
61. Di Rosa, F. & Gebhardt, T. Bone marrow T cells and the integrated functions of recirculating and tissue-resident memory T cells. *Frontiers in Immunology* **7**, 1–13 (2016).
62. Surh, C. D. & Sprent, J. Homeostasis of Naive and Memory T Cells. *Immunity* **29**, 848–862 (2008).
63. Chiu, B.-C., Martin, B. E., Stolberg, V. R. & Chensue, S. W. Cutting Edge: Central Memory CD8 T Cells in Aged Mice Are Virtual Memory Cells. *The Journal of Immunology* **191**, 5793 LP – 5796 (2013).
64. Kim, J., Kim, A.-R. & Shin, E.-C. Cytomegalovirus Infection and Memory T Cell Inflation. *Immune Network* **15**, 186 (2015).
65. Khan, N., Shariff, N., Cobbold, M., Bruton, R., Ainsworth, J. A., Sinclair, A. J., Nayak, L. & Moss, P. A. H. Cytomegalovirus Seropositivity Drives the CD8 T Cell Repertoire Toward Greater Clonality in Healthy Elderly Individuals. *The Journal of Immunology* **169**, 1984–1992 (2002).
66. Klenerman, P. & Oxenius, A. T cell responses to cytomegalovirus. *Nature Reviews Immunology* **16**, 367–377 (2016).
67. Smith, C. J., Turula, H. & Snyder, C. M. Systemic Hematogenous Maintenance of Memory Inflation by MCMV Infection. *PLoS Pathogens* **10** (7) (2014).
68. van den Berg, S. P. H., Pardieck, I. N., Lanfermeijer, J., Sauce, D., Klenerman, P., van Baarle, D. & Arens, R. The hallmarks of CMV-specific CD8 T-cell differentiation. *Medical Microbiology and Immunology* **208**, 365–373 (2019).
69. Sylwester, A. W., Mitchell, B. L., Edgar, J. B., Taormina, C., Pelte, C., Ruchti, F., Sleath, P. R., Grabstein, K. H., Hosken, N. A., Kern, F., Nelson, J. A. & Picker, L. J. Broadly targeted human cytomegalovirus-specific CD4+ and CD8+ T cells dominate the memory compartments of exposed subjects. *Journal of Experimental Medicine* **202**, 673–685 (2005).
70. Farber, D. L., Yudanin, N. A. & Restifo, N. P. Human memory T cells: generation, compartmentalization and homeostasis. *Nat Rev Immunol* **14**, 24–35 (2014).
71. Blum, K. & Pabst, R. Lymphocyte numbers and subsets in the human blood. Do they mirror the situation in all organs? *Immunology letters* **108**, 45–51 (2007).
72. Becker, T. C., Coley, S. M., Wherry, E. J. & Ahmed, R. Bone Marrow Is a Preferred Site for Homeostatic

- Proliferation of Memory CD8 T Cells. *The Journal of Immunology* **174**, 1269–1273 (2005).
73. Di Rosa, F. & Pabst, R. The bone marrow: A nest for migratory memory T cells. *Trends in Immunology* **26**, 360–366 (2005).
 74. Cavanagh, L. L., Bonasio, R., Mazo, I. B., Halin, C., Cheng, G., Velden, A. W. M. Van Der, Cariappa, A., Chase, C., Russell, P., Starnbach, M. N., Koni, P. A., Pillai, S., Weninger, W. & Andrian, H. Von. Activation of bone marrow-resident memory T cells by circulating, antigen-bearing dendritic cells. *Nat. Immunol.* **6**, 1029–1037 (2005).
 75. Parretta, E., Cassese, G., Barba, P., Santoni, A., Guardiola, J. & Di Rosa, F. CD8 Cell Division Maintaining Cytotoxic Memory Occurs Predominantly in the Bone Marrow. *The Journal of Immunology* **174**, 7654–7664 (2005).
 76. Letsch, A., Knoedler, M., Na, I. K., Kern, F., Asemissen, A. M., Keilholz, U., Loesch, M., Thiel, E., Volk, H. D. & Scheibenbogen, C. CMV-specific central memory T cells reside in bone marrow. *European Journal of Immunology* **37**, 3063–3068 (2007).
 77. Herndler-Brandstetter, D., Landgraf, K., Jenewein, B., Tzankov, A., Brunauer, R., Brunner, S., Parson, W., Kloss, F., Gassner, R., Lepperdinger, G. & Grubeck-Loebenstein, B. Human Bone Marrow Hosts Polyfunctional Memory CD4 + and CD8 + T Cells with Close Contact to IL-15–Producing Cells . *The Journal of Immunology* **186**, 6965–6971 (2011).
 78. Dolan, A., Cunningham, C., Hector, R. D., Hassan-Walker, A. F., Lee, L., Addison, C., Dargan, D. J., McGeoch, D. J., Gatherer, D., Emery, V. C., Griffiths, P. D., Sinzger, C., McSharry, B. P., Wilkinson, G. W. G. & Davison, A. J. Genetic content of wild-type human cytomegalovirus. *Journal of General Virology* **85**, 1301–1312 (2004).
 79. Cunningham, C., Gatherer, D., Hilfrich, B., Baluchova, K., Dargan, D. J., Thomson, M., Griffiths, P. D., Wilkinson, G. W. G., Schulz, T. F. & Davison, A. J. Sequences of complete human cytomegalovirus genomes from infected cell cultures and clinical specimens. *Journal of General Virology* **91**, 605–615 (2010).
 80. Reddehase, M. J. Antigens and immuno-evasins: Opponents in cytomegalovirus immune surveillance. *Nature Reviews Immunology* **2**, 831–844 (2002).
 81. Souquette, A., Frere, J., Smithey, M., Sauce, D. & Thomas, P. G. A constant companion: immune recognition and response to cytomegalovirus with aging and implications for immune fitness. *GeroScience* **39**, 293–303 (2017).
 82. Ljungman, P., Hakki, M. & Boeckh, M. Cytomegalovirus in Hematopoietic Stem Cell Transplant Recipients. *Hematology/Oncology Clinics of North America* **25**, 151–169 (2011).
 83. Emery, V. C., Cope, A. V., Bowen, E. F., Gor, D. & Griffiths, P. D. The dynamics of human cytomegalovirus replication in vivo. *Journal of Experimental Medicine* **190**, 177–182 (1999).
 84. Emery, V. C., Sabin, C. A., Cope, A. V., Gor, D., Hassan-walker, A. F. & Griffiths, P. D. Application of viral-load kinetics to identify patients who develop cytomegalovirus disease after transplantation. *Lancet* **355**, 2032–2036 (2000).
 85. Jackson, S. E., Mason, G. M. & Wills, M. R. Human cytomegalovirus immunity and immune evasion. *Virus Research* **157**, 151–160 (2011).
 86. Griffiths, P., Baraniak, I. & Reeves, M. The pathogenesis of human cytomegalovirus. *Journal of Pathology* **235**, 288–297 (2015).
 87. Goodrum, F., Caviness, K. & Zagallo, P. Human cytomegalovirus persistence. *Cellular Microbiology* **14**, 644–655 (2012).
 88. Cannon, M. J., Schmid, D. S. & Hyde, T. B. Review of cytomegalovirus seroprevalence and demographic characteristics associated with. *Reviews in Medical Virology* **4**, 202–213 (2010) .
 89. Lachmann, R., Loenenbach, A., Waterboer, T., Brenner, N., Pawlita, M., Michel, A., Thamm, M., Poethko-mu, C., Wichmann, O. & Wiese-posselt, M. Cytomegalovirus (CMV) seroprevalence in the adult population of Germany. *PLoS ONE* **13(7)** (2018).
 90. Manandhar, Hò, Pump, Blaszczyk & Bade-Doeding. Battle between Host Immune Cellular Responses and HCMV Immune Evasion. *International Journal of Molecular Sciences* **20**, 3626 (2019).
 91. Marsico, C. & Kimberlin, D. W. Congenital Cytomegalovirus infection: Advances and challenges in diagnosis, prevention and treatment. *Italian Journal of Pediatrics* **43**, 1–8 (2017).
 92. Thackeray, R., Wright, A. & Chipman, K. Congenital cytomegalovirus reference material: a content analysis of coverage and accuracy. *Maternal and child health journal* **18**, 584–591 (2014).
 93. Kano, Y. & Shiohara, T. Current understanding of cytomegalovirus infection in immunocompetent individuals. *Journal of Dermatological Science* **22**, 196–204 (2000).
 94. Herold, G. Innere Medizin (2013). *Herold Verlag* (2013).
 95. Simanek, A. M., Dowd, J. B., Pawelec, G., Melzer, D., Dutta, A. & Aiello, A. E. Seropositivity to cytomegalovirus, inflammation, all-cause and cardiovascular disease-related mortality in the United States. *PLoS ONE* **6** (2011).
 96. Savva, G. M., Pachnio, A., Kaul, B., Morgan, K., Huppert, F. A., Brayne, C. & Moss, P. A. H. Cytomegalovirus infection is associated with increased mortality in the older population. *Aging Cell* **12**, 381–387 (2013).
 97. Terrazzini, N. & Kern, F. Cell-mediated immunity to human CMV infection: A brief overview. *F1000Prime Reports* **6**, 6-28 (2014).

98. Sylwester, A., Nambiar, K. Z., Caserta, S., Klenerman, P., Picker, L. J. & Kern, F. A new perspective of the structural complexity of HCMV-specific T-cell responses. *Mechanisms of Ageing and Development* **158**, 14–22 (2016).
99. Bajwa, M., Vita, S., Vescovini, R., Larsen, M., Sansoni, P., Terrazzini, N., Caserta, S., Thomas, D., Davies, K. A., Smith, H. & Kern, F. Functional Diversity of Cytomegalovirus-Specific T Cells Is Maintained in Older People and Significantly Associated with Protein Specificity and Response Size. *Journal of Infectious Diseases* **214**, 1430–1437 (2016).
100. Kern, F., Bunde, T., Faulhaber, N., Kiecker, F., Khatamzas, E., Rudawski, I., Pruss, A., Gratama, J., Volkmer-Engert, R., Ewert, R., Reinke, P., Volk, H. & Picker, L. J. Cytomegalovirus (CMV) Phosphoprotein 65 Makes a Large Contribution to Shaping the T Cell Repertoire in CMV-Exposed Individuals. *The Journal of Infectious Diseases* **185**, 1709–1716 (2002).
101. Dunn, H. S., Haney, D. J., Ghanekar, S. A., Stepick-Biek, P., Lewis, D. B. & Maecker, H. T. Dynamics of CD4 and CD8 T Cell Responses to Cytomegalovirus in Healthy Human Donors. *The Journal of Infectious Diseases* **186**, 15–22 (2002).
102. Komatsu, H., Inui, A., Sogo, T., Fujisawa, T., Nagasaka, H., Nonoyama, S., Sierro, S., Northfield, J., Lucas, M., Vargas, A. & Klenerman, P. Large scale analysis of pediatric antiviral CD8+ T cell populations reveals sustained, functional and mature responses. *Immunity and Ageing* **3**, 1–11 (2006).
103. Vescovini, R., Biasini, C., Fagnoni, F. F., Telera, A. R., Zanlari, L., Pedrazzoni, M., Bucci, L., Monti, D., Medici, M. C., Chezzi, C., Franceschi, C. & Sansoni, P. Massive Load of Functional Effector CD4 + and CD8 + T Cells against Cytomegalovirus in Very Old Subjects. *The Journal of Immunology* **179**, 4283–4291 (2007).
104. Griffiths, S. J., Riddell, N. E., Masters, J., Libri, V., Henson, S. M., Wertheimer, A., Wallace, D., Sims, S., Rivino, L., Larbi, A., Kemeny, D. M., Nikolich-Zugich, J., Kern, F., Klenerman, P., Emery, V. C. & Akbar, A. N. Age-Associated Increase of Low-Avidity Cytomegalovirus-Specific CD8 + T Cells That Re-Express CD45RA. *The Journal of Immunology* **190**, 5363–5372 (2013).
105. O’Hara, G. A., Welten, S. P. M., Klenerman, P. & Arens, R. Memory T cell inflation: Understanding cause and effect. *Trends in Immunology* **33**, 84–90 (2012).
106. Van Der Bij, W., Torensma, R., Van Son, W. J., Anema, J., Schirm, J., Tegzess, A. M. & The, T. H. Rapid immunodiagnosis of active cytomegalovirus infection by monoclonal antibody staining of blood leucocytes. *Journal of Medical Virology* **25**, 179–188 (1988).
107. Chen, G., Shankar, P., Lange, C., Valdez, H., Skolnik, P. R., Wu, L., Manjunath, N. & Lieberman, J. CD8 T cells specific for human immunodeficiency virus, Epstein-Barr virus, and cytomegalovirus lack molecules for homing to lymphoid sites of infection. *Blood* **98**, 156–164 (2001).
108. Kuijpers, T. W., Vossen, M. T., Gent, M.-R., Davin, J.-C., Roos, M. T., Wertheim-van Dillen, P. M., Weel, J. F., Baars, P. A. & van Lier, R. A. Frequencies of Circulating Cytolytic, CD45RA+CD27–CD8+ T Lymphocytes Depend on Infection with CMV. *The Journal of Immunology* **170**, 4342–4348 (2003).
109. Derhovanessian, E., Maier, A. B., Hähnel, K. H., Beck, R., de Craen, A. J. M., Slagboom, E. P., Westendorp, R. G. J. & Pawelec, G. Infection with cytomegalovirus but not herpes simplex virus induces the accumulation of late-differentiated CD4 + and CD8 + T-cells in humans. *Journal of General Virology* **92**, 2746–2756 (2011).
110. Appay, V., Dunbar, P. R., Callan, M., Klenerman, P., Gillespie, G. M. A., Papagno, L., Ogg, G. S., King, A., Lechner, F., Spina, C. A., Little, S., Havlir, D. V., Richman, D. D., Gruener, N., Pape, G., Waters, A., Easterbrook, P., Salio, M., Cerundolo, V., McMichael, A. J. & Rowland-Jones, S. L. Memory CD8+ T cells vary in differentiation phenotype in different persistent virus infections. *Nature Medicine* **8**, 379–385 (2002).
111. Munks, M. W., Cho, K. S., Pinto, A. K., Sierro, S., Klenerman, P. & Hill, A. B. Four Distinct Patterns of Memory CD8 T Cell Responses to Chronic Murine Cytomegalovirus Infection. *The Journal of Immunology* **177**, 450–458 (2006).
112. Hertoghs, K. M. L., Moerland, P. D., Stijn, A. Van, Remmerswaal, E. B. M., Yong, S. L., Berg, P. J. E. J. Van De, Ham, S. M. Van, Baas, F., Berge, I. J. M. & Lier, R. A. W. Van. Molecular profiling of cytomegalovirus-induced human CD8+ T cell differentiation Kirsten. *Journal of Clinical Investigation* **120**, 4077–4090 (2010).
113. Sauce, D., Almeida, J. R., Larsen, M., Haro, L., Autran, B., Freeman, G. J. & Appay, V. PD-1 expression on human CD8 T cells depends on both state of differentiation and activation status. *Aids* **21**, 2005–2013 (2007).
114. Snyder, C. M. Buffered memory: A hypothesis for the maintenance of functional, virus-specific CD8 + T cells during cytomegalovirus infection. *Immunologic Research* **51**, 195–204 (2011).
115. Iancu, E. M., Corthesy, P., Baumgaertner, P., Devevre, E., Voelter, V., Romero, P., Speiser, D. E. & Rufer, N. Clonotype Selection and Composition of Human CD8 T Cells Specific for Persistent Herpes Viruses Varies with Differentiation but Is Stable Over Time. *The Journal of Immunology* **183**, 319–331 (2009).
116. Wang, G. C., Dash, P., McCullers, J. A., Doherty, P. C. & Thomas, P. G. T cell receptor $\alpha\beta$ diversity inversely correlates with pathogen-specific antibody levels in human cytomegalovirus infection. *Science Translational Medicine* **128 (4)** (2012).
117. Pourgheysari, B., Khan, N., Best, D., Bruton, R., Nayak, L. & Moss, P. A. H. The Cytomegalovirus-Specific CD4+ T-Cell Response Expands with Age and Markedly Alters the CD4+ T-Cell Repertoire. *Journal of Virology* **81**, 7759–7765 (2007).
118. Polić, B., Hengel, H., Krmpotić, A., Trgovcich, J., Pavić, I., Lučin, P., Jonjić, S. & Koszinowski, U. H.

- Hierarchical and redundant lymphocyte subset control precludes cytomegalovirus replication during latent infection. *Journal of Experimental Medicine* **188**, 1047–1054 (1998).
119. Gerna, G., Lilleri, D., Fornara, C., Comolli, G., Lozza, L., Campana, C., Pellegrini, C., Meloni, F. & Rampino, T. Monitoring of human cytomegalovirus-specific CD4+ and CD8 + T-cell immunity in patients receiving solid organ transplantation. *American Journal of Transplantation* **6**, 2356–2364 (2006).
 120. Bajwa, M., Vita, S., Vescovini, R., Larsen, M., Sansoni, P., Terrazzini, N., Caserta, S., Thomas, D., Davies, K. A., Smith, H. & Kern, F. CMV-specific T-cell responses at older ages: Broad responses with a large central memory component may be key to long-term survival. *Journal of Infectious Diseases* **215**, 1212–1220 (2017).
 121. Roberts, E. T., Haan, M. N., Dowd, J. B. & Aiello, A. E. Cytomegalovirus antibody levels, inflammation, and mortality among elderly latinos over 9 years of follow-up. *American Journal of Epidemiology* **172**, 363–371 (2010).
 122. Strindhall, J., Skog, M., Ernerudh, J., Bengner, M., Löfgren, S., Matussek, A., Nilsson, B. O. & Wikby, A. The inverted CD4/CD8 ratio and associated parameters in 66-year-old individuals: The Swedish HEXA immune study. *Age* **35**, 985–991 (2013).
 123. Teira, P., Battiwalla, M., Ramanathan, M., Barrett, A. J., Ahn, K. W., Chen, M., Green, J. S., Saad, A., Antin, J. H., Savani, B. N., Lazarus, H. M., Seftel, M., Saber, W., Marks, D., Aljurf, M., Norkin, M., Wingard, J. R., Lindemans, C. A., Boaeckh, M., Riches, M. L. & Auletta, J. J. Early cytomegalovirus reactivation remains associated with increased transplant-related mortality in the current era: a CIBMTR analysis. *Blood* **127**, 2427–2438 (2016).
 124. Green, M. L., Leisenring, W., Xie, H., Mast, T. C., Cui, Y., Sandmaier, B. M., Sorrow, M. L., Goyal, S., Özkök, S., Yi, J., Sahoo, F., Kimball, L. E., Jerome, K. R., Marks, M. A. & Boeckh, M. Cytomegalovirus viral load and mortality after haemopoietic stem cell transplantation in the era of pre-emptive therapy: a retrospective cohort study. *The Lancet. Haematology* **3**, e119–e127 (2016).
 125. Crough, T. & Khanna, R. Immunobiology of human cytomegalovirus: From bench to bedside. *Clinical Microbiology Reviews* **22**, 76–98 (2009).
 126. Radha, R., Jordan, S., Puliyaanda, D., Bunnapradist, S., Petrosyan, A., Amet, N. & Toyoda, M. Cellular Immune Responses to Cytomegalovirus in. *American Journal of Transplantation* 110–117 (2005).
 127. Riddell, S. R., Watanabe, K. S., Goodrich, J. M., Li, C. R., Agha, M. E. & Greenberg, P. D. Restoration of viral immunity in immunodeficient humans by the adoptive transfer of t cell clones. *Science* **257**, 238–241 (1992).
 128. Mui, T. S., Kapp, M., Einsele, H. & Grigoleit, G. U. T-cell therapy for cytomegalovirus infection. *Current Opinion in Organ Transplantation* **15**, 744–750 (2010).
 129. Stern, A. & Papanicolaou, G. A. CMV Prevention and Treatment in Transplantation: What’s New in 2019. *Current Infectious Disease Reports* **21**, 1–11 (2019).
 130. Migliori, E., Chang, M. & Muranski, P. Restoring antiviral immunity with adoptive transfer of ex-vivo generated T cells. *Current opinion in hematology* **25**, 486–493 (2018).
 131. Wills, M. R., Okecha, G., Weekes, M. P., Gandhi, M. K., Sissons, P. J. G. & Carmichael, A. J. Identification of Naive or Antigen-Experienced Human CD8 + T Cells by Expression of Costimulation and Chemokine Receptors: Analysis of the Human Cytomegalovirus-Specific CD8 + T Cell Response . *The Journal of Immunology* **168**, 5455–5464 (2002).
 132. De Rosa, S. C., Herzenberg, L. A., Herzenberg, L. A. & Roederer, M. 11-color, 13-parameter flow cytometry: Identification of human naive T cells by phenotype, function, and T-cell receptor diversity. *Nature Medicine* **7**, 245–248 (2001).
 133. Michie, C. A., McLean, A., Alcock, C. & Beverly, P. C. . Lifespan of human lymphocyte subsets defined by CD45 isoforms. *Letters to Nature* **360**, (1992).
 134. Mackay, C. R. Homing of naive, memory and effector lymphocytes. *Current Opinion in Immunology* **5**, 423–427 (1993).
 135. Sharma, K., Wang, R. X., Zhang, L. Y., Yin, D. L., Luo, X. Y., Solomon, J. C., Jiang, R. F., Markos, K., Davidson, W., Scott, D. W. & Shi, Y. F. Death the Fas way: Regulation and pathophysiology of CD95 and its ligand. *Pharmacology and Therapeutics* **88**, 333–347 (2000).
 136. Tchilian, E. Z. & Beverley, P. C. L. Altered CD45 expression and disease. *Trends in Immunology* **27**, 146–153 (2006).
 137. Cole, K. E., Strick, C. A., Paradis, T. J., Ogborne, K. T., Loetscher, M., Gladue, R. P., Lin, W., Boyd, J. G., Moser, B., Wood, D. E., Sahagan, B. G. & Neote, K. Interferon-inducible T cell alpha chemoattractant (I-TAC): A novel non- ELR CXC chemokine with potent activity on activated T cells through selective high affinity binding to CXCR3. *Journal of Experimental Medicine* **187**, 2009–2021 (1998).
 138. Groom, J. R. & Luster, A. D. CXCR3 in T cell function. *Experimental Cell Research* **317**, 620–631 (2011).
 139. Campanella, G. S. V., Medoff, B. D., Manice, L. A., Colvin, R. A. & Luster, A. D. Development of a novel chemokine-mediated in vivo T cell recruitment assay. *Journal of Immunological Methods* **331**, 127–139 (2008).
 140. Loetscher, M., Loetscher, P., Brass, N., Meese, E. & Moser, B. Lymphocyte-specific chemokine receptor CXCR3: Regulation, chemokine binding and gene localization. *European Journal of Immunology* **28**, 3696–3705 (1998).
 141. Vollmer, T., Schlickeiser, S., Amini, L., Schulenberg, S., Wendinger, D. J., Banday, V., Jurisch, A., Noster, R.,

- Kunkel, D., Brindle, N. R., Savidis, I., Akyüz, L., Hecht, J., Stervbo, U., Roch, T., Babel, N., Reinke, P., Winqvist, O., Sherif, A., Volk, H. D. & Schmuck-Henneresse, M. The intratumoral CXCR3 chemokine system is predictive of chemotherapy response in human bladder cancer. *Science translational medicine* **13** (2021).
142. Hickman, H. D., Reynoso, G. V., Ngudiankama, B. F., Cush, S. S., Gibbs, J., Bennink, J. R. & Yewdell, J. W. CXCR3 chemokine receptor enables local CD8+ T cell migration for the destruction of virus-infected cells. *Immunity* **42**, 524–537 (2015).
143. Groom, J. R. & Luster, A. D. CXCR3 in T cell function. *Cell* **317**, 620–631 (2012).
144. Szentés, V., Gazdag, M., Szokodi, I. & Dézsi, C. A. The Role of CXCR3 and Associated Chemokines in the Development of Atherosclerosis and During Myocardial Infarction. *Frontiers in immunology* **9**, 1932 (2018).
145. Kuo, P. T., Zeng, Z., Salim, N., Mattarollo, S., Wells, J. W. & Leggatt, G. R. The role of CXCR3 and its chemokine ligands in skin disease and cancer. *Frontiers in Medicine* **5**, 1–10 (2018).
146. Lacotte, S., Brun, S., Muller, S. & Dumortier, H. CXCR3, Inflammation, and Autoimmune Diseases. *Annals of the New York Academy of Sciences* **1173**, 310–317 (2009).
147. Xie, J. H., Nomura, N., Lu, M., Chen, S., Koch, G. E., Weng, Y., Rosa, R., Salvo, J. Di, Mudgett, J., Peterson, L. B., Wicker, L. S. & Demartino, J. A. Antibody-mediated blockade of the CXCR3 chemokine receptor results in diminished recruitment of T helper 1 cells into sites of inflammation. *Journal of leucocyte biology* **73**, 771–780 (2003).
148. Gerlach, C., Moseman, E. A., Loughhead, S. M., Alvarez, D., Zwijnenburg, A. J., Waanders, L., Garg, R., de la Torre, J. C. & von Andrian, U. H. The Chemokine Receptor CX3CR1 Defines Three Antigen-Experienced CD8 T Cell Subsets with Distinct Roles in Immune Surveillance and Homeostasis. *Immunity* **45**, 1270–1284 (2016).
149. Nishimura, M., Umehara, H., Nakayama, T., Yoneda, O., Hieshima, K., Kakizaki, M., Dohmae, N., Yoshie, O. & Imai, T. Dual Functions of Fractalkine/CX3C Ligand 1 in Trafficking of Perforin + Granzyme B + Cytotoxic Effector Lymphocytes That Are Defined by CX3CR1 Expression. *The Journal of Immunology* **168**, 6173–6180 (2002).
150. Böttcher, J. P., Beyer, M., Meissner, F., Abdullah, Z., Sander, J., Höchst, B., Eickhoff, S., Rieckmann, J. C., Russo, C., Bauer, T., Flecken, T., Giesen, D., Engel, D., Jung, S., Busch, D. H., Protzer, U., Thimme, R., Mann, M., Kurts, C., Schultze, J. L., Kastenmüller, W. & Knolle, P. A. Functional classification of memory CD8 + T cells by CX3CR1 expression. *Nature Communications* **6**, (2015).
151. Jin, H.-T., Ahmed, R. & Okazaki, T. Role of PD-1 in Regulating T-Cell Immunity - Negative Co-Receptors and Ligands. in (eds. Ahmed, R. & Honjo, T.) 17–37 (Springer Berlin Heidelberg, 2011).
152. Okazaki, T. & Honjo, T. The PD-1 – PD-L pathway in immunological tolerance. *Trends in Immunology* **27**, (2006).
153. Kawakami, Y., Ohta, S., Sayem, M. A., Tsukamoto, N. & Yaguchi, T. Immune - resistant mechanisms in cancer immunotherapy. *International Journal of Clinical Oncology* (2020).
154. Chemnitz, J. M., Parry, R. V., Nichols, K. E., June, C. H. & Riley, J. L. SHP-1 and SHP-2 Associate with Immunoreceptor Tyrosine-Based Switch Motif of Programmed Death 1 upon Primary Human T Cell Stimulation, but Only Receptor Ligation Prevents T Cell Activation. *The Journal of Immunology* **173**, 945–954 (2004).
155. Kern, F., Faulhaber, N., Frommel, C., Khatamzas, E., Präsen, S., Schönemann, C., Kretzschmar, I., Volkmer-Engert, R., Volk, H. D. & Reinke, P. Analysis of CD8 T cell reactivity to cytomegalovirus using protein-spanning pools of overlapping pentadecapeptides. *European Journal of Immunology* **30**, 1676–1682 (2000).
156. Han, Q., Bagheri, N., Bradshaw, E. M., Hafler, D. A., Lauffenburger, D. A. & Love, J. C. Polyfunctional responses by human T cells result from sequential release of cytokines. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **109**, 1607–1612 (2012).
157. Bird, J. J., Brown, D. R., Mullen, A. C., Moskowitz, N. H., Mahowald, M. A., Sider, J. R., Gajewski, T. F., Wang, C. R. & Reiner, S. L. Helper T cell differentiation is controlled by the cell cycle. *Immunity* **9**, 229–237 (1998).
158. Hamann, D. Phenotypical and functional separation of memory and effector human CD8pos T cells. *Immunology Letters* **56**, 198 (1997).
159. Scheurich, P., Thoma, B., Ucer, U. & Pfizenmaier, K. Immunoregulatory activity of recombinant human tumor necrosis factor (TNF) -alpha : induction of TNF receptors on human T cells and TNF-alpha-mediated enhancement of T cell responses. *Journal of immunology* **138**, 1786-1790 (1987).
160. Wölfel, Matthias; Kuball, Jürgen; Eyrich, Matthias; Schlegel, Paul G., and Greenberg, P. D. Use of CD137 to study the full repertoire of CD8+ T cells without the need to know epitope specificities. *Cytometry* **73**, 1043–1049 (2009).
161. Kern, F., Surel, I. P., Brock, C., Freistedt, B., Radtke, H., Scheffold, A., Blsczyk, R., Reinke, P., Schneider-Mergener, J., Radbruch, A., Walden, P. & Volk, H. T-cell epitope mapping by flow cytometry. *Nature medicine* **4(8)**, 975-78 (1998).
162. Klausner, R. D., Donaldson, J. G. & Lippincott-Schwartz, J. Brefeldin A: Insights into the control of membrane traffic and organelle structure. *Journal of Cell Biology* **116**, 1071–1080 (1992).
163. Takatsuki, A. & Tamura, G. Brefeldin A, a Specific Inhibitor of Intracellular Translocation of Vesicular Stomatitis Virus G Protein: Intracellular Accumulation of High-mannose Type G Protein and Inhibition of Its Cell Surface Expression. *Agricultural and Biological Chemistry* **49**, 899–902 (1985).

164. Luttmann, W., Bratke, K., Küpper, M. & Myrtek, D. *Der Experimentator-Immunologie., Spektrum Akademischer Verlag* (2014).
165. Zhang, X., Dong, H., Lin, W., Voss, S., Hinkley, L., Westergren, M., Tian, G., Berry, D., Lewellen, D., Vile, R. G., Chen, L., Farber, D. L. & Strome, S. E. Human Bone Marrow: A Reservoir for “Enhanced Effector Memory” CD8 + T Cells with Potent Recall Function . *The Journal of Immunology* **177**, 6730–6737 (2006).
166. Martin, M. D. & Badovinac, V. P. Defining memory CD8 T cell. *Frontiers in Immunology* **9**, 1–10 (2018).
167. Van Epps, P., Banks, R., Aung, H., Betts, M. R. & Canaday, D. H. Age-related differences in polyfunctional T cell responses. *Immunity & Ageing* **11**, 14 (2014).
168. Jackson, S. E., Mason, G. M., Okecha, G., Sissons, J. G. P. & Wills, M. R. Diverse Specificities, Phenotypes, and Antiviral Activities of Cytomegalovirus-Specific CD8+ T Cells. *Journal of Virology* **88**, 10894–10908 (2014).
169. Chiu, Y. L., Lin, C. H., Sung, B. Y., Chuang, Y. F., Schneck, J. P., Kern, F., Pawelec, G. & Wang, G. C. Cytotoxic polyfunctionality maturation of cytomegalovirus-pp65-specific CD4+ and CD8+ T-cell responses in older adults positively correlates with response size. *Scientific Reports* **6**, 1–11 (2016).
170. Qin, S., Rottman, J. B., Myers, P., Kassam, N., Weinblatt, M., Loetscher, M., Koch, A. E., Moser, B. & Mackay, C. R. The chemokine receptors CXCR3 and CCR5 mark subsets of T cells associated with certain inflammatory reactions. *Journal of Clinical Investigation* **101**, 746–754 (1998).
171. Gattinoni, L. Memory T Cells Officially Join the Stem Cell Club. *Immunity* **41**, 7–9 (2014).
172. Van De Berg, P. J. E. J., Yong, S. La, Remmerswaal, E. B. M., Van Lier, R. A. W. & Ten Berge, I. J. M. Cytomegalovirus-induced effector T cells cause endothelial cell damage. *Clinical and Vaccine Immunology* **19**, 772–779 (2012).
173. Sharpe, A. H. & Pauken, K. E. The diverse functions of the PD1 inhibitory pathway. *Nature Reviews Immunology* **18**, 153–167 (2018).
174. Kostense, S., Ogg, G. S., Manting, E. H., Gillespie, G., Joling, J., Vandenberghe, K., Veenhof, E. Z., Van Baarle, D., Jurriaans, S., Klein, M. R. & Miedema, F. High viral burden in the presence of major HIV-specific CD8+ T cell expansions: Evidence for impaired CTL effector function. *European Journal of Immunology* **31**, 677–686 (2001).
175. Ahn, E., Araki, K., Hashimoto, M., Li, W., Riley, J. L., Cheung, J., Sharpe, A. H., Freeman, G. J., Irving, B. A. & Ahmed, R. Role of PD-1 during effector CD8 T cell differentiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **115**, 4749–4754 (2018).
176. Vescovini, R., Fagnoni, F. F., Telera, A. R., Bucci, L., Pedrazzoni, M., Magalini, F., Stella, A., Pasin, F., Medici, M. C., Calderaro, A., Volpi, R., Monti, D., Franceschi, C., Nikolich-Zugich, J. & Sansoni, P. Naïve and memory CD8 T cell pool homeostasis in advanced aging: Impact of age and of antigen-specific responses to cytomegalovirus. *Age* **36**, 625–640 (2014).
177. Lachmann, R., Bajwa, M., Vita, S., Smith, H., Cheek, E., Akbar, A. & Kern, F. Polyfunctional T Cells Accumulate in Large Human Cytomegalovirus-Specific T Cell Responses. *Journal of Virology* **86**, 1001–1009 (2012).
178. Kumar, B. V, Connors, T. & Farber, D. L. Human T cell development, localization, and function throughout life. **48**, 202–213 (2019).
179. Thome, J. J. C., Yudanin, N., Ohmura, Y., Kubota, M., Grinshpun, B., Sathaliyawala, T., Kato, T., Lerner, H., Shen, Y. & Farber, D. L. Maintenance Over Decades of Life. *Cell* **159**, 814–828 (2014).
180. Brown, M. A. & Su, M. A. An Inconvenient Variable: Sex Hormones and Their Impact on T Cell Responses. *The Journal of Immunology* **202**, 1927–1933 (2019).

Eidesstaatliche Versicherung

„Ich, [Eva Hasselmann], versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: [Charakterisierung von T-Stammzell-Gedächtnis Zellen (T_{scm}) in verschiedenen Alterskohorten/ Characterization of T stem cell memory cells (T_{scm}) in distinct age bands] selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren/innen beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) werden von mir verantwortet.

Ich versichere ferner, dass ich die in Zusammenarbeit mit anderen Personen generierten Daten, Datenauswertungen und Schlussfolgerungen korrekt gekennzeichnet und meinen eigenen Beitrag sowie die Beiträge anderer Personen korrekt kenntlich gemacht habe (siehe Anteilserklärung). Texte oder Textteile, die gemeinsam mit anderen erstellt oder verwendet wurden, habe ich korrekt kenntlich gemacht.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Erstbetreuer/in, angegeben sind. Für sämtliche im Rahmen der Dissertation entstandenen Publikationen wurden die Richtlinien des ICMJE (International Committee of Medical Journal Editors; www.icmje.org) zur Autorenschaft eingehalten. Ich erkläre ferner, dass ich mich zur Einhaltung der Satzung der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis verpflichte.

Weiterhin versichere ich, dass ich diese Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits an einer anderen Fakultät eingereicht habe.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§§156, 161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

Unterschrift

Curriculum vitae

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

Danksagung

Ich bedanke mich bei meinem Erstbetreuer Prof. Hans-Dieter Volk für die Ermöglichung meines Dissertationsvorhabens, die Aufnahme in die Arbeitsgruppe und die langjährige Unterstützung, Anregung und Kritik sowie bei Frau Prof. Petra Reinke für die Übernahme der Zweitbetreuung.

Besonderer Dank gilt meinem Betreuer Dr. Michael Schmück-Henneresse zunächst für die Bereitstellung des Dissertationsthemas, die Einarbeitung im Laboralltag, die vielen konstruktiven Auswertungen und Gespräche. Insbesondere dankbar bin ich ihm dafür, dass er mich auch in der langwierigen Zeit des Schreibens immer wieder geduldig motiviert und gefordert hat und somit die Fertigstellung der Arbeit erst ermöglicht hat. Danke für dein Vertrauen.

Des Weiteren danke ich der AG Volk für die Bereitstellung der Laborräume, Geräte, Materialien und Zeit. Meinen Kollegen Leila, Tino, Jacky, Julia, Anke, Marco, Lisa und Constantin danke ich für viele gemeinsame Stunden unter der Bench, Ratschläge und Kritik, Ideen und immer offene Ohren.

Meinen Freunden und meiner Familie danke ich für ihre Geduld, Motivation und dafür, dass sie den Glauben an mich und die Fertigstellung dieser Arbeit nie aufgegeben haben.

Bescheinigung des akkreditierten Statistikers



CharitéCentrum für Human- und Gesundheitswissenschaften

Charité | Campus Charité Mitte | 10117 Berlin

Institut für Biometrie und klinische Epidemiologie (iBikE)

Direktor: Prof. Dr. Geraldine Rauch

Name, Vorname: Hasselmann, Eva
Emailadresse: eva.hasselmann@charite.de
Matrikelnummer: 226539
PromotionsbetreuerIn: Univ.-Prof. Dr. Hans-Dieter Volk
Promotionsinstitution / Klinik: Institut für Medizinische Immunologie

Postanschrift:
Charitéplatz 1 | 10117 Berlin
Besucheranschrift:
Reinhardtstr. 58 | 10117 Berlin

Tel. +49 (0)30 450 562171
geraldine.rauch@charite.de
<https://biometrie.charite.de/>



Bescheinigung

Hiermit bescheinige ich, dass Frau Eva Hasselmann innerhalb der Service Unit Biometrie des Instituts für Biometrie und klinische Epidemiologie (iBikE) bei mir eine statistische Beratung zu einem Promotionsvorhaben wahrgenommen hat. Folgende Beratungstermine wurden wahrgenommen:

- Termin 1: 24.10.2019

Folgende wesentliche Ratschläge hinsichtlich einer sinnvollen Auswertung und Interpretation der Daten wurden während der Beratung erteilt:

- Überprüfung von Normalverteilungsannahmen und mögliche Konsequenzen (z.B. Transformation von Daten; Anwendung nicht parametrischer Statistik)
- Hypothesengenerierende Interpretation der p-Werte (explorativ)

Diese Bescheinigung garantiert nicht die richtige Umsetzung der in der Beratung gemachten Vorschläge, die korrekte Durchführung der empfohlenen statistischen Verfahren und die richtige Darstellung und Interpretation der Ergebnisse. Die Verantwortung hierfür obliegt allein dem Promovierenden. Das Institut für Biometrie und klinische Epidemiologie übernimmt hierfür keine Haftung.

Datum: 07.01.2021

Name des Beraters/ der Beraterin: Oliver Schweizerhof

Digital unterschrieben
von Oliver Schweizerhof
Datum: 2021.01.07
13:52:31 +01'00'

Unterschrift BeraterIn, Institutsstempel

