

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

Polarisation von T-Zellen

**Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Naturwissenschaften
der Medizinischen Fakultät
der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES
2023**

vorgelegt von: Christian Junker
geb. am: 26.10.1982 in Lebach

Die experimentellen Arbeiten der vorliegenden Dissertation wurden im Institut für Biophysik am Zentrum für integrative Physiologie und Medizin der Universität des Saarlandes durchgeführt.

Tag der Promotion: 05. März 2024

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med Michael D. Menger

Berichterstatter: Prof. Markus Hoth

Prof. Martina Sester

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung.....	- 8 -
Summary.....	- 10 -
1 Einleitung.....	- 12 -
1.1 Zell-Polarisation	- 12 -
1.1.1 Zytoskelett-Polarisation	- 14 -
1.1.2 Organell-Polarisation.....	- 17 -
1.2 T-Zell-Polarisation	- 20 -
1.3 Zielsetzung dieser Arbeit.....	- 25 -
2 Material & Methoden	- 26 -
2.1 Material.....	- 26 -
2.1.1 Chemikalien.....	- 26 -
2.1.2 Medien und Pufferlösungen	- 27 -
2.1.3 Labor-„Kits“	- 27 -
2.1.4 Antikörper	- 27 -
2.1.5 Plasmide	- 28 -
2.1.6 Mikro-Partikel („Beads“)	- 28 -
2.1.7 Zelltypen / -linien	- 29 -
2.1.8 Geräte.....	- 29 -
2.1.9 Software	- 30 -
2.2 Kultur und Präparation von Zellen.....	- 30 -
2.2.1 Kultivierung von HeLa-Zellen	- 30 -
2.2.2 Kultivierung von Jurkat- und Raji-Zellen	- 31 -
2.2.3 Erzeugung einer stabil Ora1-exprimierenden Jurkat-Zelllinie	- 31 -
2.2.4 Humane CD8 ⁺ T-Lymphozyten	- 31 -
2.2.4.1 Isolation peripherer Blutlymphozyten aus Leukozyten-Reduktionsfiltern..	- 31 -
2.2.4.2 Negativ-Isolation von humanen CD8 ⁺ T-Lymphozyten	- 31 -
2.2.4.3 „Bead“-Stimulation von humanen CD8 ⁺ T-Lymphozyten.....	- 31 -
2.2.4.4 Erzeugung und Isolation von SEA-stimulierten CD8 ⁺ T-Lymphozyten	- 32 -

2.3 Klonierung von Plasmiden	- 32 -
2.3.1 Umwandlung von TagRFP zu TagRFP-T	- 32 -
2.3.2 Klonierung von ‚ER-TagRFP-T‘	- 33 -
2.3.3 Klonierung von ‚Lifeact-mEGFP‘	- 33 -
2.3.4 Klonierung von ‚mito-mTFP1‘	- 34 -
2.4 Transfektion	- 34 -
2.4.1 Transfektion von HeLa-Zellen.....	- 34 -
2.4.2 Transfektion von Jurkat CD4 ⁺ T-Lymphozyten	- 34 -
2.4.3 Transfektion von humanen stimulierten CD8 ⁺ T-Lymphozyten.....	- 34 -
2.5 Versuchsvorbereitungen.....	- 35 -
2.5.1 Präparation von Deckgläsern	- 35 -
2.5.2 Fluoreszenz-Färbungen von Zellen	- 35 -
2.5.3 anti-CD3-Antikörper-Inkubation von lebenden T-Zellen	- 36 -
2.5.4 Beladung von Raji B-Zellen mit Superantigenen.....	- 36 -
2.5.5 Beschichtung von 5,8 µm „Beads“ mit anti-CD3-Antikörpern.....	- 37 -
2.5.6 Fixierung, Permeabilisierung und Antikörper-Färbungen von T-Zellen.....	- 37 -
2.6 Durchführung der mikroskopischen Experimente.....	- 37 -
2.6.1 Epi-Fluoreszenz Z-Stapel-Einzelzeitpunkt-Aufnahmen	- 37 -
2.6.1.1 Mehrfach-Färbung von HeLa- und T-Zellen	- 37 -
2.6.1.2 Mehrfach-Färbung von ER-TagRFP-T-transfizierten HeLa-Zellen.....	- 38 -
2.6.1.3 Antikörper-Inkubation und Mehrfach-Färbung von Jurkat CD4 ⁺ T-Zellen...	- 38 -
2.6.1.4 Mehrfach-Transfektion und mitochondriale Fission in Jurkat CD4 ⁺ T-Zellen-	- 38 -
2.6.2 Epi-Fluoreszenz Zeitrafferaufnahmen von T- und B-Zellen	- 39 -
2.6.2.1 Z-Stapel-Zeitrafferaufnahmen von Lifeact-mEGFP-transfizierten „Bead“-stimulierten CD8 ⁺ T-Zellen	- 39 -
2.6.2.2 Z-Stapel-Zeitrafferaufnahmen von γ-Tubulin-EGFP-transfizierten SEA-stimulierten CD8 ⁺ T-Zellen.....	- 40 -
2.6.2.3 Z-Stapel-Zeitrafferaufnahmen von Vesikeln in „Bead“-stimulierten CD8 ⁺ T-Zellen.....	- 40 -
2.6.2.4 Zeitrafferaufnahmen von Mitochondrien in SEA-stimulierten CD8 ⁺ T-Zellen im Kontakt mit SEA-beladenen Raji B-Zellen	- 41 -
2.6.2.5 Zeitrafferaufnahmen von mehrfach-gefärbten SEA-stimulierten CD8 ⁺ T-Zellen im Kontakt mit SEA-beladenen Raji B-Zellen an Pipetten	- 41 -

2.6.2.6	Z-Stapel-Zeitrafferaufnahmen von mehrfach-gefärbten SEA-stimulierten CD8 ⁺ T-Zellen im Kontakt mit SEA-beladenen Raji B-Zellen	- 41 -
2.6.2.7	Z-Stapel-Zeitrafferaufnahmen von mehrfach-gefärbten Jurkat CD4 ⁺ T-Zellen im Kontakt mit SEE-beladenen Raji B-Zellen	- 42 -
2.6.3	Laser-Scanning-Mikroskopie (LSM)-Z-Stapel-Aufnahmen von Zellen	- 43 -
2.6.3.1	LSM-Z-Stapel-Aufnahmen von lebenden Lifeact-mEGFP-transfizierten HeLa-Zellen	- 43 -
2.6.3.2	LSM-Z-Stapel-Aufnahmen von fixierten ER-TagRFP-T-transfizierten Jurkat T-Zellen.....	- 43 -
2.6.3.3	Z-Stapel-Aufnahmen von fixierten hDrp1- und hFis1-transfizierten Jurkat T-Zellen.....	- 43 -
2.6.3.4	LSM-Z-Stapel-Aufnahmen von fixierten, permeabilisierten und anti-Orai1-Antikörper-inkubierten Jurkat-Raji-Kontakten	- 44 -
2.6.4	„Total Internal Reflection Fluorescence“ (TIRF)-Aufnahmen von T-Zellen.....	- 44 -
2.6.4.1	TIRF-Zeitrafferaufnahmen von migrierenden Lifeact-mEGFP-transfizierten Bead-stimulierten CD8 ⁺ T-Zellen	- 44 -
2.6.4.2	TIRF-Zeitrafferaufnahmen von Orai1-mEGFP- und STIM1-TagRFP-T-transfizierten Jurkat CD4 ⁺ T-Zellen auf anti-CD3-Antikörper-beschichteten Deckgläsern.....	- 44 -
2.6.5	Allgemeine Versuchsprozeduren	- 45 -
2.7	Bildbearbeitung.....	- 45 -
2.7.1	Bild-Korrektur.....	- 45 -
2.7.2	Dekonvolution	- 45 -
2.7.3	Bild-Darstellung.....	- 46 -
2.8	Auswertung.....	- 46 -
2.8.1	Bestimmung prozentualer Anteile	- 46 -
2.8.1.1	Ausbreitung von T-Zellen über Deckgläser	- 46 -
2.8.1.2	Organell-Lokalisationsanalysen in HeLa- und T-Zellen.....	- 46 -
2.8.1.3	Zentrosom-Dynamik in SEA-stimulierten CD8 ⁺ T-Zellen im Kontakt mit SEA-beladenen Raji B-Zellen und Auftreten apoptotischer „Blebs“ bei Raji	- 47 -
2.8.1.4	Apoptotische „Blebs“ bei Raji B-Zellen im Kontakt mit T-Zellen.....	- 47 -
2.8.1.5	Orai1-Lokalisationsanalyse	- 47 -
2.8.2	Volumenmessungen von Zellen und Organellen	- 47 -
2.8.2.1	Durchmesser-Bestimmung.....	- 47 -
2.8.2.2	Auflösungs-Bestimmung.....	- 47 -

2.8.2.3 Volumenmessungen	- 49 -
2.8.2.4 3D-Analyse der mitochondrialen Fission.....	- 49 -
2.8.3 Manuelles XY-Tracking	- 49 -
2.8.4 Semi-automatisches XYZ-Vesikel-Tracking.....	- 50 -
3 Ergebnisse	- 52 -
3.1 Zell- und Organell-Morphologie, -Dynamik und -Volumina von HeLa- und T-Zellen ..	- 52 -
3.1.1 Morphologie von HeLa- und T-Zellen.....	- 52 -
3.1.2 Zytoskelett- und Organell-Morphologie in HeLa- und T-Zellen	- 64 -
3.1.2.1 Morphologie und Dynamik des Aktin-Zytoskeletts in HeLa- und T-Zellen und Lamellopodien-Geschwindigkeiten	- 64 -
3.1.2.2 Zellkern-Morphologie und -Lokalisation in HeLa- und T-Zellen	- 68 -
3.1.2.3 Morphologie des Endoplasmatischen Retikulums (ER) in HeLa-Zellen und Jurkat T-Zellen und ER-Volumina von Jurkat T-Zellen	- 70 -
3.1.2.4 Morphologie des Tubulin-Zytoskeletts und Zentrosom-Lokalisation in HeLa- und T-Zellen und bei CD8 ⁺ T-Zell-Streckung und -Migration	- 72 -
3.1.2.5 Mitochondriale Morphologie und Lokalisation in HeLa- und T-Zellen und mitochondriale Fission in Jurkat T-Zellen.....	- 78 -
3.1.2.6 Verteilung endozytierter Vesikel in HeLa- und T-Zellen und Vesikel-Geschwindigkeiten in stimulierten CD8 ⁺ T-Zellen.....	- 84 -
3.1.3 Zell-, Zellkern- und Mitochondrien-Volumen von HeLa- und T-Zellen	- 88 -
3.1.4 Zusammenfassung von Kapitel 3.1.....	- 91 -
3.2 T-Zellform-, Zytoskelett- und Organell-Dynamik bei Ausbildung Immunologischer Synapsen (IS).....	- 92 -
3.2.1 IS-Ausbildung durch SEA-stimulierte CD8 ⁺ T-Zellen.....	- 92 -
3.2.1.1 T-Zell Formänderung und Zentrosom-Dynamik bei Abtötung von B-Zellen	- 93 -
3.2.1.2 T-Zellform- und Mitochondrien-Dynamik bei Abtötung von B-Zellen	- 96 -
3.2.1.3 T-Zellform-, Zytoskelett- und Organell-Dynamik bei Abtötung von B-Zellen	- 100 -
3.2.2 IS-Ausbildung durch Jurkat CD4 ⁺ T-Zellen	- 109 -
3.2.2.1 T-Zellform-, Aktin-, Organell- und Orai1-Dynamik	- 109 -
3.2.2.2 Orai1-STIM1 Ko-Expression und Akkumulations-Analyse von Orai1	- 116 -
3.2.3 Zusammenfassung von Kapitel 3.2.....	- 119 -
3.3 Zusammenstellung von Zell- und Organell-Geschwindigkeiten	- 120 -

4 Diskussion	- 122 -
4.1 Kritische Betrachtung der Ergebnisse	- 123 -
4.2 T-Zell-Polarisation auf Glas-Deckgläsern	- 128 -
4.3 T-Zell-Polarisation bei Ausbildung Immunologischer Synapsen.....	- 135 -
4.4 Modellierung der T-Zell-Polarisation	- 144 -
5 Literaturverzeichnis	- 147 -
5.1 Referenzen	- 147 -
5.2 Bildquellen	- 160 -
6 Anhang	- 162 -
6.1 Abkürzungsverzeichnis.....	- 162 -
6.2 Abbildungsverzeichnis	- 164 -
6.3 Tabellenverzeichnis.....	- 166 -
6.4 Filmverzeichnis.....	- 166 -
7 Publikationen	- 168 -
8 Danksagung.....	- 169 -
9 Lebenslauf.....	- 170 -

Zusammenfassung

Körperzellen unterscheiden sich trotz nahezu identischer Gene oft dramatisch in ihrer Morphologie und Funktion. Die unterschiedliche Ausdifferenzierung dieser Zellen kommt durch unterschiedliche Expressionsmuster spezifischer Proteine zustande. Aber für die Funktion vieler Proteine haben deren Lokalisation und die Morphologie der Zelle eine sehr große Relevanz. So exprimieren beispielsweise sowohl die adhärente Epithel-Zelllinie HeLa als auch T-Zellen die am sogenannten "Speicher-vermittelten Kalziumeinstrom" (SOCE) beteiligten Proteine Orai und STIM. Ebenfalls ist in den Mitochondrien beider Zelltypen der „mitochondriale Kalzium-Uniporter“ (MCU) vorhanden. Dennoch zeigen Experimente in HeLa-Zellen einen geringen Einfluss der Mitochondrien als Kalziumpuffer an der Plasmamembran beim Speicher-vermittelten Kalziumeinstrom, im starken Gegensatz zu Experimenten mit T-Zellen. Die Polarisation der T-Zelle, durch Zellformänderungen und Umverteilungen von Organellen und Proteinen, ist höchst dynamisch im Gegensatz zur Polarisation von HeLa-Zellen.

So kommt es beispielsweise bei der Ausbildung einer sogenannten Immunologischen Synapse (IS) zwischen T-Zellen und deren Zielzellen neben der Relokalisation des Zentrosoms zur Kontaktstelle zu starken Formveränderungen der T-Zellen und der Ausbildung von spezifischen Protein-Mustern an der IS. Im Fall von zytotoxischen T-Zellen (stimulierte CD8⁺) führt dies neben der Aktivierung der T-Zelle zur Abtötung der Zielzelle durch die Fusion zytotoxischer Vesikel mit der Membran der IS. Der Transport dieser Vesikel geschieht laut der etablierten Literatur zunächst als Minus-End-Transport über Mikrotubuli zum Zentrosom, welches die Vesikel anschließend durch den eigenen Kontakt mit der Plasmamembran zur IS transportiert. Dieses Modell steht allerdings im starken Widerspruch zu zahlreichen Veröffentlichungen, die vom Zentrosom unabhängige Mechanismen zur Akkumulation zytotoxischer Vesikel an der IS nachgewiesen haben.

Im ersten experimentellen Teil dieser Arbeit wird die adhärente humane Zelllinie HeLa in Form, Volumen und Organellverteilung mit drei verschiedenen T-Zell-Populationen verglichen. Neben der Charakterisierung von T-Zell-Formänderungen zum Deckglas und in das umgebende Kulturmedium werden Bestandteile des Zytoskeletts und die wichtigsten Zellorganellen in allen Zelltypen auf Morphologie und Lokalisation untersucht. Der Einfluss mitochondrialer Fission auf deren Lokalisation wird in Jurkat T-Zellen bestimmt. In stimulierten CD8⁺ T-Zellen wird die Ausstreckungsgeschwindigkeit in das umgebende Kulturmedium, die Migrationsgeschwindigkeit auf Deckgläsern und die Geschwindigkeit von zytotoxischen Vesikeln und endozytierten CD3-enthaltenden Vesikeln gemessen. Zudem wird das Zellvolumen sowie das individuelle Zellkern- und Mitochondrien-Volumen aller Zelltypen in der Interphase und während der Mitose miteinander verglichen.

Im zweiten experimentellen Teil dieser Arbeit werden Zellformänderungen und die Lokalisation von Zytoskelett, Organellen und Signalproteinen in primären stimulierten CD8⁺ und Jurkat CD4⁺ T-Zellen bei Superantigen-induziertem Kontakt mit Zellen der humanen B-Zelllinie Raji untersucht. Der genaue Ablauf der IS-Ausbildung, mit und ohne T-Zell-Formänderung in die Migrationsform, ist mit Abständen zur IS

Zusammenfassung

und auftretenden Geschwindigkeiten aufgeschlüsselt. Durch eine starke Bindung der Zellen an die verwendeten Deckgläser kommt es zu einer verzögerten und unvollständigen IS-Ausbildung, was die Separation ansonsten zeitgleich stattfindender Prozesse ermöglicht. Neben dem Zentrosom als primärem Zellpol, der innerhalb von Minuten nach Kontakt in die Nähe der IS bewegt wird, werden weitere Zellpole mit Organell- und Protein-Akkumulationen am Uropod und dem Zellkern identifiziert, die in späteren Phasen der IS-Ausbildung in die Nähe der IS gebracht werden. Ebenso werden T-Zellen mit mehr als einem B-Zell-Kontakt untersucht. Das Auftreten von apoptotischen Membranbläschen („Blebs“) in Raji B-Zellen bei Kontakt mit stimulierten CD8⁺ T-Zellen wird gemessen und zeitlich mit der Zentrosomposition abgeglichen. Bei einem Anteil von Erstkontakten und allen Zweitkontakten traten apoptotische Signale auf, bevor das Zentrosom die IS erreichte. Die bis zu zwanzigfach höher gemessene Geschwindigkeit einzelner Vesikel im Vergleich zum Zentrosom machen eine vom Zentrosom unabhängige Vesikel-Akkumulation an mehreren Zielzell-Kontakten innerhalb kürzester Zeit möglich.

Zusammengefasst zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit starke morphologische Unterschiede zwischen HeLa- und T-Zellen, die einige funktionale Vergleiche zwischen beiden Zelltypen in Frage stellen. Weiterhin unterstützen die erarbeiteten Ergebnisse eine Vielzahl anderer Studien, die eine vom Zentrosom unabhängige Akkumulation zytotoxischer Vesikel an der IS nachgewiesen haben, im Widerspruch zum etablierten Modell. Mithilfe aller in dieser Arbeit generierten Ergebnisse und im Abgleich mit der Literatur wird ein Modell für die gesamte T-Zell-Polarisation vorgeschlagen. Die in dieser Arbeit erstellten umfangreichen Volumen-, Bewegungs-, Abstands- und Geschwindigkeitsdaten tragen zur Verbesserung von Computer-Modellen der T-Zell-Polarisation bei, durch die Vorhersagen zum Verhalten der T-Zellen im menschlichen Körper getroffen werden können.

Summary

Polarization of T cells

Despite almost identical genes, somatic cells often differ dramatically in their morphology and function. The various differentiation of these cells is due to different expression patterns of specific proteins. However, for the function of many proteins, their localization and the morphology of the cell are highly relevant. For example, both the adherent epithelial cell line HeLa and T cells express the proteins Orai and STIM, which are essential for the so-called “store-operated-calcium-entry” (SOCE). Likewise, the mitochondrial-calcium-uniporter (MCU) is present in the mitochondria of both cell types. Nevertheless, experiments with HeLa cells show a negligible influence of mitochondria as calcium buffers at the plasma membrane during SOCE, in stark contrast to experiments with T cells. The polarization of T cells, by changes in cell shape and redistributions of organelles and proteins, is highly dynamic in contrast to the polarization of HeLa cells.

For example, during the formation of a so-called Immunological Synapse (IS) between T cells and their target cells, in addition to the movement of their centrosome to the contact area, T cells undergo strong shape changes and form specific protein patterns at the IS. In case of cytotoxic T cells (stimulated CD8⁺), additionally to the activation of the T cell, the formation of an IS leads to the killing of the target cell by the fusion of cytotoxic vesicles with the plasma membrane of the IS. According to established literature, the transport of these vesicles initially occurs as minus-end transport over microtubules to the centrosome, which subsequently delivers the vesicles to the IS by its own contact with the plasma membrane. However, this model is in strong disagreement to numerous publications that have demonstrated centrosome-independent mechanisms of cytotoxic vesicle accumulation at the IS.

The first experimental part of this study compares the adherent human cell line HeLa in terms of shape, volume, and organelle distribution with three different T cell populations. In addition to characterizing T cell shape changes onto the coverslip and into the surrounding culture medium, components of the cytoskeleton and the most important cell organelles are examined in all cell types for morphology and localization. The influence of mitochondrial fission on their localization is studied in Jurkat T cells. For stimulated CD8⁺ T cells, the extension speed into the surrounding culture medium, the migration speed on coverslips and the speed of cytotoxic vesicles and endocytosed CD3-containing vesicles is measured. Furthermore, the whole cell volume as well as the individual cell nucleus and mitochondria volumes are compared for all utilized cell types in the interphase and during mitosis.

The second experimental part of this study examines changes in the cell shape and the localization of cytoskeleton, organelles and signaling proteins in primary stimulated CD8⁺ and Jurkat CD4⁺ T cells during superantigen-induced contact with the human B cell line Raji. The exact process of IS formation, with and without T cell shape changes into the migratory form, is detailed with distances to the IS and occurring velocities. A strong binding of cells to the utilized glass substrate leads to a delayed and incomplete

Summary

IS formation, enabling the separation of otherwise concurrent processes. In addition to the centrosome as a cell pole, which is moved close to the IS within minutes after contact, other cell poles with organelle and protein accumulations are identified at the uropod and the nucleus, which are brought close to the IS during later stages of IS formation. Furthermore, T cells with more than one B cell contact are examined accordingly. The occurrence of apoptotic membrane “blebs” in Raji B cells upon contact with stimulated CD8⁺ T cells is measured and correlated with the position of the centrosome. Apoptotic signals occurred in a proportion of first contacts and all subsequent contacts before the centrosome reached the IS. The up to twentyfold higher measured velocities of individual vesicles compared to the centrosome make a centrosome-independent accumulation of vesicles at multiple target cell contact sites within a short time possible.

In short summary, the results of this study show strong morphological differences between HeLa and T cells that question some functional comparisons between the two cell types. Furthermore, the results support a variety of other studies which have demonstrated a centrosome-independent accumulation of cytotoxic vesicles at the IS, in disagreement with the established model. Based on all results obtained in this study and in accordance with current literature, a model for the entire T cell polarization is proposed. The extensive volume, movement, distance, and velocity data generated in this study can be used to improve computer models of the T cell polarization, which could be able to predict the behavior of T cells in the human body.

1 Einleitung

1.1 Zell-Polarisation

Alle Zellen des menschlichen Körpers stammen von der gleichen Ursprungszelle ab und beinhalten bis auf kleine Unterschiede in wenigen bestimmten Zelltypen die gleichen Gene, kodiert in Form von doppelsträngiger Desoxyribonukleinsäure (dDNS). Die extremen Unterschiede in Erscheinung und Funktion zwischen verschiedenen Zelltypen, wie z.B. Nerven- und Epithelzellen, erklären sich durch zeitliche und quantitative Unterschiede in der Expression unterschiedlicher regulatorischer und funktioneller Proteine. Einhergehend mit diesen Unterschieden in der Proteinexpression kommt es in der nächsten Ebene der Zellorganisation zu intrazellulären Unterschieden in der Verteilung der Proteine, was am anschaulichsten am Beispiel der Zytoskelett-Proteine zu erkennen ist (s. Kapitel 1.1.1). Bei Zellen, die fest in einen Verband eingebettet sind, werden neue Zellen von weniger spezialisierten Mutterzellen durch Zellteilung abgespalten. Diese Tochterzellen nehmen danach ihren Platz im Zellverband ein und richten sich ihren Aufgaben entsprechend aus. Die Zelle muss ihre Protein- und Organellverteilung stetig aufrechterhalten, um die räumlichen und zeitlichen Aspekte verschiedener Funktionen optimal auszuführen. Sie sind bis zur nächsten Teilung oder ihrem Zelltod in einem konstant-polarisierten Zustand (*Alberts 2015, Kapitel 16*) (Beispiele in **Abbildung 1**). Dabei wird die äußere Form der Zelle größtenteils vom Aktin-Zytoskelett bestimmt, während die intrazelluläre Verteilung von Organellen und Proteinen vorwiegend durch das Tubulin-Zytoskelett reguliert wird. Sehr deutlich wird das bei sekretorischen Zellen, wie z.B. Drüsenzellen (Beispiel in **Abb. 1 b**). Diese Zellen richten ihren sekretorischen Apparat zum Außenmedium aus, im Beispiel von **Abb. 1 b** in das Lumen der Bauchspeicheldrüse. In vielen Zelltypen

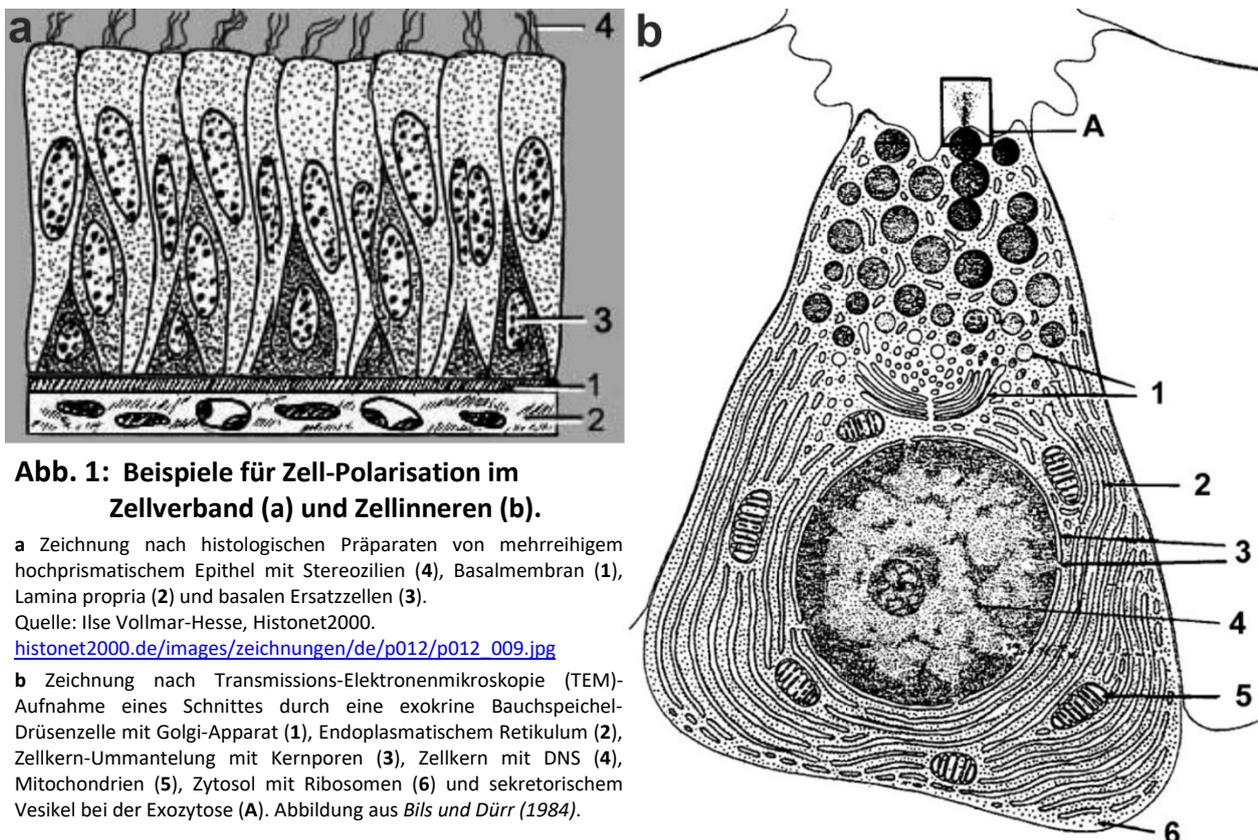


Abb. 1: Beispiele für Zell-Polarisation im Zellverband (a) und Zellinneren (b).

a Zeichnung nach histologischen Präparaten von mehrreihigem hochprismatischem Epithel mit Stereozilien (4), Basalmembran (1), Lamina propria (2) und basalen Ersatzzellen (3).

Quelle: Ilse Vollmar-Hesse, Histonet2000.

histonet2000.de/images/zeichnungen/de/p012/p012_009.jpg

b Zeichnung nach Transmissions-Elektronenmikroskopie (TEM)-Aufnahme eines Schnittes durch eine exokrine Bauchspeicheldrüse mit Golgi-Apparat (1), Endoplasmatischem Retikulum (2), Zellkern-Ummantelung mit Kernporen (3), Zellkern mit DNS (4), Mitochondrien (5), Zytosol mit Ribosomen (6) und sekretorischem Vesikel bei der Exozytose (A). Abbildung aus *Bils und Dürr (1984)*.

sind auch Membranproteine, wie Ionentransporter, in verschiedenen Regionen der Membran angehäuft, beispielsweise um unterschiedliche extrazelluläre Bedingungen zu erzeugen. So ermöglicht etwa die Polarisation von Ionentransportern in Epithelzellen der Henle'schen Schleifen der Niere bestimmte Ionen gezielt aus dem Filtrat zu entziehen und dem Körper wieder zur Verfügung zu stellen (Alberts 2015). Diese Zellform-, Organell- und Protein-Polarisationen erfordern allerdings zumeist die physiologischen Bedingungen innerhalb einer bestimmten Körperregion oder innerhalb des Zellverbandes (s. **Abb. 1**).

Fast alle Zellen, die in der Zellkultur durch die Ablösung von Oberflächen in Suspension gehalten werden, nehmen in der Regel eine runde Form an. Kommen diese Zellen, beispielsweise durch Absinken in der Suspension, mit einer Oberfläche in Kontakt, bestimmt der Zelltyp, wie sich die Zelle verhalten wird. Adhärente Zellen, wie die humane Epithel-Zelllinie HeLa, gehen einen intensiven Kontakt mit der Oberfläche ein und breiten sich flach auf dieser aus. Dies führt zu der typischen Zellform, die von den meisten fluoreszenzmikroskopischen Bildern kultivierter Zellen bekannt ist (Beispiel in **Abb. 2**). Diese Zellen haften konsequent an Kulturgefäßen wie Plastik-Kulturflaschen oder auf Glas-Deckgläsern. Suspensionszellen wie T-Zellen können durch Suspendieren der Kulturlösung vollkommen vom Untergrund abgelöst werden. Die Ablösung adhärenter Zelltypen wie HeLa benötigt eine Vorbehandlung der Zellen mit Proteasen wie Trypsin und starke mechanische Einwirkungen (Deman und Bruyneel 1977).

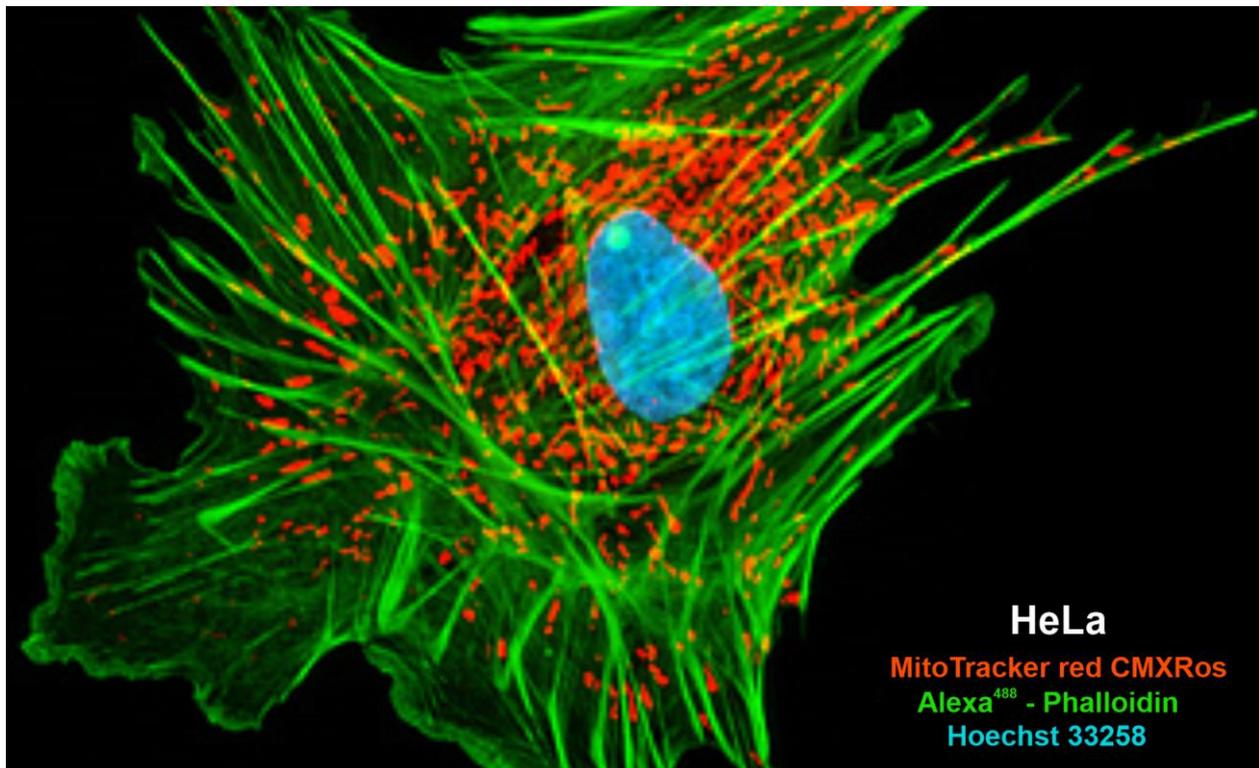


Abb. 2: Typische Fluoreszenzaufnahme fixierter adhärenter Zellen.

Mit 4 % PFA fixierte und permeabilisierte HeLa-Zelle, kultiviert auf einem Deckglas. Vor der Fixierung wurde die Zelle mit MitoTracker red (CMXRos) gefärbt (Mitochondrien, rot). Nach Fixierung und Permeabilisierung wurde die Zelle mit Alexa488-Phalloidin (Aktin, grün) und Hoechst 33258 (dDNS, blau) inkubiert. Neben kortikalem Aktin ist eine große Anzahl von Aktin-Stressfasern („stress fibers“) zu erkennen.

Quelle: Excelitas PCO GmbH, PCO ‚Pixelfly‘ Bilder-Galerie.
pco.de/fileadmin/processed/4/c/csm_pco_pixelfly_gal_ovaryEpithelialCells_p1020_607a073934.jpg

Apoptose. Wenn Zellen ihr Lebensende erreichen oder aufgrund von Entartung oder Virusinfektion vom Immunsystem entfernt werden müssen, kommt es entweder zur unkontrollierten „Nekrose“, bei der die Integrität der Plasmamembran verloren geht und das Zellinnere austritt, oder zum kontrollierten Zelltod, der „Apoptose“. Bei der Apoptose nehmen die Zellen zunächst wieder eine runde Zellform an, bevor es durch die Auflösung des Aktin-Zytoskeletts zur Ausbildung von Membran-„Bläschen“ („Blebs“) an der Plasmamembran kommt, die ihre Integrität behält (Taylor, Cullen und Martin 2008) (Beispiele in **Abb. 3**).

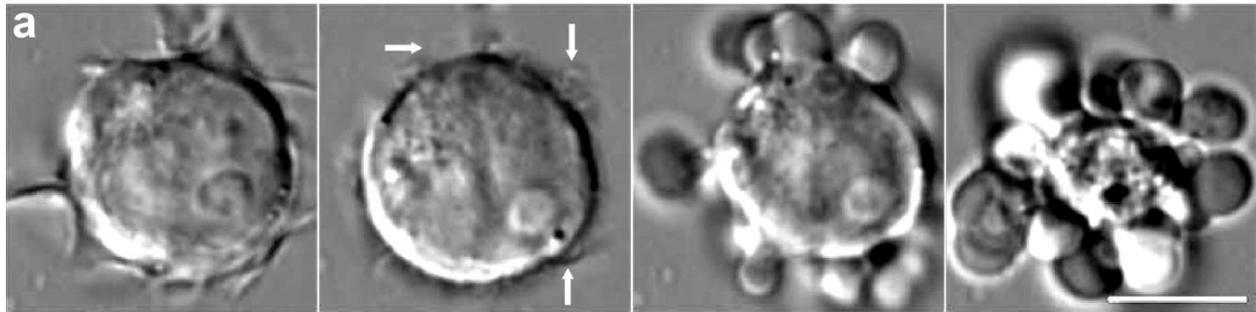


Abb. 3: Hellfeld- und SEM-Aufnahmen apoptotischer Zellen.

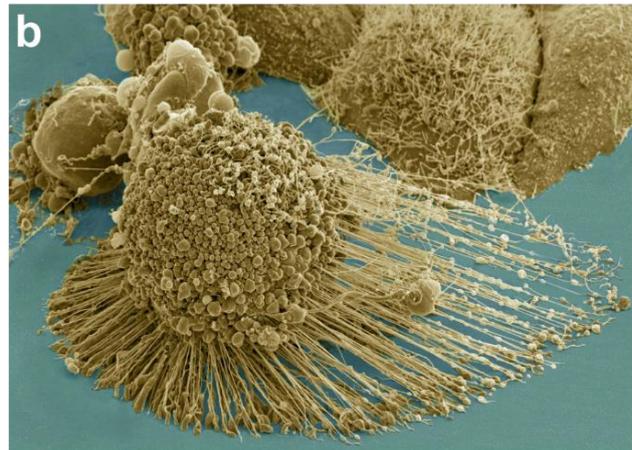
a Zeitrafferaufnahme einer mit anti-Fas-Antikörpern inkubierten Jurkat CD4⁺ T-Zelle mit Ausbildung apoptotischer Membranbläschen („Blebs“) (Beginn: weiße Pfeile). **Maßstabsbalken: 10 µm**

Abbildung aus Tixeira et al. (2020) (Abb. 1 b), editiert.

b Scanning-Elektronenmikroskopie (SEM)-Aufnahme einer apoptotischen HeLa-Zelle mit Membransträngen zur ehemaligen Kontaktfläche mit dem Deckglas und apoptotischen Membranbläschen („Blebs“). Im Hintergrund sind vitale, auf dem Deckglas ausgebreitete HeLa-Zellen mit Mikrovilli-Besatz und eine weitere apoptotische Zelle zu erkennen.

Quelle: National Institutes of Health (NIH) über Wikipedia.

de.wikipedia.org/wiki/HeLa-Zellen#/media/Datei:HeLa-IV.jpg



1.1.1 Zytoskelett-Polarisation

Aktin. Das Aktin-Zytoskelett besteht aus Filamenten fadenförmiger Polymere der Proteine α - und β -Aktin mit ungefähr 7 nm Durchmesser, die als kortikales Netzwerk unterhalb der Plasmamembran (PM) dieser Stabilität verleihen (s. **Abb. 4**). Somit bestimmt das kortikale Aktin-Netzwerk die Zellform und der Umbau dieses Netzwerks ist essenziell für Zellformänderungen. Darüber hinaus koordinieren Zellen mit den Aktin-Filamenten als Schienen den Transport von Organellen und Vesikeln nahe der PM mittels Myosin-Motorproteinen. Adhärenente Zellen bilden, wenn man sie z.B. auf Deckgläsern kultiviert, zusätzlich zum kortikalen Aktin-Netzwerk deutlich dickere Aktin-Filament/Myosin Bündel aus, die sogenannten „Stressfasern“, die sich über die gesamte Adhäsionsfläche strecken (s. **Abb. 2**, **Abb. 4 b**, grün). Diese dienen zur Verankerung und Kontraktilität der Zelle (Tojkander, Gateva und Lappalainen 2012). Zellmigration geschieht durch den beständigen Auf- und Abbau des kortikalen Aktin-Netzwerks, welches die Membran wellenartig nach vorne drückt. Dabei entstehen an der Front der Zelle, dem „Leading Edge“, Membranausstülpungen (s. **Abb. 4 b**), mit denen die Zelle am Untergrund adhärirt. Durch die Kontraktion des Aktin-Zytoskeletts am „Uropod“, dem hinteren Teil der Zelle, wird der Zellkern mit dem sich in der Nähe befindenden Zentrosom mitsamt Organellen und Vesikeln nach vorne gedrückt. Diese Vorgänge laufen meist sequenziell ab (Treat, Chen und Jacobson 2012; Alberts 2015, Kapitel 16; Ritter et al. 2015).

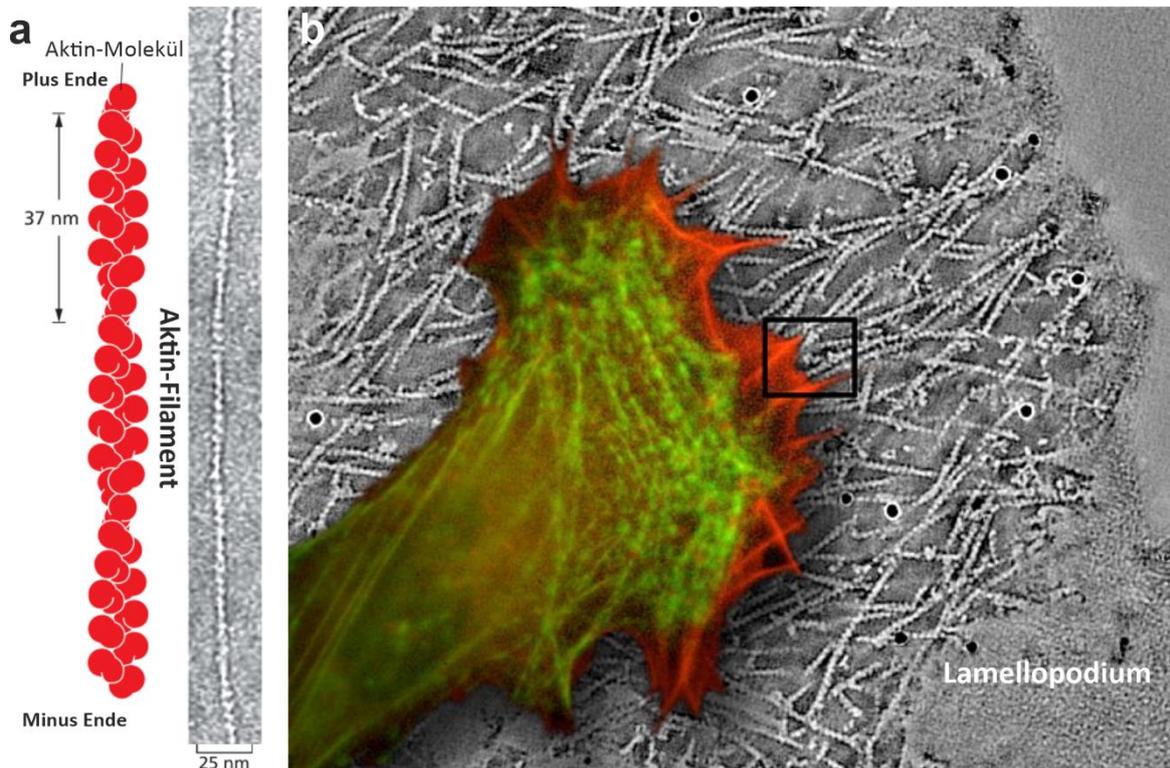


Abb. 4: Aktin-Filament Aufbau (a) und Aufnahmen von Aktin in Fibroblasten (b).

a Schematischer Aufbau und Transmissions-Elektronenmikroskopie (TEM)-Aufnahme eines Aktin-Filaments. Zwei Ketten (Protofilamente) aus alpha-beta Monomeren (Aktin-Molekülen) formen ein alle 37 nm gewundenes Aktin-Filament mit etwa 7 nm Durchmesser. Abbildung editiert aus *Alberts (2015) (Abb. 16-11 B & C)*, TEM-Aufnahme von Roger Craig.

b Epi-Fluoreszenz- (grün) und TIRF- (rot) Aufnahme von Fluoreszenzfarbstoff-markiertem Aktin in Fibroblasten mit Stressfasern, sowie Transmissions-Elektronenmikroskopie- (TEM)-Aufnahme eines Lamellopodiums (schwarzer Rahmen, grauer Hintergrund). Aufnahmen aus *Urban et al. (2010)*, editiert von IMBA. oeaw.ac.at/fileadmin/_processed_/5/c/csm_Aktin1_b2159dbae1.jpg

Tubulin. Mikrotubuli sind röhrenförmige Proteinkomplexe mit etwa 25 nm Außen- und 15 nm Innendurchmesser, die aus Dimeren der Proteine α - und β -Tubulin aufgebaut sind und ein Plus- sowie ein Minus-Ende besitzen (s. **Abb. 5 a**). Diese Röhren entstehen vom Minus-Ende ausgehend an Ringkomplexen aus γ -Tubulin (γ TuRCs), die zumeist im „Perizentriolaren Material“ (PCM) des Zentrosoms eingebettet sind (s. **Abb. 5 b**). Beim Zentrosom handelt es sich um einen sehr großen Proteinkomplex, in dessen Zentrum sich eine „Mutter“- und eine „Tochter“-Zentriole befinden. Vom Zentrosom ausgehend erstrecken sich Mikrotubuli durch das gesamte Zytosol bis zur Plasmamembran (Beispiel in **Abb. 5 c**). Die meisten intrazellulären Transportvorgänge, und damit die Verteilung fast aller Organellen und Vesikel, werden über die Mikrotubuli mithilfe von Motorproteinen durchgeführt (*Alberts 2015, Kapitel 16*). Viele Strukturen verbleiben dabei auch bewegungslos über „Linker“-Proteine mit den Mikrotubuli assoziiert. Bewegungen vom Zentrosom weg (Plus-End-Transport) werden von Kinesin-Motorproteinen geleistet. Nahe der Plasmamembran wird, von assoziierten Mikrotubuli ausgehend, der Transport von Myosin-Motorproteinen am Aktin-Netzwerk übernommen. Bewegungen zum Zentrosom hin (Minus-End-Transport) werden von Dynein-Motorproteinen durchgeführt. Bei am Zentrosom verankerten Mikrotubuli führt dieser Transport schlussendlich zum Zentrosom. Das Zentrosom vervielfältigt sich zu Beginn der Prophase der Zellteilung (Mitose), um sich während der Mitose auf die Tochterzellen aufzuteilen. Dies geschieht, indem für die Vervielfältigung benötigte Proteine in „Zentriolaren Satelliten“-Vesikeln mittels Dynein-Motorproteinen zum Zentrosom transportiert werden (*Azizadeh und Bornens 2007; Buhler und Stolz 2022*) (s. **Abb. 5 b**).

Einleitung

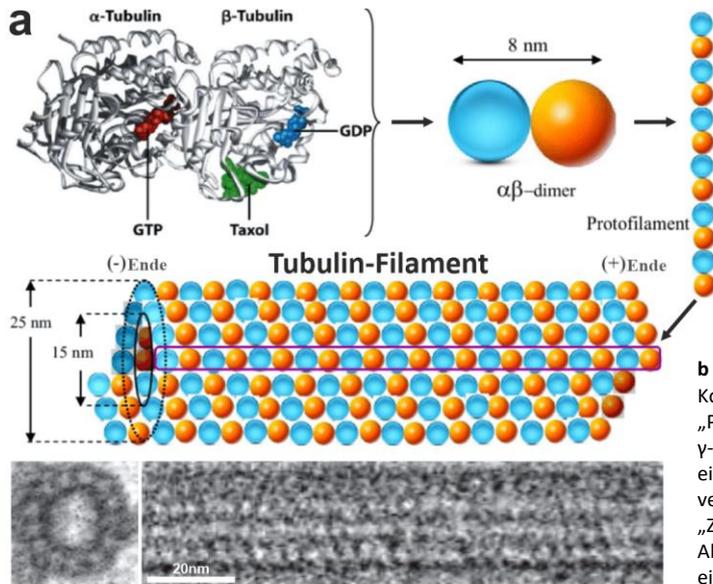
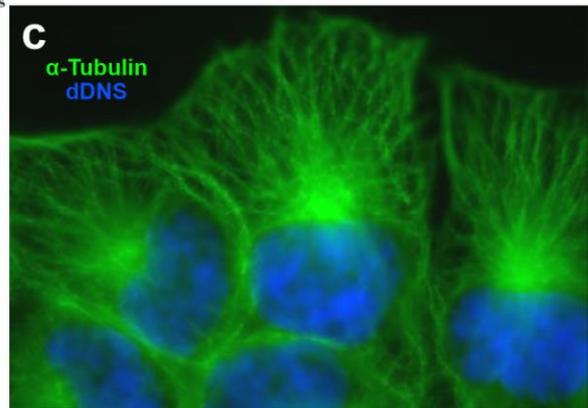
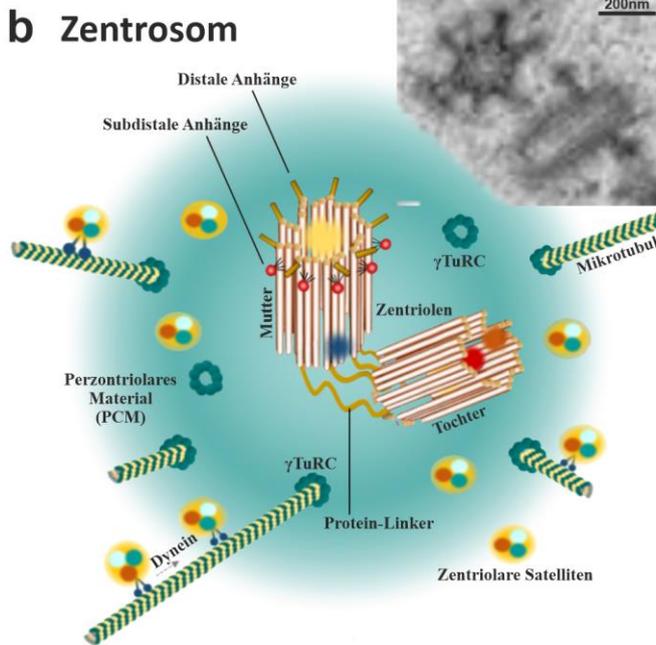


Abb. 5: Tubulin-Filament- und Zentrosom-Aufbau.

a Bändermodell-Darstellung von assoziierten α - und β -Tubulin-Proteinen mit GTP-, GDP- und Taxol-Bindestellen und schematischer Aufbau von Tubulin-Protofilamenten und Tubulin-Filamenten. Editiert aus *Saeidi, Lohrasebi und Mahnam (2014) (Abb. 1)*. Mit TEM-Aufnahmen von Tubulin-Filamenten (Front- und Seitenansicht) aus *Alberts (2015) (Abb. 16-42 D & E)*, von Richard Linck (Front) und Richard Wade (Seite). **Maßstabsbalken: 20 nm**

b Schematische Darstellung des Säugetier Zentrosom-Komplexes mit Mutter- und Tochter-Zentriolen. Im „Perizentriolaren Material“ (PCM, türkise Kugel) sind γ -Tubulin-Ringkomplexe (γ TuRC, dunkelgrüne Kugelringe) eingebettet, an denen Mikrotubuli polymerisieren und verankert sind. Dynein-Motorproteine transportieren „Zentriolare Satelliten“ zur Vervielfältigung des Zentrosoms. Abbildung aus *Buhler und Stolz (2022) (Abb. 1)*, editiert. Mit einer TEM-Aufnahme von Zentriolen in Front- und Seitenansicht aus *Stinchcombe et al. (2015) (Abb. 1 A)*. **Maßstabsbalken: 200 nm**



c Antikörper-Färbung gegen α -Tubulin (grün) in fixierten sekretorischen „U-2 OS“ Zellen, zusätzlich gefärbt mit DAPI (dDNS, blau). Aufnahme von *Abcam plc*. abcam.com/cms/displayImage.cfm?intImageID=3343

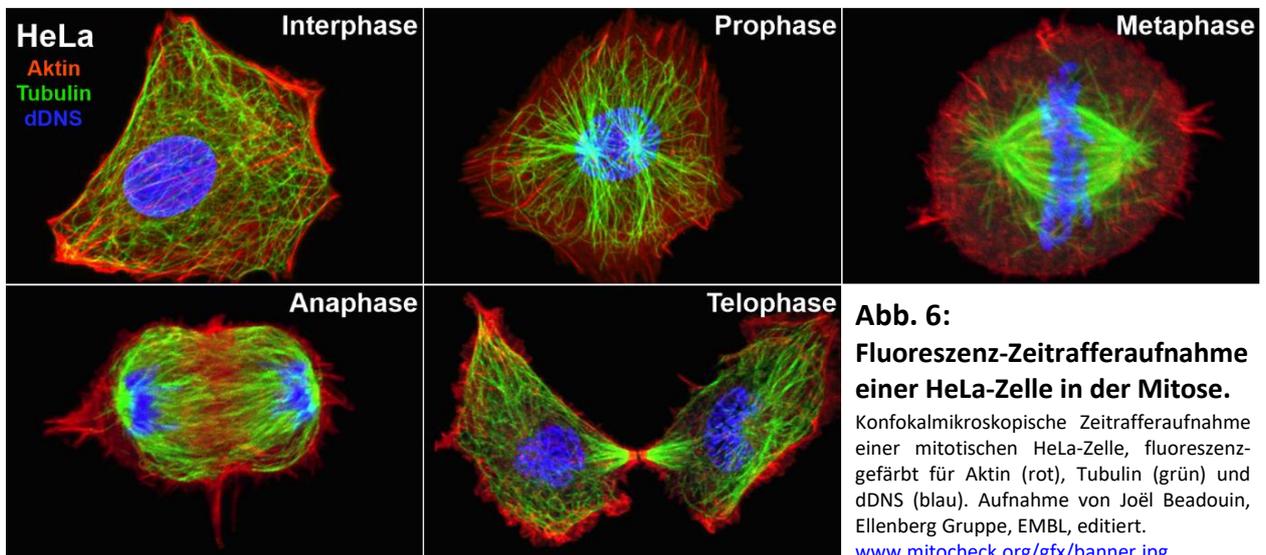


Abb. 6: Fluoreszenz-Zeitrafferaufnahme einer HeLa-Zelle in der Mitose.

Konfokalmikroskopische Zeitrafferaufnahme einer mitotischen HeLa-Zelle, fluoreszenzgefärbt für Aktin (rot), Tubulin (grün) und dDNS (blau). Aufnahme von *Joël Beadoun, Ellenberg Gruppe, EMBL*, editiert. www.mitocheck.org/gfx/banner.jpg

Mitose. Auch bei der Zellteilung (Mitose) spielt das Tubulin-Zytoskelett eine essenzielle Rolle. Dabei wandert das verdoppelte Zentrosom zu den Polen der Tochterzellen (Prophase). Anschließend wird je ein Chromatid jedes Chromosoms an einem Mikrotubuli verankert (Metaphase), die Chromatide durch Verkürzung der Mikrotubuli getrennt und jeweils zu einem der beiden Zentrosome gebracht (Anaphase). Zum Abschluss wird die Plasmamembran zwischen beiden Tochterzellen durch Kontraktion des kortikalen Aktin-Netzwerks abgeschnürt (Telophase) (Asbury 2017) (Beispielaufnahmen in **Abb. 6**).

1.1.2 Organell-Polarisation

Zellorganellen haben neben ihren Hauptaufgaben viele unterschiedliche Funktionen, bei denen Lokalisation und Morphologie eine wichtige Rolle spielen. Als ein Beispiel findet man in der Literatur bezüglich der Kalzium-Homöostase „nicht-erregbarer“ Zellen einige interessante Unterschiede bei der Relevanz von Zellorganellen, insbesondere von Endoplasmatischem Retikulum (ER) und Mitochondrien. (Giacomello *et al.* 2010; Quintana *et al.* 2011) Die an diesen Vorgängen beteiligten Proteine werden in allen untersuchten Zelltypen exprimiert, allerdings unterscheiden sich diese Zelltypen grundlegend in ihrer Morphologie und Organellverteilung. Die im Rahmen dieser Arbeit betrachteten Zellorganellen Zellkern, Endoplasmatisches Retikulum, Mitochondrien und Vesikel sind im Folgenden kurz charakterisiert. Das Zentrosom ist in Kapitel 1.1.1 im Abschnitt Tubulin beschrieben (s. **Abb. 5 b**).

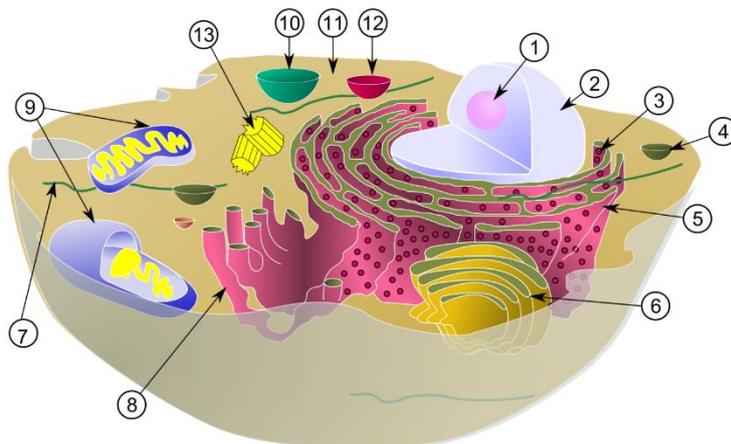


Abb. 7:
Schematische Darstellung einer tierischen Zelle mit Organellen.

Nucleolus (1), Zellkern (2), Zellkern-Ummantelung (3), Vesikel (4), raues Endoplasmatisches Retikulum mit Ribosomen (5), Golgi-Apparat (6), Mikrotubuli (7), glattes Endoplasmatisches Retikulum (8), Mitochondrien (9), Endosom (10), Zytosol (11), Lysosom (12), Zentrosom (13). Abbildung erstellt von ‚MesserWoland‘ und ‚Szczepan1990‘, veröffentlicht über Wikipedia ‚common license‘.

commons.wikimedia.org/wiki/File:Biological_cell.svg

Der **Zellkern** (**Abb. 7 (2)**) dient in erster Linie der Lagerung und dem Schutz der Desoxyribonukleinsäure (DNS). Größe und Form des Zellkerns hängen stark vom betrachteten Zelltyp, dessen Zellgröße, der Anzahl der Chromosomen und dem Kondensationszustand der DNS ab, welcher u.a. von der Stoffwechselaktivität der Zelle und dem Zellzyklus bestimmt wird (Alberts 2015). Die Anzahl der Chromosomen und ihre Zusammensetzung kann bei Zelllinien stark vom Ursprungsorganismus abweichen (Adey *et al.* 2013) und sogar innerhalb der Zelllinie variieren (Stepanenko und Dmitrenko 2015). Der Zellkern ist von einer Membran, der Zellkern-Ummantelung (3), umgeben, von der das Endoplasmatische Retikulum (ER) entspringt (5). Bei der Polarisation von Zellen, wie z.B. bei der Migration, spielt der Zellkern durch seinen hohen Platzanspruch eine wichtige Rolle, da er ein Hindernis für das Zytosol (11) und die übrigen Organellen darstellt und intrazelluläre Transportvorgänge beeinträchtigt. Eine Formänderung des Zellkerns ist für starke Zellverformungen, wie bei der Migration durch enge interzelluläre Räume, vonnöten. Die Verformbarkeit des Zellkerns wird dabei vom Tubulin-Zytoskelett beeinflusst (Zhao *et al.* 2021).

Das **Endoplasmatische Retikulum (ER)** (**Abb. 7 (5), (8)**) ist ein durch eine Doppelmembran vom Zytosol abgetrenntes Organell, das seinen Ursprung in der Zellkern-Ummantelung (**3**) hat. Falls Ribosomen mit der ER-Membran assoziiert sind, wird es als „raues“ ER bezeichnet (**5**), ohne Ribosomen als „glattes“ ER (**8**). Das ER erstreckt sich, anders als in der Schemazeichnung gezeigt, in Form kleiner, verzweigter Kanäle von etwa 60-120 nm Durchmesser und dünner „Sheets“ durch das gesamte Zytosol der lebenden Zelle (*Hein, Willig und Hell 2008*). Es bildet einen zum Zytosol abgegrenzten Raum, der sich in der Protein-Zusammensetzung, dem pH, dem Redoxzustand und der Kalziumkonzentration stark vom Zytosol unterscheidet. Die Kalziumkonzentration im ER-Lumen ist mit 1-2,5 mM 10-25x höher als im Zytosol, sodass anhaltend Kalzium über unspezifische Poren in der ER-Membran vom ER ins Zytosol strömt. Die Zelle muss das Kalzium aktiv mittels „SERCA-ATPasen“ zurück ins ER transportieren, ansonsten fällt die ER-Kalziumkonzentration ab (*Alberts 2015, Kapitel 15*). Dies geschieht artifiziell, wenn Zellen mit einem SERCA-Blocker, wie dem Pflanzengift „Thapsigargin“, behandelt werden. Durch das bei physiologischer Stimulation gebildete Signalmolekül „IP₃“ werden Kalziumkanäle (IP₃-Rezeptoren) in der ER-Membran geöffnet und Kalzium strömt vom ER ins Zytosol. Der ER-Kalziumsensor „STIM“ oligomerisiert, wenn die ER-Kalziumkonzentration unter einen gewissen Schwellenwert fällt. Diese STIM-„Cluster“ binden und öffnen anschließend sich in der Plasmamembran befindende „Orai“-Kalziumkanäle, was zu einem Einstrom von extrazellulärem Kalzium ins Zytosol führt (*Hoth und Penner 1993; Park et al. 2009*).

Mitochondrien (**Abb. 7 (9)**) sind Zellorganellen mit einer Doppelmembran, die aus der Endosymbiose eines Ur-Bakteriums mit einer der ersten Zellen mit echtem Zellkern (Eukaryoten) hervorgegangen sind. Ihre Hauptaufgabe besteht in der Bereitstellung von Adenosin-Triphosphat (ATP), einem Molekül mit hohem Energiegehalt, das zur Aufrechterhaltung des Zellstoffwechsels und zur Durchführung energieverbrauchender Funktionen notwendig ist. Zur Erzeugung dessen erschaffen sie wie Bakterien einen starken Unterschied in der Konzentration des Wasserstoff-Ions H⁺ an ihrer inneren Membran, einen „Protonengradient“, indem H⁺-Ionen in den Intermembranraum transportiert werden (*Alberts 2015, Kapitel 14*). Dies führt zu einer starken negativen Ladung der Mitochondrien-Matrix, mit der das aktive Mitochondrium eine starke Anziehungskraft auf alle positiv-geladenen Moleküle und Ionen ausübt. Diese strömen ins Mitochondrium hinein, sofern seine Doppelmembran für das Molekül bzw. Ion permeabel ist. Bei Kalzium ist dies für hohe Konzentrationen der Fall, die im Durchschnitt des gesamten Zytosols nicht auftreten. Allerdings können hohe lokale Kalziumkonzentrationen, sogenannte „Kalzium-Mikrodomänen“, vom „mitochondrialen Kalzium-Uniporter“ (MCU) in das Mitochondrium hineingelassen werden (*Raffaello, De Stefani und Rizzuto 2012*). Diese Kalzium-Mikrodomänen bilden sich beispielsweise bei der Öffnung von ER-Kalziumkanälen auf der Zytosolseite der ER-Membran. Befindet sich ein Mitochondrium in der Nähe einer Kalziueinstromquelle, kann es hohe lokale Kalziumkonzentrationen aufnehmen. Dadurch werden negative Rückkopplungseffekte vermieden, infolgedessen Kalziumkanäle länger offen bleiben und eine langanhaltend hohe zytosolische Kalziumkonzentration erreicht werden kann (*Quintana et al. 2006; Giacomello et al. 2010; Quintana et al. 2011*). Um diese Aufgabe zu erfüllen, müssen Mitochondrien in die Nähe des Kalziueinstroms transportiert werden. Dieser Transport geschieht mittels Motorproteinen intrazellulär über Mikrotubuli und an der Plasmamembran über das Aktin-Netzwerk.

Golgi-Apparat und Vesikel (Abb. 7 (6), (4)). Zum Transport und Austausch von Stoffen zwischen Organellen, der Sekretion von Stoffen in das Außenmedium oder der Aufnahme von Stoffen aus dem Außenmedium bilden Zellen Vesikel (4), die man anschaulich als kleine abgeschnürte Membranbläschen bezeichnen kann. Endozytische Vesikel werden von der Plasmamembran (PM) abgeschnürt und verschmelzen mit Endosomen (10). Zum Abbau intrazellulärer oder endozytierter Stoffe werden diese zunächst zu Endosomen und anschließend zu Lysosomen (12) transportiert, in denen diese Stoffe durch eine hohe Azidität und Enzymaktivität abgebaut werden (s. Abb. 8). Manche Proteine durchlaufen nach der Endozytose den endosomal „Recycling“-Pfad (Goldenring 2015). So wird beispielsweise der T-Zell-Marker CD3, der mit dem T-Zell-Rezeptor (TCR) assoziiert ist, beständig internalisiert und wieder zur PM gebracht (Geisler 2004). Zur Sekretion werden über das ER und den Golgi-Apparat (Abb. 7 (6), Abb. 8) herangereifte Proteine in von der Golgi-Membran abgeschnürten sekretorischen Vesikeln zur PM transportiert. Dort verschmelzen diese Vesikel mit der PM, wobei sekretorische Proteine an das extrazelluläre Medium abgegeben und membranständige Proteine in die PM integriert werden. In gewissen Zelltypen sind spezielle sekretorische Vesikel vorhanden, die „sekretorischen Lysosomen“ (Griffiths 1996). Natürliche Killer (NK) Zellen und stimulierte CD8⁺ T-Zellen weisen diese spezialisierten Lysosomen auf, die in diesen Zellen die zytotoxischen Proteine Perforin, Granzym und Fas-Ligand beinhalten (Peters et al. 1991; Blott et al. 2001) und als „Lytsche Granula“ (LG) bezeichnet werden. Alle Vesikel werden neben einer möglichen intrinsischen („brownschen“) Bewegung aktiv von der Zelle mithilfe von Motorproteinen über Mikrotubuli oder das Aktin-Netzwerk bewegt (Alberts 2015, Kapitel 13).

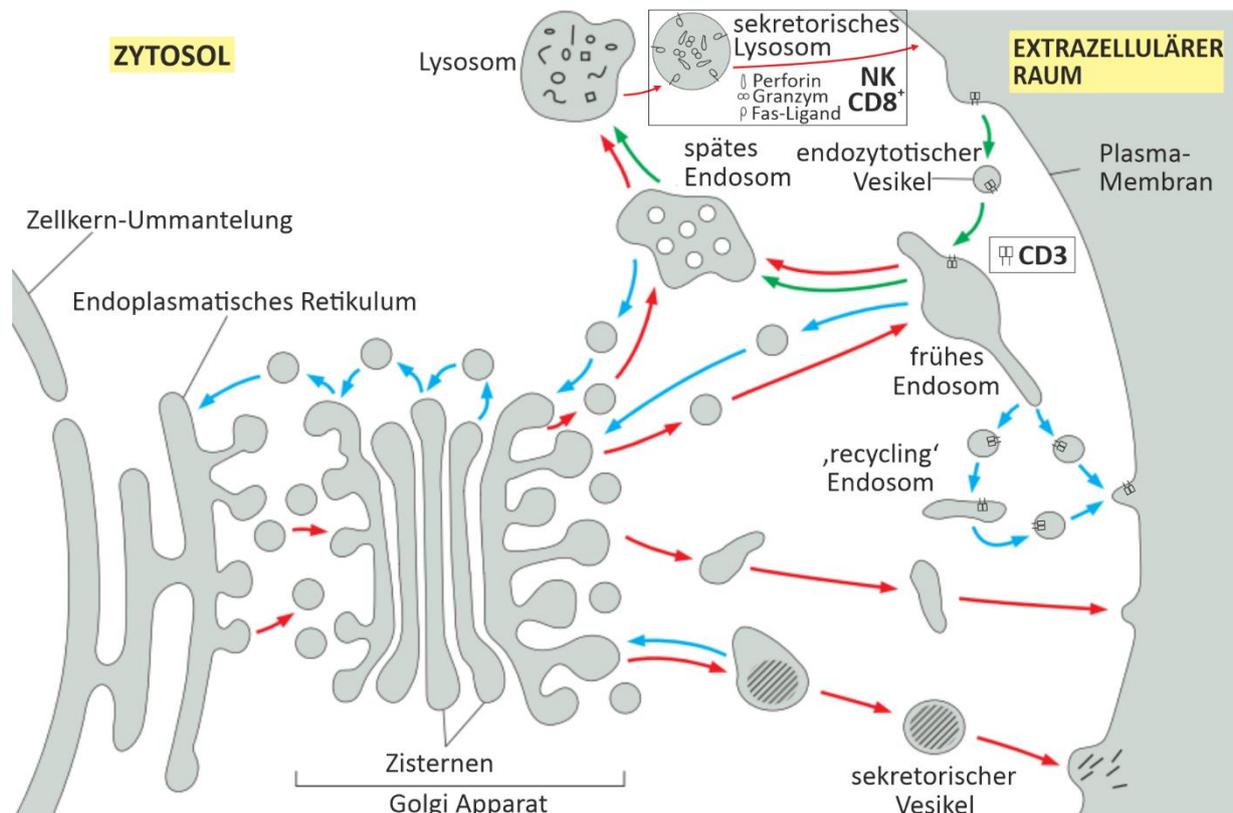


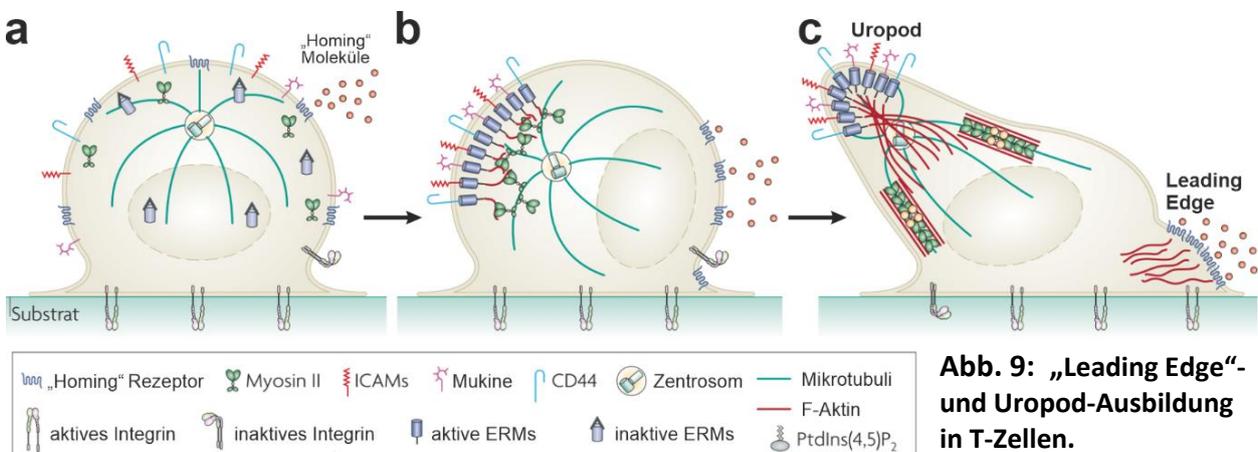
Abb. 8: Transportwege endozytischer und sekretorischer Vesikel.

Schematische Darstellung der Transportwege endozytischer und sekretorischer Vesikel mit Zellkern-Ummantelung, Endoplasmatischem Retikulum, Golgi-Apparat mit Zisternen, frühem und spätem Endosom und Lysosom. Das „Recycling“ des T-Zell-Markers CD3 über das „Recycling“-Endosom und spezielle sekretorische Lysosomen von Natürlichen Killerzellen (NK) und CD8⁺ T-Zellen mit Perforin, Granzymen und membranständigem Fas-Liganden sind in die übersetzte Original-Abbildung aus Alberts (2015) (Abb. 13-3 B) eingefügt.

1.2 T-Zell-Polarisation

T-Zell Form und Zytoskelett. T-Zellen passen als mobile Zellen ihren Polarisationszustand ständig neuen Gegebenheiten an. Im Blutstrom nehmen sie die einfachste Zellform an: eine gleichmäßige Kugel. Nur der Zellkern führt zu einer schwachen Grundausrichtung, mit dem Zellkern auf der einen und dem Großteil der Organellen auf der anderen Seite. Die meisten Membran- und Zytosolproteine sind überwiegend homogen über die Zelle verteilt (*Parham 2021*). An ihrem Bestimmungsort angekommen stoppen die Zellen ihren passiven Transport durch das Blut. Das Endothelgewebe der Blutgefäße stimuliert die T-Zellen durch die Präsentation von „Homing“- und Adhäsions-Molekülen wie „VCAM-1“ zur Einwanderung in das Gewebe (*Fu, Ward und Marelli-Berg 2016*) (s. **Abb. 9**). Dabei wird durch den Umbau des Zytoskeletts zunächst der Zellkern durch enge interzelluläre Räume gedrückt, bevor das Zentrosom im „Uropod“ nachfolgt (*Barreiro et al. 2007*). Unstimulierte („naive“) T-Zellen zirkulieren permanent zwischen dem Blut und sekundärem lymphatischem Gewebe. Falls dort ein Antigen präsentiert wird, das zufällig zu dem T-Zell-Rezeptor (TCR) der T-Zelle passt, geht die T-Zelle eine enge Verbindung mit der Antigen-präsentierenden Zelle (APC) ein. Es bildet sich eine „Immunologische Synapse“ (IS). Die Stabilität der dabei gebildeten IS entscheidet über die weitere Differenzierung und Vermehrung dieser T-Zelle (*Parham 2021*).

Während der Migration der T-Zelle durch das Gewebe werden zunächst „vorne“, am „Leading Edge“ der Zelle, durch Aktin-Polymerisation Lamellopodien ausgebildet (s. **Abb. 4**), in die der Zellkern durch Aktin-Myosin-Kontraktion am Uropod nachgeschoben wird (*Sanchez-Madrid und Serrador 2009*) (s. **Abb. 9**). Das Zentrosom folgt mit den restlichen Organellen. Bildet sich eine IS (s. **Abb. 10 a**), wird der Zellkern auf die von der Zielzelle abgewandte Seite gebracht, der Uropod wird zurückgebildet und das Zentrosom (s. **Abb. 10 a** blau) relokalisiert mit einigen Organellen zur Kontaktstelle (*Kupfer, Dennert und Singer 1985; Ritter et al. 2015*). Die Bewegung des Zentrosoms zur IS geschieht durch die Aktivität Plasmamembran-gebundener Dynein-Motorproteine und die anschließende Verkürzung der Mikrotubuli (*Yi et al. 2013*). An „Haupt-Histokompatibilitäts-Komplex“ (MHC)-Molekülen der APC bindende TCR-„Mikrocluster“ akkumulieren im Zentrum der Kontaktstelle. Adhäsionsmoleküle wie „LFA-1“, das



an APC-ständiges „ICAM-1“ bindet, schmiegen die T-Zelle durch Ausbildung eines ringförmigen Aktin-Komplexes an die APC an (*Parham 2021*). Dieser „Aktin-Ring“ breitet sich zuerst über die Oberfläche der APC aus und kontrahiert bei Stabilisierung der IS (*Babich und Burkhardt 2013*) (s. **Abb. 10 a** grün).

Kalziumsignale in T-Zellen. Für die meisten spezifisch in T-Zellen stattfindenden metabolischen Prozesse benötigt die T-Zelle das Signal-Ion Kalzium (Ca^{2+}). Während in unstimulierten Zellen die zytosolische Kalziumkonzentration sehr niedrig gehalten wird (etwa 50 nM), führt die Ausbildung einer stabilen „Immunologischen Synapse“ (IS) zu einem starken und langanhaltenden Anstieg der zytosolischen Kalziumkonzentration (etwa 90-400 nM) (*Quintana et al. 2007; Schwarz et al. 2007*). Dies ist für T-Zellen eine essenzielle Voraussetzung, um sich zu differenzieren, Botenstoffe zu bilden oder sich zu teilen. Wenn eine „naive“ T-Zelle beim Kontakt mit einer Antigen-präsentierenden Zelle (APC) kein langanhaltendes zytosolisches Kalziumsignal aufbaut, überwiegen Signalprozesse im Inneren der Zelle, durch die der Kontakt ohne die Bildung einer langanhaltenden IS aufgelöst wird. Diese Zellen suchen daraufhin entweder im Lymphknoten weiter nach einem besser-passenden Antigen oder sie werden inaktiv oder apoptotisch (*Parham 2021*). In T-Zellen geschieht der Großteil des Kalziumeinstroms bei ungerichteter Stimulation des TCR oder Ausbildung einer IS durch den in Kapitel 1.1.2 (ER) eingeführten „SOCE“, bei dem durch eine Entleerung des ER-Kalziumspeichers Orai-Kanäle in der Plasmamembran geöffnet werden. Durch die Öffnung der Orai-Kanäle entstehen hohe lokale Kalziumkonzentrationen, die durch „langsame Rückkopplungs-Inhibition“ zur Schließung der Kanäle führen, sofern das Kalzium nicht von der Einstromquelle entfernt wird (*Parekh 1998*). Die Funktion des Transkriptionsfaktors „NFAT1“, der für die T-Zell-Differenzierung notwendig ist, ist jedoch zugleich auf das Vorhandensein von Kalzium-Mikro- oder Nanodomänen an der Plasmamembran angewiesen (*Kar, Nelson und Parekh 2011; Kar et al. 2021*).

Polarisation von stimulierten T-Lymphozyten. Wird eine „naive“ T-Zelle ausreichend stimuliert, kommt es zur klonalen Expansion dieser Zelle zu „Effektor“- und „Gedächtnis“-Zellen. Effektorzellen bekämpfen die akute Gefahr durch das aktivierende Antigen, während Gedächtniszellen zum Aufbau einer langanhaltenden Immunität gebraucht werden (*Parham 2021*). Effektorzellen sind stark ausdifferenzierte T-Zellen, die im Vergleich zu ihrer naiven Ursprungszelle deutlich größer sind und eine erhöhte Organellmasse sowie ein größeres Zytosol-Volumen aufweisen. Ihre Proteinexpression ist stark erhöht, sodass je nach T-Zell-Subtyp verschiedene Effektormoleküle in großer Anzahl vorliegen. Bei CD4-positiven(+) T-Zellen enthalten die Effektorzellen Vesikel mit Signalmolekülen zur Stimulation und Modulation von Zielzellen. CD8⁺ Effektor-T-Zellen enthalten zytotoxische Proteine innerhalb spezieller Vesikel, den „Lytischen Granula“ (LG) (s. Kapitel 1.1.2, Vesikel), mithilfe derer Körperzellen abgetötet werden können, die das stimulierende Antigen auf ihrer Oberfläche mittels MHC-I-Komplexen präsentieren (*Parham 2021*). Dazu wird erneut eine Immunologische Synapse zwischen Effektorzelle und Zielzelle ausgebildet. Diese IS ähnelt stark der IS, die von der naiven T-Zelle mit ihrer APC gebildet wird. Allerdings wird die stimulierende Zielzelle zusätzlich von der CD8⁺ Effektorzelle während der Ausbildung der IS abgetötet. Die Daten zur Dauer dieses Tötungsprozesses variieren stark, ebenso wie die beobachtete Dauer der Zell-Zell-Verbindung. In manchen Studien lösen die Effektorzellen ihre Verbindungen nach

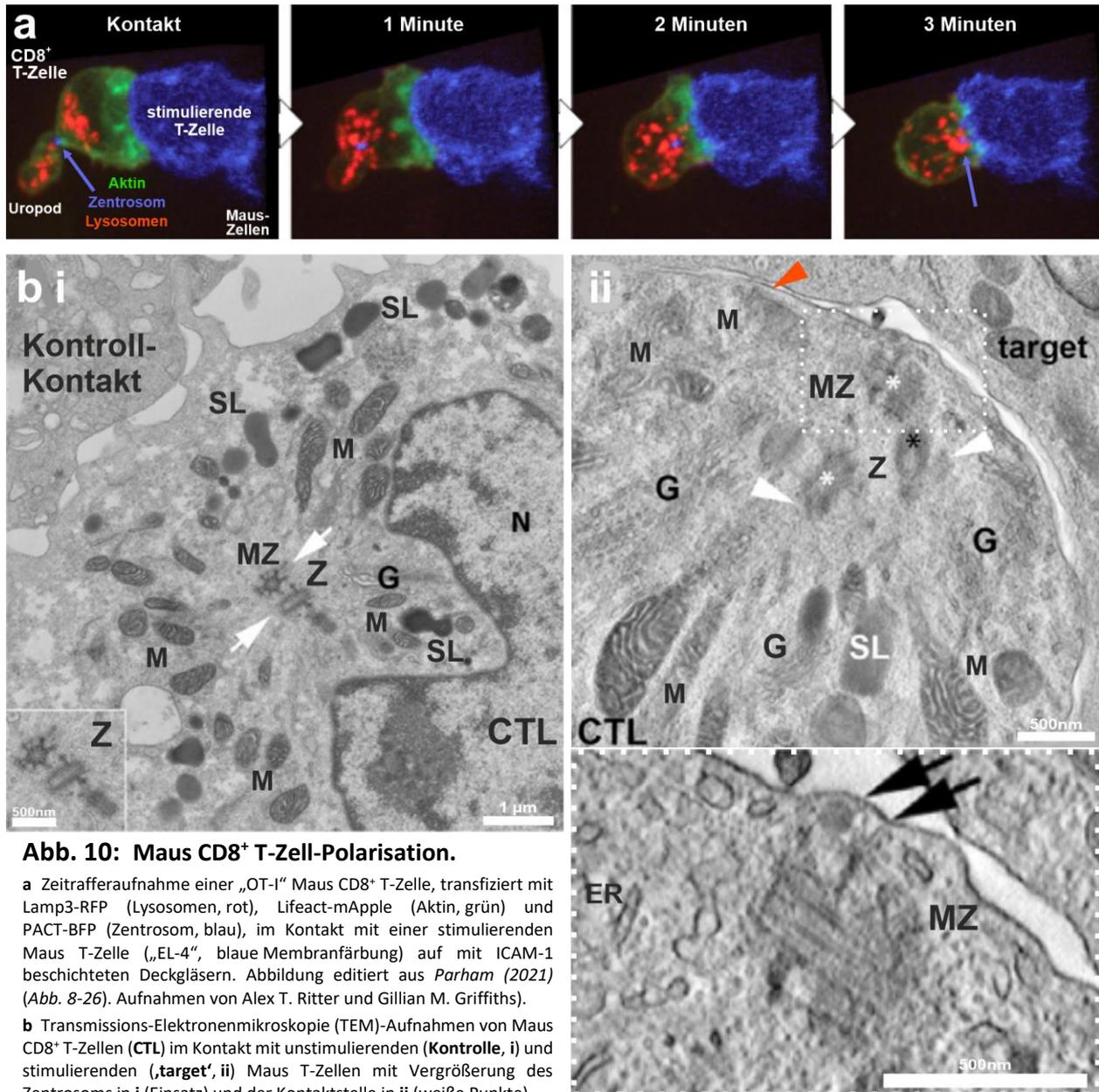


Abb. 10: Maus CD8⁺ T-Zell-Polarisation.

a Zeitrasteraufnahme einer „OT-1“ Maus CD8⁺ T-Zelle, transfiziert mit Lamp3-RFP (Lysosomen, rot), Lifeact-mApple (Aktin, grün) und PACT-BFP (Zentrosom, blau), im Kontakt mit einer stimulierenden Maus T-Zelle („EL-4“, blaue Membranfärbung) auf mit ICAM-1 beschichteten Deckgläsern. Abbildung editiert aus Parham (2021) (Abb. 8-26). Aufnahmen von Alex T. Ritter und Gillian M. Griffiths).

b Transmissions-Elektronenmikroskopie (TEM)-Aufnahmen von Maus CD8⁺ T-Zellen (CTL) im Kontakt mit unstimulierenden (Kontrolle, i) und stimulierenden (target, ii) Maus T-Zellen mit Vergrößerung des Zentrosoms in i (Einsatz) und der Kontaktstelle in ii (weiße Punkte). Mutter-Zentriolen (MZ) und Zentriolen (Z) sind mit weißen Pfeilen und in ii mit Sternen gekennzeichnet. Zellkern (Nukleus N), Golgi-Apparat (G), Mitochondrien (M), sekretorische Lysosomen (SL) und Endoplasmatisches Retikulum (ER) sind zu erkennen. 100-200 nm Schnitte (i) und multiple-Ebenen-Projektion (ii) bzw. gepaarte-Ebenen-Projektion (ii Vergrößerung). Schwarze Pfeile in der Vergrößerung zeigen Kontaktpunkte zwischen der Plasmamembran und Mutter-Zentriol-Anhängen (s. Abb. 5 b). Ein Mitochondrium im Kontakt mit der Plasmamembran ist in ii durch einen roten Pfeil gekennzeichnet. Abbildung aus Stinchcombe et al. (2015) (Abb. 1 A, C), editiert.

kurzem Kontakt auf, bevor die Apoptose in den Zielzellen detektiert wird und die Effektorzelle wandernd nach einer weiteren Zielzelle sucht (Ritter et al. 2015). In den meisten Untersuchungen mit lebenden Zellen dauert der Zell-Zell-Kontakt mit bis zu mehreren Stunden hingegen deutlich länger als die Detektion der Zielzell-Apoptose innerhalb weniger Minuten (Faroudi et al. 2003; Wiedemann et al. 2006; Bertrand et al. 2013). Da das reine Abtöten der Zielzelle schon durch die Fusion weniger Vesikel an der Kontaktstelle erfolgreich sein kann, muss hierfür nicht zwingend eine „stabile“ IS ausgebildet werden. Sobald das stimulierende Signal der Zielzelle eine gewisse Schwelle erreicht und der Adhäsionskontakt zwischen beiden Zellen ausreicht, können bei einer „unvollständigen“ IS lokale Kalziumeinströme die Exozytose von LG und damit die Apoptose der Zielzelle auslösen, woraufhin die Effektorzelle die Verbindung schnell

lösen und nach weiteren Zellzellen suchen kann (*Kummerow et al. 2009*). Effektorzellen mit verringertem Kalziumeinstrom zeigen dadurch eine erhöhte Abtötungsrate von Zielzellen (*Zhou et al. 2018*). Bei Ausbildung einer stabilen, „ausgereiften“ IS kommt es hingegen zu einer langanhaltend hohen zytosolischen Kalziumkonzentration, die es der Effektorzelle ermöglicht, eine einzige stark aktivierende Zielzelle zunächst sicher abzutöten und anschließend weitere Aufgaben zu erfüllen, wie die Herstellung und Ausschüttung von Signalmolekülen und die Produktion von Tochterzellen durch Zellteilung. Die Zellpolarisierung während einer „stabilen IS“ ermöglicht darüber hinaus die asymmetrische Exozytose von Signalmolekülen, entweder zur Zielzelle oder an die Umgebung, und die asymmetrische Zellteilung, mit unterschiedlicher Organell- und Molekülverteilung in den beiden Tochterzellen (*Capece et al. 2017*).

Mitochondrien-Polarisation in T-Zellen. Auch in T-Zellen sind Mitochondrien essenziell zur Bereitstellung von Energie in Form von ATP. Zusätzlich spielen sie in T-Zellen eine tragende Rolle bei der Entfernung von Kalzium-Mikrodomänen am ER und der Plasmamembran (*Hoth, Fanger und Lewis 1997; Quintana et al. 2011*). Mitochondrien zeigen in T-Zellen vernetzte Strukturen, die in Anlehnung an das ER als „mitochondriales Retikulum“ bezeichnet werden (*Alberts 2015*). Mit Mikrotubuli assoziierte Mitochondrien sind in T-Zellen in großer Anzahl in der Nähe des Zentrosoms anzufinden (s. **Abb. 10 b**). Bei unspezifischer Stimulation von T-Zellen nähern sich Mitochondrien der Plasmamembran an und werden mit dem Aktin-Netzwerk verbunden (*Quintana et al. 2006*). Bei der Bildung einer Immunologischen Synapse wird eine große Anzahl von Mitochondrien mit dem Mikrotubuli-Netzwerk zur Kontaktstelle transportiert. Durch den mitochondrialen Fissions-Faktor „Drp1“ werden Teile des mitochondrialen Retikulums abgespalten und nähern sich über das Aktin-Netzwerk weniger als 200 nm an die Plasmamembran an (*Baixauli et al. 2011*) (s. **Abb. 10 b ii** roter Pfeil). Dort versorgen sie zum einen Myosin-Motorproteine mit ATP, die TCR-Mikrocluster über Aktin-Filamente zum Zentrum der IS transportieren, und verringern so die TCR-Signalstärke (*Baixauli et al. 2011*). Zum anderen entfernen sie Kalzium-Mikrodomänen an der IS zur langanhaltenden Öffnung von Orai-Kanälen (*Quintana et al. 2011*).

Vesikel-Polarisation in T-Zellen. Alle T-Zellen endozytieren kontinuierlich Vesikel, die den TCR/CD3-Komplex enthalten, und führen diese über „Recycling“-Endosome wieder zurück zur Plasmamembran (*Geisler 2004*) (s. **Abb. 8**). Nach Stimulation der T-Zelle erhöht sich die Internalisierungsrate, wodurch die TCR-Signalstärke potenziell sinkt. Bei der Ausbildung einer Immunologischen Synapse (IS) werden membranständige TCR-„Mikrocluster“ von Myosin-Motorproteinen über Aktin-Filamente zum Zentrum der IS („cSMAC“) gebracht und dort endozytiert (*Hashimoto-Tane und Saito 2016*).

CD8⁺ Effektor T-Zellen enthalten große Mengen der in Kapitel 1.1.2 (Vesikel) eingeführten „Lytischen Granula“ (LG), deren Fusion mit der Membran der IS zum Zelltod der Zielzelle führt. Dies geschieht durch Perforin, Granzyme und/oder den membranständigen Fas-Liganden, die in den abgeschlossenen Raum zwischen den Zellen freigesetzt werden, welcher durch den Adhäsionsring der T-Zelle gebildet wird. Dieser Mechanismus ermöglicht eine gezielte Abtötung stimulierender Zielzellen, wie z.B. Virus-infizierter Zellen oder Krebszellen, ohne gesunde Nachbarzellen in Mitleidenschaft zu ziehen. Beim Kontakt mit einer einzelnen Zielzelle reichern sich LG in der Nähe der IS an, indem die LG

zunächst am Zentrosom akkumulieren und mit diesem und allen am Mikrotubuli-Apparat befestigten Organellen und Vesikeln zur IS transportiert werden (s. **Abb. 10**). Die Akkumulation der LG an der Plasmamembran der IS geschieht laut dem etablierten Modell durch reinen Dynein-Transport zum Zentrosom, welches die LG anschließend durch den direkten Kontakt mit der Plasmamembran dorthin transportiert (*Stinchcombe et al. 2006; Stinchcombe et al. 2015*). Dieses Modell geht von einem „seriellen“ Abtötungsverhalten aus, bei dem zunächst die IS zwischen T-Zelle und apoptotischer Zielzelle gelöst werden muss, bevor eine weitere Zielzelle abgetötet werden kann, da bei diesem Mechanismus das Zentrosom die Membran der IS berühren muss. Die „serielle“ Abtötung von Zielzellen ist als einziges Verhalten in Lehrbüchern etabliert (*Parham 2021*), obwohl mehrere Studien von Mehrfachkontakten mit der Abtötung aller gleichzeitig kontaktierten Zielzellen ohne eine Relokalisation des Zentrosoms berichteten (*Wiedemann et al. 2006; Bertrand et al. 2013*). Ebenso wurden bereits im Jahr 1986 Abtötungen vor der Bewegung der LG-Akkumulation zur IS dokumentiert (*Yannelli et al. 1986*). Aktuelle Studien mit Hochgeschwindigkeitsaufnahmen zeigten durch die Exozytose von LG ausgelöste Kalziumeinströme in Zielzellen vor der Ankunft des T-Zell-Zentrosoms an der IS (*Bertrand et al. 2013; Filali et al. 2022*).

Zusammenfassung. Zur korrekten Funktion von Immunzellen ist die zelluläre Polarisation von Proteinen und Organellen essenziell. Bei Zellformänderungen polarisieren T-Zellen ihr Zytoskelett und ihre Organellen in spezifischen Mustern. Bei der Ausbildung einer Immunologischen Synapse (IS) teilen sich Rezeptor-Moleküle in zentrale „Cluster“ („cSMAC“) und Adhäsionsmoleküle an ringförmigen Aktin-Akkumulationen an den Rändern der Kontaktfläche („pSMAC“ und „dSMAC“) auf. Das Zentrosom wird in allen T-Zelltypen zur IS transportiert, bei zytotoxischen T-Zellen (CD8⁺) führt dies zur Akkumulation von zytotoxischen Vesikeln (LG) in der Nähe der IS. Laut dem etablierten Modell hat dies ein „serielles“ Abtötungsverhalten zur Folge, bei dem durch direkten Kontakt des Zentrosoms mit der Plasmamembran und reinen Dynein-Transport die LG zur Membran befördert werden (*Stinchcombe et al. 2006; Ritter et al. 2015; Stinchcombe et al. 2015; Frazer et al. 2021*). Einige Studien haben eine „parallele“ Abtötung mehrerer Zielzellen belegt, ohne Relokalisation des Zentrosoms zur IS (*Wiedemann et al. 2006; Bertrand et al. 2013; Filali et al. 2022*). Zudem wurde von einer Kinesin-Abhängigkeit beim Vesikel-Transport zur IS berichtet (*Kurowska et al. 2012*) und Abtötungen durch T-Zellen ohne Zentrosom gezeigt (*Tamzalit et al. 2020*). Diese Beobachtungen widersprechen dem etablierten Modell des Abtötungsprozesses.

Bei Kontakten zwischen T-Zellen und Zielzellen werden neben Vesikeln auch weitere Organellen und Proteine in der Nähe der IS angehäuft. Mitochondrien akkumulieren an der IS und nähern sich der gesamten Plasmamembran der T-Zelle an (*Quintana et al. 2007*). Plasmamembran-nahe Mitochondrien erlauben durch ihre Kalzium-„Puffer“-Fähigkeit die langanhaltende Öffnung von Orai-Kanälen und damit einen langanhaltenden Kalziumeinstrom in das Zytosol (*Quintana et al. 2011*), führen an der IS allerdings zu einer verstärkten Endozytose des T-Zell-Rezeptors und damit zu einer Verringerung der T-Zell-Stimulation (*Baixauli et al. 2011*). Dieser scheinbare Widerspruch wird dadurch bestärkt, dass in der adhärennten Epithel-Zelllinie „HeLa“ kein Einfluss von Mitochondrien auf den Kalziumeinstrom durch Orai-Kalziumkanäle festgestellt werden konnte (*Giacomello et al. 2010*).

1.3 Zielsetzung dieser Arbeit

Es gibt zahlreiche Studien zur Morphologie und Polarisation verschiedener Zelltypen sowie zur intrazellulären Lokalisation von Organellen. Modellzellen, wie die adhärenente Epithel-Zelllinie HeLa, aber auch spezielle Zelltypen wie T-Lymphozyten wurden in den letzten Jahrzehnten intensiv zellbiologisch charakterisiert. Dabei wurden mit Modellzellen gewonnene Erkenntnisse zumeist auf alle Zelltypen mit vergleichbarer Proteinexpression übertragen (siehe z.B. *Giacomello et al. 2010*). Morphologische Unterschiede zwischen verschiedenen Zelltypen und Unterschiede in der Verteilung ihrer Organellen wurden hierbei nur selten mit in Betracht gezogen. Quantitative Daten über Organellen bezüglich ihrer Lokalisation, ihrem prozentualen Anteil am Gesamtvolumen und bezüglich ihrer Dynamik im Zytosol existieren kaum. Insbesondere für T-Zellen wurden hierzu nur sehr wenige Daten veröffentlicht.

Ein Hauptziel dieser Arbeit ist daher folgende Parameter lebender menschlicher T-Zellen in verschiedenen Zellformen und bei Ausbildung einer „Immunologischen Synapse“ (IS) zu charakterisieren und/oder zu quantifizieren: allgemeine Zell-, Zytoskelett- und Organellmorphologie, Quantifizierung der Zellmorphologie, prozentualer Volumenanteil ausgewählter Organellen am Zellgesamtvolumen, sowie die Dynamik von Mitochondrien und Vesikeln anhand von Geschwindigkeiten. Diese Parameter sollen außerdem mit der Modell-Zelllinie HeLa verglichen werden, um morphologische Unterschiede aufzuzeigen, die einen Einfluss auf die Zellphysiologie haben könnten.

Ein Schwerpunkt der Analyse soll dabei auf Mitochondrien-Lokalisation und -Volumina liegen, da deren Verteilung für die Kalzium-abhängige Signaltransduktion nach T-Zell-Rezeptor-Stimulation eine sehr wichtige Rolle bezüglich der Aktivität der Orai-Kalziumkanäle spielt (*Quintana et al. 2011*). Die in der Literatur in diesem Zusammenhang beschriebenen Unterschiede zwischen T-Zellen (*Quintana et al. 2006*) und HeLa-Zellen (*Giacomello et al. 2010*) sollen mit morphologischen Unterschieden zwischen diesen Zellen in Bezug gebracht werden. Außerdem soll aufgeklärt werden, wie Mitochondrien bei der langanhaltenden Ausbildung einer IS lokalisiert werden. Neuere Studien widersprechen früheren Arbeiten darin, dass Mitochondrien langanhaltend an der IS lokalisiert bleiben (*Quintana et al. 2011; He et al. 2019*).

Zytotoxische Vesikel („Lytische Granula“) spielen für die Funktion von zytotoxischen CD8⁺ T-Zellen eine essenzielle Rolle. Insbesondere ihre Dynamik und die Dynamik des Zentrosoms sind für die effiziente Abtötung von Zielzellen hochrelevant. Aus diesem Grund sollen als weiterer Analyseschwerpunkt dieser Arbeit Bewegungsmuster und Geschwindigkeiten von Zentrosom, Vesikeln und Organellen in stimulierten CD8⁺ T-Zellen bei Ausbildung von Einzel- und Mehrfachkontakten mit stimulierenden Raji B-Zellen quantifiziert und mit Apoptoseanzeichen der B-Zellen abgeglichen werden. Die Notwendigkeit einer Zentrosom-„Andockung“ an der IS für den Abtötungsprozess (*Stinchcombe et al. 2006*) soll so auch überprüft werden. Zur Abgrenzung des Abtötungsprozesses von der Ausbildung einer nicht-zytotoxischen IS sollen diese Untersuchungen auch in der CD4⁺ Helfer T-Zelllinie Jurkat durchgeführt werden.

2 Material & Methoden

2.1 Material

In diesem Kapitel sind alle in dieser Arbeit verwendeten Materialien zusammengetragen, mit der Ausnahme von in Kapitel 2.3 (Klonierung) aufgelisteten spezifischen DNS-Sequenzen („Primern“).

2.1.1 Chemikalien

Hier nicht aufgeführte Standard-Laborchemikalien und -Lösungen wurden von den Firmen VWR, Roche, oder Merck in der Qualität „zur Analyse“ bezogen. Kursive Bestellnummern sind nicht mehr verfügbar.

Tabelle 1: Chemikalienliste mit Bezugsquelle und Bestellnummer, alphabetisch geordnet.

Chemikalie	Hersteller	Bestellnummer
Acrylamid / N',N'-Methylenbisacrylamid	Merck	A7168
Agarose, reinst	Bioline	Bio-41025
Ampicillin	Merck	271861
Ammoniumpersulfat (APS)	Merck	A3678
Bovines Serum-Albumin (BSA)	Merck	A9418
Calcein-AM	Thermo Fisher Scientific	C3100MP
CellMask orange / deep red	Thermo Fisher Scientific	C10045 / C10046
DMSO	Merck	D4540 / D8418
dNTP-Mix	NEB	N0447 S
<i>EcoRV</i>	NEB	R0195 S
FCS (fetales Kälberserum)	Thermo Fisher Scientific	10270
Fibronektin aus Humanplasma	Merck	F2006
Ficoll Paque Plus	Merck	GE17-1440-03
FURA-2 AM	Thermo Fisher Scientific	F1221
GTG-Agarose	Lonza	50070
HEPES	Merck	H7523
Hoechst 33342	Thermo Fisher Scientific	H1399
Interleukin-2 (IL-2), human, rekombinant	Miltenyi	130-097-748
Kanamycin	Merck	K1876
<i>KpnI</i>	NEB	<i>R0142</i> (ersetzt mit R3142)
MitoTracker red CMXRos	Thermo Fisher Scientific	M7512
Penicillin / Streptomycin	Merck	P4333
Paraformaldehyd (PFA)	Science Services	E15710
PolyFect Transfektionsreagenz	Qiagen	301105
Poly-L-Ornithin-Hydrobromid	Merck	P3655
ProLong gold (mit DAPI)	Thermo Fisher Scientific	P36934 (P36941)
<i>Staphylococcus aureus</i> Superantigen A (SEA)	Merck	S9399
<i>S. aureus</i> Superantigen E (SEE), rekombinant	Toxin Technology	<i>rET404</i> (jetzt Thermo Fisher S.)
<i>Taq</i> -Polymerase	NEB	M0267 S
TEMED	Merck	T9281
Thapsigargin	Thermo Fisher Scientific	T7458
TMRM	Thermo Fisher Scientific	T668
Triton X-100	Eurobio	018774
Trypanblau	Merck	T8154
TrypLE Select Trypsin-Ersatz	Thermo Fisher Scientific	12563
TubulinTracker green	Thermo Fisher Scientific	T34075

2.1.2 Medien und Pufferlösungen

Tabelle 2: Medien und Pufferlösungen mit Hersteller und Zusammensetzung / Bestellnummer.

Lösung	Hersteller	Zusammensetzung / Bestellnummer / Referenz
LB-Medium	selbst hergestellt	10 g/l NaCl, 5 g/l Hefe-Extrakt, 10 g/l Bacto-Trypton, pH 7
Ringer-Lösung	selbst hergestellt	155 mM NaCl, 4,5 mM KCl, 10 mM Glukose, 5mM HEPES, 2,5 mM MgCl ₂ , 1 mM CaCl ₂ , pH 7,4 (NaOH)
AIM-V	Thermo Fisher Scientific	12055
DMEM (+ 4,5 g/l Glukose, L-Glutamin, Pyruvat)	Thermo Fisher Scientific	41966
RPMI 1640	Thermo Fisher Scientific	21875
DPBS	Thermo Fisher Scientific	14190
HBSS	Merck	H6648
Antarktische Phosphatase	NEB	B0289 S
NEBuffer 1	NEB	B7001 S
NEBuffer 3	NEB	B7003 S
T4 Ligase-Puffer (10x)	NEB	B0202 S
TBE-Puffer	selbst hergestellt	<i>Sambrook und Russel (2001)</i>

2.1.3 Labor-„Kits“

Tabelle 3: Hersteller-„Kits“ mit Bestellnummer, alphabetisch geordnet.

Zusammenstellung (Kit)	Hersteller	Bestellnummer
Cell Line Nucleofector Kit V	Lonza	VCA-1003
Dynabeads CD8 Positive Isolation Kit	Thermo Fisher Scientific	11333D
Dynabeads Untouched Human CD8 T Cells Kit	Thermo Fisher Scientific	11348D
Endo(toxin-)Free Plasmid Maxi Kit	Qiagen	12362
HiSpeed Plasmid Maxi Kit	Qiagen	12662
Human T Cell Nucleofector Kit	Lonza	VPA-1002
Phusion Polymerase Kit	Thermo Fisher Scientific	F530L
QIAprep Spin Miniprep Kit	Qiagen	27106
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen	28706
QuikChange XL Kit	Agilent Technologies	200516

2.1.4 Antikörper

Tabelle 4: Antikörper-Liste mit Eigenschaften, Hersteller und Bestellnummer / Referenz.

Ziel-Protein	Klon	sonstiges	Hersteller	Bestellnummer / Referenz
anti-CD3, human	B-B11	Azid-frei	Euroclone	<i>DCH010000</i>
anti-CD3, human	UCHT1	Alexa ⁴⁸⁸ -konjugiert	Biologend	300415
anti-CD3, human	UCHT1	Alexa ⁶⁴⁷ -konjugiert	Biologend	300416
anti-Orai1, human		aus Kaninchen	Merck	O8264 <i>Borke et al. (1989)</i>
anti-Kaninchen IgG		aus Ziegen Alexa ⁵⁶⁸ -konjugiert	Thermo Fisher Scientific	A-11036

2.1.5 Plasmide

Tabelle 5: Plasmid-Liste mit Bezeichnung, Zielsequenz, Bezugsquelle und Referenz.

vollständige Bezeichnung	Abkürzung	Zielsequenz	Bezugsquelle (Bestellnummer)	Referenz
Transfektion				
pAmaxa-COX8-mTFP1	mito-mTFP1	Mitochondrien	selbst kloniert (s. 2.3.4)	<i>Haggie und Verkman (2002)</i> <i>Ai et al. (2006)</i>
pAmaxa-ER-TagRFP-T	ER-TagRFP-T	ER-Lumen, KDEL	selbst kloniert (s. 2.3.2)	<i>Denecke, De Rycke und Botterman (1992)</i>
pAmaxa-Lifeact-mEGFP	Lifeact-mEGFP	Aktin-Filamente	selbst kloniert (s. 2.3.3)	<i>Riedl et al. (2008)</i> <i>Eisenbeis et al. (2017)</i>
pAmaxa-Orai1-mEGFP	Orai1-mEGFP	Plasmamembran	Dalia Alansary, Biophysik Homburg/Saar	<i>Quintana et al. (2011)</i>
pAmaxa-STIM1-TagRFP-T	STIM1-TagRFP-T	ER-Membran	Dalia Alansary, Biophysik Homburg/Saar	<i>Quintana et al. (2011)</i>
pCAG-mGFP	mem-EGFP	Plasmamembran (GAP43 Palm.)	Addgene (#14757) Connie Cepko	<i>Matsuda und Cepko (2007)</i>
pcDNA3-COX8-EGFP	mito-EGFP	Mitochondrien	Norbert Blum, TU München	<i>Haggie und Verkman (2002)</i>
pcDNA3-COX8-mCherry	mito-mCherry	Mitochondrien	selbst kloniert	<i>Diplomarbeit C. Junker (2008)</i>
pcDNA3-Lifeact-mRFPPruby	Lifeact-mRFPPruby	Aktin-Filamente	Roland Wedlich-Soldner, MPI Martinsried	<i>Fischer et al. (2006)</i> <i>Riedl et al. (2008)</i>
pcDNA3-Perforin-mCherry	Perforin-mCherry	Lytische Granula	Varsha Pattu, Arbeitsgruppe Jens Rettig	<i>Pattu et al. (2011)</i>
pcDNA3-γ-Tubulin-EGFP	γ-Tubulin-EGFP	Zentrosom	Alexey Khodjakov, Wadsworth Center	<i>Khodjakov und Rieder (1999)</i>
pIRESneo-EGFP-α-Tubulin	α-Tubulin-EGFP	Mikrotubuli	Addgene (#12298) Patricia Wadsworth	<i>Rusan et al. (2001)</i>
pQE80-hDrp1 pQE80-hFis1	hDrp1 hFis1		Yisang Yoon, DOP Georgia	<i>Yoon et al. (2003)</i>
Klonierung				
pmaxGFP (Lonza), modifiziert	pAmaxa		Ulrich Wissenbach, Pharmakologie Homburg	
pAmaxa-mEGFP-N			Dalia Alansary, Biophysik Homburg/Saar	<i>Zacharias et al. (2002)</i>
pTagRFP-N			Evrogen (FP142)	<i>Merzlyak et al. (2007)</i>
pAmaxa-TagRFP-T-N			selbst kloniert (s. 2.3.1)	<i>Shaner et al. (2008)</i>

2.1.6 Mikro-Partikel („Beads“)

Tabelle 6: Liste genutzter Mikropartikel („Beads“) mit Durchmesser, Eigenschaften und Bezug.

Bezeichnung	Durchmesser	Eigenschaften	Hersteller	#
PS-Speck Kit	170 nm	blau, grün, orange, tiefrot <i>separat</i>	Thermo Fisher Scientific	P7220
FluoSpheres red	200 nm	rot	Thermo Fisher Scientific	F8810
TetraSpeck	500 nm	blau, grün, orange, tiefrot <i>simultan</i>	Thermo Fisher Scientific	T7281
Dynabeads T-Cell Expander Beads	4,5 µm	anti-CD3 und anti-CD28 Antikörper-Beschichtung	Thermo Fisher Scientific	11131D
Polystyren Mikropartikel	5,8 µm	nicht fluoreszent	Polyscience	07312

2.1.7 Zelltypen / -linien

Tabelle 7: Liste genutzter Zellen mit Bezugsquelle, Bestellnummer und Referenz.

Bezeichnung	Bezugsquelle	Bestellnummer	Referenz
primäre humane CD8⁺ T-Lymphozyten	Eigen-Isolation (s. 2.2.4)		<i>Schwarz et al. (2007)</i>
<i>Escherischia coli</i> DH5α	Thermo Fisher Scientific	18265017	
Zervix-Karzinom Epithel-Zelllinie HeLa	DSMZ	ACC 57	<i>Gey, Coffman und Kubicek (1952)</i>
T-Lymphoma Zelllinie Jurkat E6.1	ATCC	TIB-152	<i>Weiss, Wiskocil und Stobo (1984)</i>
stabil Orai1-HA exprimierende Jurkat J1.14	von Dalia Alansary aus Jurkat E6.1 generiert		<i>Quintana et al. (2011)</i>
B-Lymphoma Zelllinie Raji	DSMZ	ACC 319	<i>Pulvertaft (1964)</i>

2.1.8 Geräte

Tabelle 8: Geräte-Liste mit Komponenten, Bezugsquelle und Bestellnummer, falls verfügbar.

System / Gerät	Komponenten	Bezugsquelle	Bestellnummer
Cell Observer HS	Epi-Fluoreszenz Mikroskop	Zeiss	
Objektive	40x Fluar Öl 1,3 63x Plan-Apochromat Öl 1,4 63x Plan-Neofluar Im Korr 1,3 100x Plan-Neofluar Öl 1,45	Zeiss	
Lichtquellen	Colibri LED (365, 470, 625 nm, neutral Weiß) DG-4 (Xenon mit Filterwechsel)	Zeiss Sutter Instruments	
Filtersätze	DAPI HC GFP HE DsRed HE TxRed ET Cy5 ET FURA-2 HE GFP und DsRed Dual-Emission Quadband HC Multi-Emission	AHF Zeiss Zeiss AHF AHF Zeiss Zeiss AHF	F36-513 38HE 43HE F46-008 F46-006 21HE 56HE F66-888
Durchlicht	Halogen mit High-Speed-„Shutter“ Durchlicht-LED	Zeiss / Uniblitz Zeiss	
Kameras	AxioCam MRm Rev. 3 (CCD) Evolve16 (back-illuminated EMCCD)	Zeiss Teledyne Photometrics	
Probentisch	XY-Tisch mit Z-Piezo Aufsatz	ASI	PZ-2000FT
Inkubation	Inkubator XL S1 mit CO ₂	Zeiss	
LSM 710	Laser-Scanning-Mikroskop	Zeiss	
Objektive	40x Fluar Öl 1,3 63x Plan-Neofluar Im Korr 1,3 100x Plan-Neofluar Öl 1,45	Zeiss	
Laser	488 nm und 565 nm	Zeiss	
IX70	TIRF-Mikroskop	Olympus	
Objektiv	100x Öl 1,45	Olympus	
Laser	488 nm 561 nm solid-state	Spectra-Physics Melles Griot	185-F02
Filter	GFP RFP GFP und DsRed Dual-Emission 555 nm ‚Longpass‘ Strahlteiler	AHF	F26-302 F26-304 F56-019 F38-555
Kamera-Teiler	„Dual-View“	Visitron	
Kamera	MicroMax 512BFT (front EMCCD)	Princeton Instruments	

Allgemein			
Immersion	Wasser, Glycerin Immersol W (n: 1,334) Immersol 518 F (n: 1,518)	Zeiss	
Deckgläser	Typ 1,5 HR 0,17 mm, hoch-präzise Ø 25mm bzw. 18x18 mm	Zeiss / Kindler	
Bio-Photometer		Eppendorf	
Elektroporator	Amaxa Nukleofector II	Lonza	
Heizblock		Bioer	CHB-202
Mikro-Manipulator	mit Kontroll-Einheit	Sutter Instruments	MP-285 MPC-200
PCR Thermocycler	Mastercycler Personal	Eppendorf	
Pipetten-Zieher		Sutter Instruments	P-1000
Zentrifugen	5450 C Universal 32 R	Eppendorf Hettich	

2.1.9 Software

Tabelle 9: Software-Liste mit Version, Modulen, Einsatz und Hersteller, alphabetisch geordnet.

Bezeichnung	Version	Module	Einsatz	Hersteller
AxioVision 32-bit	4.6.3 4.8	Mehrdimensionale Bildaufnahme Schnelle Bildaufnahme Multichannel Unmixing 3D Dekonvolution Interaktives Messen Inside 4D	Epi-Fluoreszenz- Aufnahme Bearbeitung Dekonvolution Analyse & Darstellung	Zeiss
CorelDRAW	2019		Abbildungen	Corel
Dropbox			online Filme	Dropbox
Excel	2009, 2016		Datenanalyse	Microsoft
Gryphos			manuelles „Tracking“	Gerhard Braçic
Huygens Essentials	4.5.1p3 64b		Dekonvolution	SVI
ibisPaint	9.4.10		digitales Zeichnen	ibis
„MacBiophotonics“ ImageJ		Stacks Particle Analysis: manual Tracking	Bildbearbeitung man. Tracking	Wayne Rasband
IMARIS x64	8.1.2	IMARIS Track: advanced particle Tr.	autom. Tracking	Bitplane
Metamorph			TIRF-Aufnahme	Visitron
Photo Paint	2019		Bildbearbeitung	Corel
Word	2016		Textverarbeitung	Microsoft
Zen 2009			LSM-Aufnahme	Zeiss

2.2 Kultur und Präparation von Zellen

2.2.1 Kultivierung von HeLa-Zellen

Die adhärente humane Epithel-Zelllinie HeLa (*Gey, Coffman und Kubicek 1952*) wurde in DMEM-Medium, das mit 10 % FCS und Penicillin/Streptomycin versetzt wurde, im Brutschrank bei 37°C, 5 % CO₂ und 95 % H₂O kultiviert. Die Zellen wurden zwei- bis dreimal pro Woche 1:10 verdünnt. Dazu wurde zuerst das Medium über den Zellen entfernt, anschließend mit DPBS gewaschen und schließlich 3 ml „TrypLE“ auf die Zellen gegeben. Nach 1 min Inkubation bei Raumtemperatur wurde das TrypLE abgesaugt und die Zellen nach Zugabe von 10 ml frischem Medium durch starkes Klopfen vom Flaschenboden abgelöst.

Anschließend wurden die Zellen im Medium resuspendiert und 1 ml der Zellsuspension in eine neue 250 ml Kulturflasche mit 12 ml frischem DMEM+FCS überführt. Diese Arbeiten wurden von Andrea Armbrüster, Anja Ludes, Bettina Strauß, Cora Hoxha, Gertrud Schwär und mir selbst durchgeführt.

2.2.2 Kultivierung von Jurkat- und Raji-Zellen

Die CD4-positive (CD4⁺) T-Zelllinie Jurkat E6.1 (*Schneider, Schwenk und Bornkamm 1977; Weiss, Wiskocil und Stobo 1984*) und die MHC-II-positive B-Zelllinie Raji (*Pulvertaft 1964*) wurden mit RPMI1640-Medium kultiviert, das mit 10 % FCS und 1 % Penicillin/Streptomycin versetzt wurde. Durch dreimalige Passage pro Woche wurde die Zelldichte in einem Bereich von 200.000–1.600.000 Zellen/ml gehalten. Die Zellen wurden in einem Brutschrank bei 37°C, 5 % CO₂ und 95 % H₂O kultiviert. Diese Arbeiten wurden von Andrea Armbrüster, Anja Ludes, Bettina Strauß, Cora Hoxha und Gertrud Schwär durchgeführt.

2.2.3 Erzeugung einer stabil Orai1-exprimierenden Jurkat-Zelllinie

Eine zur Orai1-Lokalisationsanalyse genutzte stabil Orai1-HA-exprimierende Jurkat Zelllinie (J1.14) wurde von Dalia Alansary erzeugt und zur Verfügung gestellt. Die Methodik zur Herstellung der Zelllinie ist in *Quintana et al. (2011)* beschrieben.

2.2.4 Humane CD8⁺ T-Lymphozyten

Die Nutzung aus der Apherese übrig gebliebener menschlicher Zellen von gesunden Blutspendern wurde von der lokalen Ethik-Kommission genehmigt (Ärztchamber des Saarlandes, Referenz 84/15).

2.2.4.1 Isolation peripherer Blutlymphozyten aus Leukozyten-Reduktionsfiltern

Humane Periphere Blutlymphozyten (PBL) wurden aus Leukozyten-Reduktionsfiltern oder Filtern der Thrombozyten-Spende gewonnen, die vom Blutspendedienst der Universitätskliniken des Saarlandes (Abteilung klinische Hämostaseologie und Transfusionsmedizin) zur Verfügung gestellt wurden. Die Aufreinigung erfolgte nach dem zuvor beschriebenen Protokoll (*Schwarz et al. 2007*). Diese Arbeiten wurden von Carmen Hässig durchgeführt. Eine detaillierte Charakterisierung der so erhaltenen PBL wurde in *Knorck et al. (2018)* veröffentlicht.

2.2.4.2 Negativ-Isolation von humanen CD8⁺ T-Lymphozyten

Zur Isolation von unstimulierten („naiven“) CD8-positiven (CD8⁺) T-Lymphozyten aus PBL (s. 2.2.4.1) wurde das „Dynabeads Human Untouched CD8 T Cells Kit“ genutzt. Es wurde laut Herstellerprotokoll verfahren. Diese Arbeiten wurden von Bin Qu, Cora Hoxha, Gertrud Schwär und mir selbst durchgeführt.

2.2.4.3 „Bead“-Stimulation von humanen CD8⁺ T-Lymphozyten

Die durch Negativisolation erhaltenen „naiven“ CD8⁺ T-Lymphozyten wurden gezählt, abzentrifugiert und die Zellen pro 5 Mio. Zellen gezählter Zellen mit jeweils 5 ml frischem AIM-V-Medium mit 5 % FCS resuspendiert und auf eine „6-Wellplatte“ aufgeteilt (5 Mio. / Well). Nun wurden die Zellen im Verhältnis 4:3 mit antiCD3- und antiCD28-Antikörper-beschichteten und magnetisierten Polystyren-Mikropartikeln

(„T-Cell Expander Beads“) versetzt. Die Zell-Bead-Mischung wurde 2-3 Tage bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert und die stimulatorischen Beads anschließend mithilfe eines Magneten entfernt. Zur Kultivierung der erhaltenen Zellen über einen längeren Zeitraum (> 3 Tage) wurde zum Medium 100 U/ml Interleukin-2 hinzugegeben. Diese Arbeiten wurden von Bin Qu, Varsha Pattu und mir selbst durchgeführt.

2.2.4.4 Erzeugung und Isolation von SEA-stimulierten CD8⁺ T-Lymphozyten

Zu zuvor isolierten PBL (s. 2.2.4.1) wurde 5 µg/ml SEA und 100 U/ml Interleukin-2 hinzugegeben, bevor die Zellen 1 h bei 37°C inkubiert wurden. Anschließend wurden CD8-positive Zellen mit dem „Dynabeads CD8 Positive Isolation Kit“ von den restlichen PBL getrennt. Dabei wurde nach Herstellerprotokoll verfahren. Anschließend wurden die Zellen in frischem AIM-V+FCS aufgenommen und bei 37°C und 5 % CO₂ kultiviert. Zur Kultivierung der erhaltenen Zellen über einen längeren Zeitraum (> 3 Tage) wurde zum Medium 100 U/ml Interleukin-2 hinzugegeben. Diese Arbeiten wurden von Bin Qu, Varsha Pattu und mir selbst durchgeführt (siehe *Qu et al. 2011*).

2.3 Klonierung von Plasmiden

Alle im Rahmen dieser Arbeit konstruierten Plasmide wurden mit einem „Vektor-Backbone“ erstellt, das auf dem Kontroll-Vektor „pmaxGFP“ der Firma Amaxa (jetzt Lonza) beruht. Aus diesem Vektor wurde von Ulrich Wissenbach (Pharmakologie, Homburg/Saar) die Sequenz des GFP entfernt und der Vektor um einige Restriktions-Schnittstellen erweitert („pAmaxa“). Durch die geringe Größe auf diesem Vektor basierender Plasmide wurde eine höhere Transfektionseffizienz, vor allem bei primären T-Zellen, erreicht. Nicht spezifisch aufgeführte Klonierungsmethoden wurden wie zuvor durchgeführt (*Diplomarbeit C. Junker 2008*) und sind aus *Sambrook und Russel (2001)* übernommen. Die molekularbiologischen Methoden wurden mit Unterstützung von Anja Ludes, Barbara Niemeyer und Dalia Alansary durchgeführt.

2.3.1 Umwandlung von TagRFP zu TagRFP-T

Zum Erhalt des, im Vergleich zu TagRFP deutlich photostabileren, orange-roten monomeren Fluoreszenzproteins „TagRFP-T“ (*Shaner et al. 2008*), wurde eine „Quick-Change“-PCR („QuikChange XL Kit“) mit dem mittels Transformation in *dam1*-positive *E.Coli*-Bakterien methylierten Vektor „pTagRFP“ (Evrogen) als Template und den folgenden „Primern“ durchgeführt:

Forward	5'- GGCCTGGAAGGCAGAACCGACATGGCCCTGAAGC -3'
Reverse	5'- GCTTCAGGGCCATGTCTGGTTCTGCCTCCAGGCC -3'

Dies führte zur Mutation S162T in der TagRFP-Sequenz. Der Verdau des methylierten Template-Vektors mittels *Dpn1* (QuikChange XL Kit) und die Transformation der PCR-Produkte in *E.Coli* resultierte in einem geschlossenen, mutierten Vektor („pTagRFP-T“).

Anschließend wurde eine PCR mit diesem Vektor als Template durchgeführt, bei der C-terminal durch eine Erweiterung des Reverse-Primers 21 Basen für den C-Term von GFP (GMDELYK) und ein Stop-Codon angefügt wurden. N-terminal wurde eine halbe *EcoRV*-Schnittstelle und eine Kozak-Sequenz durch den Forward-Primer angefügt. Die Sequenzen der Primer lauteten wie folgt:

Forward 5'- ATGCCACCATGGTGTCTAAGGGCGAAG -3'
 Reverse 5'- TCACTGTACAGCTCGTCCATGCCATTAAGTTTGTGCCCCAGTTTGC -3'

Das so erhaltene Insert wurde in die *EcoRV*-Schnittstelle des Vektors „pAmaxa“ eingefügt und die korrekte Orientierung mit einer Kontroll-PCR von transformierten Bakterien-Kolonien als Template überprüft. Dabei wurde ein Forward-Primer gewählt, der an das 5'-Ende des Inserts bindet und ein Reverse-Primer, der vom Insert aus in der 3'-Richtung an den Vektor pAmaxa bindet:

Forward 5'- GTGCCGACCTGATCAAG -3'
 Reverse 5'- ACCTCCCACACCTCCCC -3'

Das so erhaltene Plasmid wird von jetzt an als „pAmaxa-TagRFP-T-N“ bezeichnet.

2.3.2 Klonierung von ‚ER-TagRFP-T‘

Zur Konstruktion des Plasmids „pAmaxa-ER-TagRFP-T“ wurde zunächst eine PCR mit dem Vektor „pAmaxa-TagRFP-T-N“ als Template durchgeführt. Als Reverse-Primer wurde ein in 5'-Richtung durch ein Stop-Codon und ein ER-Retentionssignal (KDEL; *Denecke, De Rycke und Botterman 1992*) erweiterter Primer für EGFP verwendet. N-terminal wurde eine halbe *EcoRV*-Schnittstelle und eine Kozak-Sequenz durch den Forward-Primer angefügt. Die Sequenzen der Primer lauteten wie folgt:

Forward 5'- ATGCCACCATGGTGTCTAAGGGCGAAG -3'
 Reverse 5'- TTACAGCTCGTCCTTCTGTACAGCTCGTCCATG -3'

Das so erhaltene Insert wurde durch „Blunt-End“-Ligation in den Vektor „pAmaxa“ eingefügt und die korrekte Orientierung des Inserts wie in 2.3.1 bestätigt („pAmaxa-TagRFP-T-N-KDEL“).

Durch Annealing der beiden, wie alle genutzten Primer von MWG-Biotech hergestellten, Sequenzen

5'- CGCCACCATGCTGCTGCCCGTCCCCCTGCTGCTGGGCCTGCTGGGCGCCGCCGCCGAC -3' und
 5'- GTCGGCGGCGGCCAGCAGGCCAGCAGCAGGGGGACGGGCAGCAGCATGGTGGCG -3'

wurde die ER-Zielsequenz von „Calreticulin“ mit N-terminaler Kozak-Sequenz erhalten und in die *EcoRV*-Schnittstelle von „pAmaxa-TagRFP-T-KDEL“ eingefügt. Die korrekte Orientierung des Inserts wurde wie in 2.3.1 kontrolliert. Die Laborarbeiten in 2.3.2 wurden von Carmen Mangerich durchgeführt.

2.3.3 Klonierung von ‚Lifect-mEGFP‘

Zur Konstruktion des Plasmids „pAmaxa-Lifect-mEGFP“ (*Eisenbeis et al. 2017*) wurden die folgenden komplementären Sequenzen von MWG-Biotech herstellen gelassen:

5'- CGCCACCATGGGCGTGGCCGACCTGATCAAGAAGTTCGAGAGCATCAGCAAGGAGGAG -3'
 5'- CTCCTCCTTGCTGATGCTCTCGAATTCTTGATCAGGTCGGCCACGCCATGGTGGCG -3'

Durch Annealing dieser Sequenzen wurde ein „Insert“ mit einer 5'-Kozak-Sequenz, einer Aktin-Filament-bindenden Sequenz (*Riedl et al. 2008*) und „Blunt-Ends“ erzeugt. Dieses Insert wurde anschließend in die *EcoRV*-Schnittstelle des von Dalia Alansary erhaltenen Vektors „pAmaxa-mEGFP-N“ eingefügt. Das darin kodierte monomerische EGFP wurde zuvor von Dalia Alansary mittels „Quick-Change“-PCR (s. 2.3.1)

durch die Mutation A206K in EGFP generiert (*Zacharias et al. 2002*). Die korrekte Orientierung des Inserts wurde durch eine Kontroll-PCR von transformierten Bakterien-Kolonien wie in 2.3.1 überprüft.

2.3.4 Klonierung von ‚mito-mTFP1‘

Die Klonierung des Plasmids „pAmaxa-COX8-mTFP1“ erfolgte durch die Einfügung des zuvor erstellten „Inserts“ der mitochondrialen Import-Sequenz von COX8 (*Haggie und Verkman 2002*) in die, in 5'-Richtung von der Sequenz von mTFP1 („monomeric Teal Fluorescent Protein 1“, *Ai et al. 2006*) gelegenen, *EcoRV*-Schnittstelle des zuvor erstellten Vektors „pAmaxa-mTFP1-N“. Alle Arbeiten wurden wie zuvor durchgeführt (siehe „pcDNA3-COX8-mCherry“ in *Diplomarbeit C. Junker 2008*).

2.4 Transfektion

2.4.1 Transfektion von HeLa Zellen

HeLa-Zellen wurden einen Tag vor der Transfektion passagiert und je 50.000 suspendierte Zellen wurden in eine 6-Wellplatte mit gereinigten und autoklavierten Deckgläsern gegeben. Jedes „Well“ wurde auf 5 ml mit DMEM-Medium ohne FCS aufgefüllt. Es wurden 2 µg Lifeact-mEGFP bzw. 3 µg ER-TagRFP-T Plasmid-DNS mit DMEM-Medium ohne FCS auf 100 µl aufgefüllt und mit 10 µl „PolyFect“ Transfektionsreagenz (Qiagen) versetzt. Nach dem Durchmischen wurde 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Während der Inkubation wurden die am Vortag vorbereiteten HeLa-Zellen mit DPBS gewaschen und mit 1,5 ml frischem DMEM+FCS überschichtet. Nach der Inkubation des PolyFect/DNS-Gemisches wurde dieses mit 600 µl frischem DMEM+FCS verdünnt und direkt auf die Zellen gegeben. Die transfizierten Zellen wurden bei 37°C und 5 % CO₂ im Brutschrank mindestens 10 h inkubiert, bevor sie für Experimente genutzt wurden.

2.4.2 Transfektion von Jurkat CD4⁺ T-Lymphozyten

Die humane T-Helferzelllinie Jurkat wurde mit dem „Cell Line Nucleofector Kit V“ (Lonza) durch Elektroporation transfiziert. Für die Transfektion wurden 1 Million Zellen aus einer Zellkulturflasche mit einer Dichte von 0,3 Mio. Zellen/ml bei 200g für 10 min abzentrifugiert, das überstehende Medium vollständig abgenommen und die Zellen in 100 µl „Nucleofector Solution V“ resuspendiert. Anschließend wurde die jeweilige Plasmid-DNS hinzugegeben, durchmischt und der gesamte Ansatz in eine Lonza-Küvette (Nucleofector Kit) pipettiert. Die Zellen wurden nun mit dem Lonza-Protokoll C-16 transfiziert. Direkt danach wurde 500 µl RPMI1640 hinzugegeben und die Zellsuspension in eine 15 ml Kulturflasche mit 5 ml RPMI1640+FCS überführt. Die transfizierten Zellen wurden bei 37°C und 5 % CO₂ im Brutschrank mindestens 8 h inkubiert, bevor sie in Experimenten eingesetzt wurden.

2.4.3 Transfektion von humanen stimulierten CD8⁺ T-Lymphozyten

Humane stimulierte CD8⁺ T-Lymphozyten wurden mit dem „Human T Cell Nucleofector Kit“ (Lonza) transfiziert. Für eine Transfektion „Bead“- bzw. SEA-stimulierter CD8⁺ T-Zellen wurden etwa 5 Millionen Zellen verwendet. Dazu wurden die Zellen aus einem „Well“ (s. 2.2.4.3 bzw. 2.2.4.4) entnommen,

resuspendiert und im Fall von Bead-stimulierten Zellen die „T-Cell Expander-Beads“ mithilfe eines Magneten entfernt. Anschließend wurden die Zellen bei 200g für 10 min abzentrifugiert und in 5 ml DPBS mit 0,5 % BSA gewaschen. Nach der Abnahme des DPBS/BSA wurden die Zellen in 100 µl „Nucleofector Solution for Human T Cells“ aufgenommen und mit der Plasmid-DNS versetzt. Die Transfektion erfolgte in einer Lonza-Küvette (Kit) mit dem Protokoll T-23. Direkt nach der Transfektion wurden die Zellen mit 500 µl AIM-V versetzt, in eine 24-Wellplatte mit vorgelegten 500 µl AIM-V+FCS pro Well überführt und bei 37°C und 5 % CO₂ im Brutschrank inkubiert. 3-6 h nach der Transfektion wurden die Zellen erneut abzentrifugiert und in 1,5 ml frischem AIM-V+FCS aufgenommen. Nach diesem Waschschrift wurden die Zellen mindestens 6 h bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert, bevor sie für Experimente verwendet wurden.

2.5 Versuchsvorbereitungen

2.5.1 Präparation von Deckgläsern

Glas-Deckgläser des Typs 1,5 (0,17 mm Dicke) und 25 mm Durchmesser (lebende Zellen) bzw. 18x18 mm (fixierte Zellen) wurden mit 70 % Ethanol und H₂O_{dest.} gereinigt und im Trockenschrank getrocknet.

Bei Experimenten mit lebenden HeLa-Zellen wurden gereinigte Glas-Deckgläser autoklaviert, jeweils 1 Deckglas in die „Wells“ von 6-Wellplatten verteilt und etwa 250.000 Zellen pro „Well“ hinzugegeben. Jedes „Well“ wurde auf 5 ml mit DMEM+FCS aufgefüllt und die Zellen in der 6-Wellplatte für mindestens 12 h wie in 2.2.1 kultiviert, bevor Färbungen, Transfektionen oder Experimente durchgeführt wurden.

Zur Beschichtung von Deckgläsern wurde 30 µl DPBS mit Poly-L-Ornithin (0,1 mg/ml) bzw. Fibronectin (0,05 mg/ml) aufgebracht und 30 min bei Raumtemperatur (RT) einwirken gelassen. Danach wurde die Lösung abgesaugt und die Deckgläser mit Papiertüchern trocken getupft.

Zur Erstellung von Referenz-Messungen für die Dekonvolution wurden „PS Speck Kit Beads“ (Ø 170 nm) oder „FluoSpheres red“ (Ø 200 nm) genutzt, zur Anpassung räumlicher Verschiebungen verschiedener Fluoreszenz-Kanäle „TetraSpeck Beads“ (Ø 500 nm). Alle „Beads“ wurden in einem Ultraschall-Bad voneinander gelöst, in den Verhältnissen 1:50.000 (PS Speck) bzw. 1:20.000 (TetraSpeck) mit H₂O_{dest.} verdünnt, die benötigten Fluoreszenzen vermischt und etwa 100-200 µl auf gereinigte Glas-Deckgläser aufgebracht. Anschließend wurden die Bead-Deckgläser im Trockenschrank getrocknet.

Zur Stimulation von Jurkat CD4⁺ T-Zellen während der TIRF-Mikroskopie (s. **Abb. 41 c**) wurden gereinigte Glas-Deckgläser mit anti-CD3-Antikörpern beschichtet. Es wurde nach dem in *Bunnell et al. (2003)* und *Quintana et al. (2009)* beschriebenen Protokoll verfahren.

2.5.2 Fluoreszenz-Färbungen von Zellen

Alle ungelösten organischen Farbstoffe wurden in DMSO zu Stocklösungen von 1:1000-2000 gelöst.

Bei Färbungen von lebenden Zellen mit organischen Fluoreszenzfarbstoffen wurde auf eine möglichst geringe Konzentration des Farbstoffes bei noch ausreichender Signalstärke im Experiment geachtet.

Färbungen von HeLa-Zellen wurden durchgeführt, indem das Medium über den mit HeLa-Zellen überwachsenen Deckgläsern (s. 2.5.1) abgesaugt und durch die jeweilige Färbelösung ersetzt wurde.

Färbungen von T- und B-Zellen wurden durch Abzentrifugieren von etwa 200.000 Zellen, anschließendes Entfernen des Mediums und Resuspension in der jeweiligen Färbelösung durchgeführt.

Färbungen mit „CellMask deep red bzw. orange“ (Plasmamembran) wurden mit einer Konzentration von 2,5 µg/ml für 5 Minuten bei Raumtemperatur (RT) durchgeführt, um Vesikel-Endozytose zu verringern.

Zur Färbung von Zellkernen und Chromosomen wurden die Zellen für 5 min bei RT mit 2 µM „Hoechst 33342“ inkubiert. Dieser Farbstoff lagert sich wie DAPI zwischen die Basen doppelsträngiger DNS, hat aber eine geringere Zytotoxizität als DAPI.

Zur Markierung von Tubulin-Filamenten wurden die Zellen für 20 min bei RT mit 250 nM „TubulinTracker green“ inkubiert. Dieser auf Taxol basierende Marker fixierte die Filamente in ihrer Form. Mitochondrien wurden mit 25 nM „MitoTracker red (CMXRos)“ für 20 min bei RT markiert. Dieser positiv-geladene Fluoreszenzfarbstoff akkumuliert aufgrund des mitochondrialen Membranpotentials in diesen Organellen.

Zur Validierung der Kontaktbildung bzw. zur Identifikation wurden T-Zellen mit 1 µM und B-Zellen mit 2 µM „FURA-2-AM“ 30 min bei RT oder 37°C inkubiert. Dieser Stoff akkumuliert im Zytosol, ist mit UV-Licht anregbar und emittiert grünes Licht. Die separate Anregung mit 340 nm bzw. 380 nm durch die Lichtquelle „DG-4“ (Sutter) ermöglichte die Bestimmung von Kalziumkonzentrations-Anstiegen.

Als Apoptosemarker wurden Raji B-Zellen für 30 min bei 37°C mit 10 nM „TMRM“ inkubiert. Die Signalintensität dieses Farbstoffes hängt vom mitochondrialen Membranpotential ab.

Zur Identifikation und als Nekrosemarker wurden Raji B-Zellen für 30 min bei 37°C mit 50 nM „Calcein-AM“ inkubiert, welches im Zytosol akkumuliert und bei Membranschäden verloren geht.

Im Anschluss an alle Färbungen wurden die Zellen je nach Experiment entweder mit Ringer-Lösung oder dem jeweiligen Kulturmedium gewaschen.

2.5.3 anti-CD3-Antikörper-Inkubation von lebenden T-Zellen

Durch die Inkubation von Jurkat CD4⁺ bzw. SEA-stimulierten CD8⁺ T-Zellen mit 1:50 verdünnten anti-CD3-Antikörpern (konjugiert mit Alexa⁴⁸⁸ oder Alexa⁶⁴⁷, Biolegend) für 30 min bei Raumtemperatur oder 37°C kam es neben einer schwachen Färbung der Plasmamembran der T-Zellen auch zu einer starken Markierung aller ab Beginn der Inkubation endozytierten CD3-enthaltenden Vesikel. Diese Vesikel werden in dieser Arbeit als „endoCD3-Vesikel“ bezeichnet. Nach der Inkubation wurden die Zellen mit Ringer-Lösung oder dem jeweiligen Kulturmedium gewaschen.

2.5.4 Beladung von Raji B-Zellen mit Superantigenen

Etwa 200.000 Raji B-Zellen wurden abzentrifugiert und in RPMI1640 mit 10 µg/ml *Staphylococcus aureus* Enterotoxin A bzw. E (SEA bzw. SEE) resuspendiert und 30 min bei Raumtemperatur oder 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen erneut abzentrifugiert, gewaschen und in frischem RPMI1640+FCS resuspendiert.

2.5.5 Beschichtung von 5,8 µm „Beads“ mit anti-CD3-Antikörpern

Zur fokalen Stimulation von Jurkat CD4⁺ T-Zellen wurden Polystyren-Kügelchen („Beads“) mit 5,8 µm Durchmesser (Polyscience) mit anti-CD3-Antikörpern beschichtet (s. **Abb. 41 b**). Es wurde nach dem in *Quintana et al. (2007)* beschriebenen Protokoll verfahren.

2.5.6 Fixierung, Permeabilisierung und Antikörper-Färbungen von T-Zellen

Zur Fixierung transfizierter Jurkat CD4⁺ T-Zellen (s. 2.4.2) (s. **Abb. 20, 28**) wurden etwa 20.000 Zellen auf Poly-L-Ornithin-beschichtete 18x18 mm Glas-Deckgläser (s. 2.5.1) aufgebracht, 5 min absetzen gelassen und vorsichtig gespült. Anschließend wurden die Zellen mit eiskaltem 2 % PFA in DPBS überschichtet und 20 min im Dunkeln bei Raumtemperatur (RT) inkubiert, bevor das PFA 5 min mit 0,1 M Glycin in DPBS neutralisiert und die Zellen mit DPBS gewaschen wurden. Anschließend wurden die Deckgläser in H₂O_{dest.} getaucht, möglichst viel Wasser vorsichtig entfernt und die Zellen auf Objektträgern mit Fixiermedium („ProLong gold“ mit oder ohne DAPI) eingebettet. Für diese Fixierungen wurde eine PFA-Konzentration von 2 % gewählt, um ein artifizielles Aufblähen von Mitochondrien zu vermeiden (s. *Qin et al. 2021*).

Zur Antikörper-Färbung permeabilisierter Jurkat CD4⁺ T-Zellen im Kontakt mit SEE-beladenen Raji B-Zellen (s. **Abb. 41 b ii**) wurden etwa 500.000 Jurkat J1.6 (s. 2.2.3) bzw. Jurkat E6.1 mit etwa 200.000 SEE-beladenen Raji B-Zellen (s. 2.5.4) vermischt, 60 min bei 37°C auf Deckgläsern inkubiert und, wie im Abschnitt zuvor, mit eiskaltem 4 % PFA in DPBS fixiert. Im Anschluss an die Fixierung wurden die Zellen 20 min mit 0,5 % Triton X-100 in DPBS und daraufhin 20 min mit 0,5 % Triton X-100 plus 2 % BSA in DPBS im Dunkeln bei RT permeabilisiert. Danach wurde 2 h mit 1:50 anti-Orai1 Primär-Antikörper (*Borke et al. 1989*) in 0,5 % TritonX/DPBS bei RT im Dunkeln inkubiert, mit 0,5 % TritonX/DPBS gewaschen und anschließend 45 min mit 1:100 anti-Kaninchen Sekundär-Antikörper, konjugiert mit Alexa⁵⁶⁸, bei RT im Dunkeln inkubiert. Nach weiteren Waschschritten mit 0,1 % TritonX/DPBS und DPBS wurden die Zellen auf einem Objektträger in Fixiermedium (ProLong gold) eingebettet. Diese Antikörper-Färbungen wurden von Dalia Alansary durchgeführt (s. *Quintana et al. 2011*).

2.6 Durchführung der mikroskopischen Experimente

Im folgenden Kapitel werden die Abläufe aller durchgeführten mikroskopischen Experimente beschrieben. Alle relevanten Experimentdaten sind in den **Tabellen 10-13** zusammengetragen. Die Berechnung der Nyquist-Kriterien wurde mithilfe des „Huygens Nyquist-Calculators“ (<https://svi.nl/NyquistCalculator>) durchgeführt.

2.6.1 Epi-Fluoreszenz Z-Stapel-Einzelzeitpunkt-Aufnahmen

In diesem Kapitel ist die Durchführung aller Epi-Fluoreszenz Einzelzeitpunkt-Aufnahmen aufgeführt, mit der Ausnahme zweier Experimentreihen, die in den Kapiteln 2.6.2.6 und 2.6.3.3 beschrieben sind.

2.6.1.1 Mehrfach-Färbung von HeLa- und T- Zellen

HeLa-Zellen, Jurkat CD4⁺ T-Zellen, naive CD8⁺ T-Zellen und SEA-stimulierte CD8⁺ T-Zellen wurden mit MitoTracker red, TubulinTracker green, CellMask deep red und Hoechst 33342 gefärbt (s. 2.5.2). Die mit

HeLa-Zellen überwachsenen Deckgläser wurden in einen Deckglas-Halter eingesetzt, mit Ringer-Lösung gespült und überschichtet und der Deckglas-Halter in die Temperatur-Kammer des Epi-Fluoreszenz-Mikroskops eingesetzt. Etwa jeweils 50.000 suspendierte T-Zellen wurden auf gereinigte Deckgläser bzw. Poly-L-Ornithin-beschichtete Deckgläser (s. 2.5.1) aufgebracht und 3 min absetzen gelassen. Die Deckgläser wurden anschließend in einen Halter eingesetzt, vorsichtig gespült und mit Ringer-Lösung überschichtet. Die Temperatur-Kammer und der Inkubator-Käfig des Mikroskops wurden vor Experimentbeginn auf 37°C vorgeheizt. Nach dem Einsetzen des jeweiligen Deckglas-Halters in die Temperatur-Kammer des Mikroskops wurde wenige Minuten der Temperatúrausgleich auf 37°C abgewartet. Als Objektiv wurde das „LCI Plan-Neofluar 63x Im korr 1,3“ (Zeiss) mit Wasser-Immersion (NA: 1,18) genutzt, dessen Korrektionsring mittels Test-Aufnahmen auf eine möglichst geringe sphärische Aberration im grünen Kanal etwa 5 µm oberhalb des Deckglases eingestellt wurde. Zur Separation der Fluoreszenzkanäle wurden Einzelband-Filtersätze und LEDs eingesetzt (Parameter in **Tabelle 10**). Die LEDs wurden ohne Notwendigkeit für einen „Shutter“ automatisch ein- und ausgeschaltet, die Filterwürfel befanden sich in einem motorisierten Karussell. Zur Hellfeldaufnahme wurde eine Durchlicht-LED und der Standard-Kondensor-Durchlichtmodus genutzt. Die Bildaufnahme geschah durch eine monochrome CCD-Kamera mit 6,45 µm Pixelgröße. Die Aufnahmebereiche wurden zufällig in möglichst gleichmäßig von Zellen bedeckten Bereichen der Deckgläser gesetzt. Je nach Zelltyp wurden zwischen 49 (naive CD8⁺), 61 (HeLa), 81 (Jurkat, stimulierte CD8⁺) und 101 (HeLa-Mitosen) Z-Stapel-Bilder aufgenommen. Dabei wurde der Z-Stapel zuerst für jeden Kanal vervollständigt, bevor der nächste Kanal aufgenommen wurde. (Ergebnisse siehe **Abbildungen 11, 12, 13, 14, 15, 19, 21, 22, 23, 25, 26, 27, 29, 31**)

2.6.1.2 Mehrfach-Färbung von ER-TagRFP-T-transfizierten HeLa-Zellen

Deckgläser mit ER-TagRFP-T-transfizierten HeLa-Zellen (s. 2.4.1) wurden mit CellMask deep red und Hoechst 33342 gefärbt (s. 2.5.2). Anschließend wurden transfizierte Zellen ausgewählt und wie in 2.6.1.1 verfahren (Parameter in **Tabelle 10**). (s. **Abb. 20 a**)

2.6.1.3 Antikörper-Inkubation und Mehrfach-Färbung von Jurkat CD4⁺ T-Zellen

Jurkat CD4⁺ T-Zellen wurden für 30 min bei Raumtemperatur mit anti-CD3-Alexa⁶⁴⁷-Antikörpern inkubiert (s. 2.5.3) und mit TubulinTracker green, Hoechst 33342 und CellMask orange gefärbt (s. 2.5.2). Anschließend wurde wie in 2.6.1.1 verfahren (Parameter in **Tabelle 10**). (s. **Abb. 29 b**)

2.6.1.4 Mehrfach-Transfektion und mitochondriale Fission in Jurkat CD4⁺ T-Zellen

Zur Untersuchung der Lokalisation von Mitochondrien bei artifiziell verstärkter mitochondrialer Fission wurden mit 2,5 µg mito-mCherry und 1 µg mem-EGFP transfizierte (s. 2.4.2) Jurkat-Kontrollzellen und zusätzlich mit 10 µg hDrp1 bzw. hFis1 transfizierte Jurkat-Zellen auf Poly-L-Ornithin-beschichtete Deckgläser (s. 2.5.1) aufgebracht, vorsichtig gespült und mit RPMI1640+FCS überschichtet. Nach der Auswahl transfizierter Zellen wurden im Hellfeld und der Fluoreszenz Z-Stapel-Bilder mit einem „Dualband“-Emissionsfilter (56HE) aufgenommen, mit Einzelband-Anregungsfiltern vor den passenden LEDs (Parameter in **Tabelle 10**). Dabei wurde zuerst jeder Kanal vor der Fokussierung in die nächste Z-Ebene aufgenommen. Ansonsten wurde wie in 2.6.1.1 verfahren. (s. **Abb. 28 b**)

Tabelle 10: Parameter aller Epi-Fluoreszenz Einzelzeitpunkt-Experimente.

Aufnahme	3D Epi-Fluoreszenz - Einzelzeitpunkt-Aufnahmen					
Experiment	Mehrfach-Färbung von HeLa- und T-Zellen	Mehrfach-Färbung von HeLa-Zellen	Mehrfach-Färbung von Jurkat CD4 ⁺ T-Zellen	Mitochondriale Fission in Jurkat CD4 ⁺ T-Zellen		Orai1 und STIM1 bei Jurkat-Raji-Kontakt
Kapitel	2.6.1.1; 3.1	2.6.1.2; 3.1.2.3	2.6.1.3; 3.1.2.6	2.6.1.4, 2.6.3.3; 3.1.2.5		2.6.2.6; 3.2.2.2
Abbildung	11, 12, 13, 14, 15, 19, 21, 22, 23, 25, 26, 27, 29, 31	20 a	29 b	28 b	28 a	41 b
Zellen	HeLa Jurkat CD4 ⁺ E6.1 naive CD8 ⁺ SEA-stimulierte CD8 ⁺	HeLa	Jurkat CD4 ⁺ E6.1	Jurkat CD4 ⁺ E6.1		Jurkat CD4 ⁺ E6.1 SEE-Raji
Zustand	lebend	lebend	lebend	lebend	fixiert	lebend
Medium	Ringer-Lösung	Ringer-Lösung	Ringer-Lösung	RPMI1640 FCS	ProLong gold	RPMI1640 FCS
Deckgläser	gereinigt Poly-L-Ornithin	gereinigt	gereinigt Poly-L-Ornithin	Poly-L-Ornithin	Poly-L-Ornithin	Poly-L-Ornithin
Temperatur	37°C	37°C	37°C	37°C	RT	37°C
Objektiv	63x Wasser NA 1,18	63x Öl NA 1,4	63x Wasser NA 1,18	63x Öl NA 1,4	100x Öl NA 1,45	40x Öl NA 1,3
Färbung	Hellfeld Hoechst 33342 TubulinTracker green MitoTracker red CellMask deep red	Hellfeld Hoechst 33342 3 µg ER-TagRFP-T CellMask deep red	Hellfeld Hoechst 33342 TubulinTracker green CellMask orange anti-CD3-Alexa647-AK	Hellfeld 1 µg mem-EGFP 2,5 µg mito-mCherry	Hellfeld DAPI 1 µg mem-EGFP 2,5 µg mito-mCherry	Hellfeld FURA-2 / NADH 2,5 µg Orai1-mEGFP 5µg STIM1-TagRFP-T
Belichtung	50 ms 100 ms 100 ms 100 ms 200-500 ms	50 ms 100 ms 500 ms 200 ms	50 ms 100 ms 100 ms 200 ms 200 ms	50 ms 100 ms 200-300 ms	50 ms 50 ms 150 ms 200-400 ms	50 ms 200 ms 200 ms 500 ms
Lichtquelle	Durchlicht-LED LED 365 LED 470 LED neutral weiß LED 625	Durchlicht-LED LED 365 LED neutral weiß LED 625	Durchlicht-LED LED 365 LED 470 LED neutral weiß LED 625	Halogen LED 470 LED n. weiß	Halogen LED 365 LED 470 LED n. weiß	Durchlicht-LED LED 365 LED 470 LED neutral weiß
Filter	DAPI HE GFP (38HE) DsRed (46HE) Cy5 HE	DAPI HE DsRed (46HE) Cy5 HE	DAPI HE GFP (38HE) DsRed (46HE) Cy5 HE	GFP/DsRed (56HE): Dualband-Emission, Einzel-Anregung.	DAPI HE GFP (38HE) TxRed HE	GFP/DsRed (56HE): Dualband-Emission, Einzel-Anregung. + UV-Ex. (DAPI HE)
Kamera	monochrome CCD (6,45 µm Pixel)					
Bildgröße	1388x1044 Pixel ohne binning	variabel ohne binning	1388x1044 Pixel ohne binning	1388x1044 Pixel ohne binning	variabel ohne binning	1388x1044 Pixel ohne binning
Pixelgröße	102,3 nm	102,3 nm	102,3 nm	102,3 nm	64,5 nm	161 nm
Z-Abstand	250 nm	250 nm	250 nm	250 nm	200 nm	313 nm
Z-Ebenen	49-101	61	81	81	81	51
Nyquist (Em: 520nm)	XY: 110 nm Z: 367 nm	XY: 92 nm Z: 277 nm	XY: 110 nm Z: 367 nm	XY: 92 nm Z: 277 nm	XY: 89 nm Z: 241 nm	XY: 100 nm Z: 352 nm

2.6.2 Epi-Fluoreszenz Zeitrafferaufnahmen von T- und B-Zellen

In diesem Kapitel wird die Durchführung aller Zeitrafferaufnahmen beschrieben. Beim Einsatz von „Multiband“-Filtersätzen wurden die zum Filtersatz gehörenden Einzelband-Anregungsfilter vor die passenden LEDs der Lichtquelle „Colibri“ geschraubt bzw. in die Lichtquelle „Sutter DG-4“ eingesetzt.

2.6.2.1 Z-Stapel-Zeitrafferaufnahmen von Lifeact-mEGFP-transfizierten „Bead“-stimulierten CD8⁺ T-Zellen

Etwa 50.000 mit 2 µg Lifeact-mEGFP transfizierte Bead-stimulierte CD8⁺ T-Zellen (s. 2.4.3) wurden auf Poly-L-Ornithin-beschichtete Deckgläser (s. 2.5.1) aufgebracht, 5 min absetzen gelassen, vorsichtig gespült und mit AIM-V+FCS überschichtet. Anschließend wurden die Deckgläser in die auf 37°C vorgewärmte Temperatur-Kammer des Epi-Fluoreszenz-Mikroskops eingesetzt und wenige Minuten der Temperaturlausgleich abgewartet. Einzelne transfizierte Zellen wurden ausgewählt und alle 5 Sekunden als Fluoreszenz-Z-Stapel aufgenommen (Parameter in **Tabelle 11-1**). (s. **Abb. 16 b c, 17, 42**)

Tabelle 11-1: Parameter aller mikroskopischen Zeitraffer-Experimente 1/2.

Aufnahme	Epi-Fluoreszenz Zeitrafferaufnahmen von lebenden Zellen TEIL 1 von 2				
	Aktin-Färbung CD8 ⁺ T-Zellen	γ -Tubulin-Färbung CD8 ⁺ T-Zellen	Vesikel-Tracking CD8 ⁺ T-Zellen	Mitochondrien-Färbung SEA-stimulierte CD8 ⁺ - SEA Raji	
Kapitel	2.6.2.1; 3.1.2.1	2.6.2.2; 3.1.2.4, 3.2.1.1	2.6.2.3; 3.1.2.6	2.6.2.4; 3.2.1.2	
Abbildung	16 b c, 17, 42	24, 32, 42	30, 42	33 a, 42	33 b
Zellen	Bead-stimulierte CD8 ⁺ T-Zellen	SEA-stimulierte CD8 ⁺ T-Zellen	Bead-stimulierte CD8 ⁺ T-Zellen	SEA-stimulierte CD8 ⁺ T-Zellen SEA-Raji	
Medium	AIM-V + FCS	AIM-V + FCS	AIM-V	AIM-V + FCS	
Deckgläser	Poly-L-Ornithin	Poly-L-Ornithin	Poly-L-Ornithin	Poly-L-Ornithin	
Temperatur	37°C	37°C	25°C	37°C	
Zeitraum T	4-12 min	40-45 min	3-10 min	4-12 min	60-300 min
Δt	5 s	157 s	3 - 5,8 s	20 s	5 s
Objektiv	100x Öl NA 1,45	40x Öl NA 1,3	100x Öl NA 1,45	100x Öl NA 1,45	40x Öl NA 1,3
Färbung	2 μ g Lifeact-mEGFP	Hellfeld 1 μ g γ -Tubulin-EGFP	anti-CD3-Alexa488-AK 2,5 μ g Perforin-mCherry	Hellfeld 1,5 μ g mito-EGFP + Calcein	Hellfeld FURA-2 MitoTracker red
Belichtung	20-70 ms	50 ms 100-200 ms	20 ms 50 ms	20 ms 30 ms	20 ms 50 ms / 50 ms 50 ms
Lichtquelle	LED 470	Halogen LED 470	LED 470 LED neutral weiß	Durchlicht-LED LED 470	Durchlicht-LED DG-4 340/380 (21HE) DG-4 560 (56HE)
Filter	GFP (38HE)	GFP (38HE)	GFP/DsRed (56HE): Dualband-Emission, Einzelband-Anregung.	GFP (38HE)	GFP/DsRed (56HE): Dualband-Emission, Einzelband-Anregung. + FURA-2-Anregung (21HE)
Kamera	CCD (6,45 μ m Pixel)	CCD (6,45 μ m Pixel)	back-illuminated EMCCD (16 μ m Pixel)	back-illuminated EMCCD (16 μ m Pixel)	back-illuminated EMCCD (16 μ m Pixel)
Bildgröße	200x200 Pixel 2x2 binning	1388x1044 Pixel ohne binning	100x100 / 150x150 Pixel ,gain': 100x-200x	256x256 Pixel ohne ,gain'	512x512 Pixel ,gain': 100x-200x
Pixelgröße	129 nm	161 nm	160 nm	160 nm	400 nm
Z-Abstand	300-1000 nm	300 nm	500 nm	250 nm	kein Z-Stapel
Z-Ebenen	20-60	25-36	30	61	kein Z-Stapel
Nyquist (Em: 520nm)	XY: 89 nm Z: 241 nm	XY: 100 nm Z: 352 nm	XY: 89 nm Z: 241 nm	XY: 89 nm Z: 241 nm	XY: 100 nm

2.6.2.2 Z-Stapel-Zeitrafferaufnahmen von γ -Tubulin-EGFP-transfizierten SEA-stimulierten CD8⁺ T-Zellen

Etwa 50.000 mit 1 μ g γ -Tubulin-EGFP transfizierte SEA-stimulierte CD8⁺ T-Zellen (s. 2.4.3) wurden wie in 2.6.2.1 vorbereitet. Anschließend wurden mit SEA beladene Raji B-Zellen (s. 2.5.4) dazu pipettiert. Die Aufnahme geeigneter Bereiche wurde vor oder nach dem Absinken der Raji-Zellen begonnen (Parameter in **Tabelle 11-1**). Der Z-Stapel des Hellfeldkanals wurde zuerst vervollständigt, bevor der Fluoreszenz-Z-Stapel aufgenommen wurde. Diese Aufnahmen wurden ohne die spezielle schnelle Bildaufnahme des Mikroskops mittels USB-Datenübermittlung und über eine Experimentlänge von 40-45 Minuten 15x-18x wiederholt. Dies führte zu einem Zeitabstand von 21 Sekunden zwischen den Hellfeld- und Fluoreszenz-Z-Stapeln und 157 Sekunden zwischen den Gesamt-Aufnahmezeitpunkten. (s. **Abb. 24, 32, 42**)

2.6.2.3 Z-Stapel-Zeitrafferaufnahmen von Vesikeln in „Bead“-stimulierten CD8⁺ T-Zellen

Mit 2,5 μ g Perforin-mCherry transfizierte Bead-stimulierte CD8⁺ T-Zellen (s. 2.4.3) wurden 30 min mit anti-CD3-Alexa⁴⁸⁸-Antikörpern bei 37°C inkubiert (s. 2.5.3). Die Zellen wurden wie in 2.6.2.1 vorbereitet, aber ohne FCS im Kulturmedium und mit 25°C Inkubations-Temperatur. Einzelne transfizierte Zellen wurden ausgewählt und Fluoreszenz-Z-Stapel-Aufnahmen mittels einer „back-illuminated“ „Electron

Multiplifier“ (EM)CCD-Kamera (0,16 µm Pixelgröße) mit einer EM-Verstärkung („gain“) von 100x-200x und einem Bildausschnitt von 100x100 bzw. 150x150 Pixeln erstellt (Parameter in **Tabelle 11-1**). Dabei wurden beide Fluoreszenzkanäle vor der Fokussierung in die nächste Z-Ebene aufgenommen. Die Aufnahme wurde so schnell wie möglich wiederholt. (s. **Abb. 30, 42**)

2.6.2.4 Zeitrafferaufnahmen von Mitochondrien in SEA-stimulierten CD8⁺ T-Zellen im Kontakt mit SEA-beladenen Raji B-Zellen

Etwa 50.000 mit 1,5 µg mito-EGFP transfizierte SEA-stimulierte CD8⁺ T-Zellen (s. 2.4.3) wurden wie in 2.6.2.1 vorbereitet. Anschließend wurden mit Calcein gefärbte (s. 2.5.2) und mit SEA beladene (s. 2.5.4) Raji B-Zellen dazu pipettiert. Nach der Identifikation von T-Zell-B-Zell-Kontakten wurden Hellfeld- und Fluoreszenz-Z-Stapel mit einer „back-illuminated“ EMCCD-Kamera ohne EM-Verstärkung („gain“) und einem Bildausschnitt von 256x256 Pixeln alle 20 Sekunden erstellt (Parameter in **Tabelle 11-1**). Dabei wurden beide Kanäle vor der Fokussierung in die nächste Z-Ebene aufgenommen. (s. **Abb. 33 a, 42**)

Etwa 50.000 mit MitoTracker red und FURA-2 gefärbte (s. 2.5.2) SEA-stimulierte CD8⁺ T-Zellen (s. 2.2.4.4) wurden wie in 2.6.2.1 vorbereitet und passende Aufnahmebereiche ausgewählt. Anschließend wurden mit FURA-2 gefärbte (s. 2.5.2) und mit SEA beladene (s. 2.5.4) Raji B-Zellen dazu pipettiert. Alle 5 Sekunden wurde eine einzelne Z-Ebene für Hellfeld, FURA-2 mit 340 nm bzw. 380 nm Anregung und MitoTracker red mit einer „back-illuminated“ EMCCD-Kamera („gain“: 100x-200x) und mit vollem Bildausschnitt (512x512 Pixel) aufgenommen, über Zeiträume von 60 bis 300 Minuten (Parameter in **Tabelle 11-1**). (s. **Abb. 33 b**)

2.6.2.5 Zeitrafferaufnahmen von mehrfach-gefärbten SEA-stimulierten CD8⁺ T-Zellen im Kontakt mit SEA-beladenen Raji B-Zellen an Pipetten

Etwa 50.000 mit 1 µg α-Tubulin-EGFP und 2,5 µg Perforin-mCherry transfizierte SEA-stimulierte CD8⁺ T-Zellen (s. 2.4.3) wurden wie in 2.6.2.1 vorbereitet. Etwa 5.000 SEA-beladene Raji B-Zellen (s. 2.5.4) wurden zusätzlich mit TMRM und Calcein gefärbt (s. 2.5.2) und auf einen freien Bereich des Deckglases dazu pipettiert. Zur Vermeidung von Evaporation und pH-Wechsel wurde das Kulturmedium mit Paraffin überschichtet. Nun wurde eine B-Zelle mit einer an einem Mikromanipulator befestigten Mikropipette (Öffnungs-Durchmesser: ca. 2 µm) angesaugt und an der Pipette befestigt. Anschließend wurde eine transfizierte T-Zelle ausgewählt, die beiden Zellen in Kontakt gebracht und sofort die Aufnahme einzelner Z-Ebenen in allen Kanälen begonnen (Parameter in **Tabelle 11-2**). (s. **Abb. 34, 37, 42**)

2.6.2.6 Z-Stapel-Zitrafferaufnahmen von mehrfach-gefärbten SEA-stimulierten CD8⁺ T-Zellen im Kontakt mit SEA-beladenen Raji B-Zellen

Etwa 50.000 mit 1 µg γ-Tubulin-EGFP und 2,5 µg Lifeact-mRFPruby transfizierte SEA-stimulierte CD8⁺ T-Zellen (s. 2.4.3) wurden 30 min mit anti-CD3-Alexa⁶⁴⁷-Antikörpern bei 37°C inkubiert (s. 2.5.3) und wie in 2.6.2.1 vorbereitet. Etwa 5.000 mit FURA-2 gefärbte (s. 2.5.2) und mit SEA beladene Raji B-Zellen (s. 2.5.4) wurden dazu pipettiert und bevorstehende Kontakte zwischen transfizierten T-Zellen und B-Zellen für die Z-Stapel-Zitrafferaufnahme von Hellfeld und Fluoreszenz ausgewählt (Parameter in **Tabelle 11-2**). Dabei wurden zuerst alle Kanäle pro Z-Ebene aufgenommen. (s. **Abb. 35, 36, 37, 42**)

Tabelle 11-2: Parameter aller mikroskopischen Zeitraffer-Experimente 2/2.

Aufnahme	Epi-Fluoreszenz Zeitrafferaufnahmen von lebenden Zellen TEIL 2 von 2			
Experiment	Mehrfach-Färbung SEA-stimulierte CD8 ⁺ - SEA-Raji		Mehrfach-Färbung Jurkat CD4 ⁺ - Raji	
Kapitel	2.6.2.5; 3.2.1.3	2.6.2.6; 3.2.1.3	2.6.2.7; 3.2.2	
Abbildung	34, 37, 42	35, 36, 37, 42	38, 39, 40, 41 b, 42	41 a
Zellen	SEA-stimulierte CD8 ⁺ T-Zellen SEA-Raji		Jurkat CD4 ⁺ E6.1 SEE-Raji	
Medium	AIM-V + FCS		RPMI1640 + FCS	
Deckgläser	Poly-L-Ornithin		Poly-L-Ornithin	
Temperatur	37°C		37°C	
Zeitraum T	30-60 min	20-30 min	60 min	
Δ t	10 s	30 s	60 s	120 s
Objektiv	100x Öl NA 1,45	100x Öl NA 1,45	40x Öl NA 1,3	
Färbung	Hellfeld 1 µg α-Tubulin-EGFP 2,5 µg Perforin-mCherry	Hellfeld FURA-2 / NADH 1 µg γ-Tubulin-EGFP 2,5 µg Lifeact-mRFPPruby anti-CD3-Alexa647-AK	Hellfeld FURA-2 / NADH 5 µg Orai1-mEGFP 5 µg Lifeact-mRFPPruby anti-CD3-Alexa647-AK	Hellfeld FURA-2 / NADH 2,5 µg Orai1-mEGFP 5 µg STIM1-TagRFP-T
Belichtung	50 ms 50-100 ms 200-500 ms	50 ms 100 ms 100 ms 150 ms 100 ms	50 ms 100 ms 100 ms 100 ms 200 ms 100 ms	50 ms 100 ms 100 ms 100 ms 250 ms
Lichtquelle	Durchlicht-LED LED 470 LED neutral weiß	Durchlicht-LED LED 365 LED 470 LED neutral weiß LED 625	Durchlicht-LED LED 365 LED 470 LED neutral weiß LED 625	Durchlicht-LED LED 365 LED 470 LED neutral weiß
Filter	GFP/DsRed (56HE): Dualband-Emission, Einzelband-Anregung	Quadband HC: Quadband-Emission, Einzelband-Anregung.	Quadband HC: Quadband-Emission, Einzelband-Anregung.	GFP/DsRed (56HE): Dualband-Emission, Einzelband-Anregung. + UV-Anregungsfilter (DAPI HE)
Kamera	CCD (6,45 µm Pixel)	CCD (6,45 µm Pixel)	CCD (6,45 µm Pixel)	CCD (6,45 µm Pixel)
Bildgröße	variabel 2x2 binning	variabel 3x3 binning	1388x1044 Pixel 2x2 binning	
Pixelgröße	129 nm	193,5 nm	323 nm	
Z-Abstand	kein Z-Stapel	250-300 nm	500 nm	
Z-Ebenen	kein Z-Stapel	35-61	51	
Nyquist (Em: 520nm)	XY: 89 nm	XY: 89 nm Z: 241 nm	XY: 100 nm Z: 352 nm	

2.6.2.7 Z-Stapel-Zeitrafferaufnahmen von mehrfach-gefärbten Jurkat CD4⁺ T-Zellen im Kontakt mit SEE-beladenen Raji B-Zellen

Mit 5 µg Orai1-mEGFP und 5 µg Lifeact-mRFPPruby transfizierte Jurkat CD4⁺ T-Zellen (s. 2.4.2) wurden 30 min mit anti-CD3-Alexa⁶⁴⁷-Antikörpern bei Raumtemperatur inkubiert (s. 2.5.3). Etwa 50.000 dieser Zellen wurden wie in 2.6.2.1 mit RPMI1640+FCS vorbereitet und geeignete Bildausschnitte ausgewählt. Anschließend wurden etwa 5.000 mit FURA-2 gefärbte (s. 2.5.2) und mit SEE beladene Raji B-Zellen (s. 2.5.4) oder etwa 10.000 mit anti-CD3-Antikörpern beschichtete 5,8 µm „Beads“ (s. 2.5.5) dazu pipettiert und nach deren Absinken die Aufnahmen mit vollem Bildausschnitt durchgeführt (Parameter in **Tabelle 11-2**). Dabei wurden zuerst alle Kanäle pro Z-Ebene aufgenommen. (s. **Abb. 38, 39, 40, 41 b, 42**)

Mit 2,5 µg Orai1-mEGFP und 5 µg STIM1-TagRFP-T transfizierte Jurkat CD4⁺ T-Zellen (s. 2.4.2) wurden ohne Antikörper-Inkubation wie im Abschnitt zuvor in Kontakt mit FURA-2-gefärbten und SEE-beladenen Raji B-Zellen gebracht und wie zuvor aufgenommen (Parameter in **Tabelle 11-2**). Der eingesetzte Dualband-Filtersatz (Zeiss 56HE) ermöglichte die spezifische UV-Anregung und Grün-Detektion von FURA-2. (s. **Abb. 41 a**)

Neben einer Experimentreihe als Zeitrafferaufnahme wurden 6 weitere Experimente als Einzelzeitpunkt-Aufnahmen ohne Kamera-„Binning“ 60 Minuten nach Zugabe der SEE-beladenen Raji B-Zellen durchgeführt (Parameter in **Tabelle 10**). (s. **Abb. 41 b**)

2.6.3 Laser-Scanning-Mikroskopie (LSM)-Z-Stapel-Aufnahmen von Zellen

2.6.3.1 LSM-Z-Stapel-Aufnahmen von lebenden Lifact-mEGFP-transfizierten HeLa-Zellen

Deckgläser mit darauf wachsenden Lifact-mEGFP-transfizierten HeLa-Zellen (s. 2.4.1) wurden mit Ringer-Lösung gespült und überschichtet, bei Raumtemperatur in das Laser-Scanning-Mikroskop (LSM 710) eingesetzt und transfizierte Zellen abgescannt (Parameter in **Tabelle 12**). (s. **Abb. 16 a**)

2.6.3.2 LSM-Z-Stapel-Aufnahmen von fixierten ER-TagRFP-T-transfizierten Jurkat T-Zellen

Mit 2,5 µg ER-TagRFP-T transfizierte Jurkat CD4⁺ T-Zellen (s. 2.4.2) wurden fixiert (s. 2.5.6) und in Fixiermedium („ProLong gold“) auf einem Objektträger eingebettet. Nach der Trocknung wurde der Objektträger in das Laser-Scanning-Mikroskop (LSM 710) eingesetzt und transfizierte Zellen abgescannt (Parameter in **Tabelle 12**). (s. **Abb. 11, 20 b**)

2.6.3.3 Z-Stapel-Aufnahmen von fixierten hDrp1- und hFis1-transfizierten Jurkat T-Zellen

Zur Untersuchung der Mitochondrien-Fission wurden Jurkat-Kontrollzellen mit 2,5 µg mito-mCherry und 1 µg mem-EGFP oder nur 2 µg mito-mTFP1 transfiziert. Weitere Jurkat-Zellen wurden zusätzlich mit jeweils 10 µg hDrp1 bzw. hFis1 Plasmiden transfiziert (s. 2.4.2).

Nach Fixierung (s. 2.5.6) wurden die mit mito-mCherry und mem-EGFP transfizierten Zellen in „ProLong gold mit DAPI“ eingebettet und nach der Trocknung mit dem Epi-Fluoreszenz-Mikroskop wie in 2.6.1 aufgenommen (Parameter in **Tabelle 10**). (s. **Abb. 28 a i**)

Die Zellen mit mito-mTFP1-Transfektion wurden in DAPI-freiem „ProLong gold“ eingebettet und mit dem Laser-Scanning-Mikroskop (LSM 710) abgescannt (Parameter in **Tabelle 12**). (s. **Abb. 11, 28 a ii iii**)

Tabelle 12: Parameter aller Laser-Scanning-Mikroskopie (LSM)-Einzelzeitpunkt-Experimente.

Aufnahme	3D Laser-Scanning-Mikroskopie (Zeiss LSM 710)			
Experiment	Aktin-Färbung - HeLa	ER-RFP - Jurkat CD4 ⁺	Mitochondriale Fission - Jurkat	Jurkat CD4 ⁺ - SEE-Raji
Kapitel	2.6.3.1; 3.1.2.1	2.6.3.2; 3.1.2.3	2.6.3.3; 3.1.2.5	2.6.3.4; 3.2.2.2
Abbildung	16 a	11, 20 b	11, 28 a ii iii	41 b
Zellen	HeLa	Jurkat CD4 ⁺ E6.1	Jurkat CD4 ⁺ E6.1	Jurkat CD4 ⁺ E6.1 und SEE-Raji -- konjugiert
Zustand	lebend	fixiert	fixiert	fixiert und permeabilisiert
Medium	Ringer-Lösung	ProLong gold	ProLong gold	ProLong gold
Deckgläser	gereinigt	Poly-L-Ornithin	Poly-L-Ornithin	Poly-L-Ornithin
Objektiv	40x Öl NA 1,3	100x Öl NA 1,45	100x Öl NA 1,45	63x Glyzerin NA 1,3
Färbung	2 µg Lifact-mEGFP	2,5 µg ER-TagRFP-T	2 µg mito-mTFP1	anti-Orai1 -- sekundär-AK-Alexa568
Laser	488 nm	565 nm	488 nm	565 nm
Pinhole	1 AU	3 AU	3 AU	3 AU
Pixelgröße	130 nm	60 nm	60 nm	100 nm
Bildgröße	variabel			
Z-Abstand	450 nm	200 nm	200 nm	250 nm
Z-Ebenen	19	50-70	50-70	25-40
Dekonvolution	nein	ja	ja	ja
Nyquist (Laser, 0 AU)	XY: 46 nm Z: 165nm	XY: 48 nm Z: 131 nm	XY: 42 nm Z: 113 nm	XY: 54 nm Z: 182 nm

2.6.3.4 LSM-Z-Stapel-Aufnahmen von fixierten, permeabilisierten und anti-Orai1-Antikörper-inkubierten Jurkat-Raji-Kontakten

Zur Untersuchung der Orai1-Lokalisation wurden die zuvor fixierten, permeabilisierten und Antikörpergefärbten Jurkat-Raji-Kontakte (s. 2.5.6) mit dem Laser-Scanning-Mikroskop (LSM 710) abgescannt. Dafür wurde das Objektiv „LCI 63x Im korr“ mit Glyzerin als Immersion genutzt, dessen Korrekptionsring auf einen Abstand von etwa 3 µm vom Deckglas optimiert wurde (Parameter in **Tabelle 12**). (s. **Abb. 41 b**)

2.6.4 „Total Internal Reflection Fluorescence“ (TIRF)-Aufnahmen von T-Zellen

2.6.4.1 TIRF-Zeitrafferaufnahmen von migrierenden Lifact-mEGFP-transfizierten Bead-stimulierten CD8⁺ T-Zellen

Etwa 50.000 mit 1,5 µg Lifact-mEGFP transfizierte Bead-stimulierte CD8⁺ T-Zellen (s. 2.4.3) wurden auf Fibronektin-beschichtete Deckgläser (s. 2.5.1) aufgebracht, 15 min absetzen gelassen, vorsichtig gespült und mit AIM-V+FCS überschichtet. Anschließend wurde die Kammer mit den Zellen in das TIRF-Mikroskop bei Raumtemperatur eingesetzt. Einzelne transfizierte Zellen wurden ausgewählt und anschließend alle 5 Sekunden Epi-Fluoreszenz- (Monochromator), TIRF- (488 nm Laser) und Hellfeld-Bilder mit einer „front-illuminated“ EMCCD-Kamera (0,13 µm Pixelgröße) mit 150x ‚gain‘ aufgenommen (Parameter in **Tabelle 13**). Die TIRF-Einstellungen des Lasers wurden zuvor manuell kalibriert (siehe *Quintana et al. 2007*). (s. **Abb. 18**)

2.6.4.2 TIRF-Zeitrafferaufnahmen von Orai1-mEGFP- und STIM1-TagRFP-T-transfizierten Jurkat CD4⁺ T-Zellen auf anti-CD3-Antikörper-beschichteten Deckgläsern

Etwa 50.000 mit 2,5 µg Orai1-mEGFP und 5 µg STIM1-TagRFP-T transfizierte Jurkat CD4⁺ T-Zellen (s. 2.4.2) wurden auf anti-CD3-Antikörper-beschichtete (s. 2.5.1) und mit Ringer-Lösung plus 1 µM Thapsigargin überdeckte Deckgläser, die sich bereits im Mikroskop befanden, dazu pipettiert. Ein Bereich mit transfizierten Zellen wurde ausgewählt und auf das Deckglas fokussiert. Die Aufnahmen wurden gestartet, nachdem die Zellen das Deckglas berührten. Dabei wurden alle 60 Sekunden Einzelbilder mit einer „front-illuminated“ EMCCD Kamera mit 150x ‚gain‘ im TIRF mit dem 561 nm Laser und dem abgeschwächten 488 nm Laser, zeitgleich mittels „Dual-View“ Kamera-Splitter mit 555 nm Strahlteiler, und anschließend im Hellfeld aufgenommen (Parameter in **Tabelle 13**). Die TIRF-Einstellungen beider Laser wurden zuvor manuell kalibriert (s. 2.6.4.1; *Quintana et al. 2009; Qu et al. 2011*). (s. **Abb. 41 c**)

Tabelle 13: Parameter aller TIRF-Experimente.

Aufnahme	TIRF (Olympus, Ute Becherer)	
	Experiment	Orai1 - STIM1 Jurkat CD4 ⁺ T-Zellen
Kapitel	2.6.4.1; 3.1.2.1	2.6.4.2; 3.2.2.2
Abbildung	18	41 c
Zellen	Bead-stimulierte CD8 ⁺ T-Zellen	Jurkat CD4 ⁺ E6.1
Medium	AIMV + FCS	Ringer-Lösung
Deckgläser	Fibronektin	anti-CD3-AK Beschichtung
Temperatur	RT	RT
Zeitraum T	30 min	60 min
Δ t	5 s	60 s
Objektiv	100x Öl NA 1,45	100x Öl NA 1,45
Färbung	Hellfeld 2 µg Lifact-mEGFP	Hellfeld 2,5 µg Orai1-mEGFP 5 µg STIM1-TagRFP-T
Belichtung	100 ms	50 ms 100 ms 100 ms
Lichtquelle	Halogen Monochromator 488 nm Laser	Halogen Monochromator 488 nm Laser 561 nm Laser
Filter	GFP	GFP/DsRed Dual-Emission Kamera-Strahlteiler: GFP/DsRed
Kamera	front-illuminated EMCCD (13 µm Pixel)	
Bildgröße	512x512 ohne binning, ‚gain‘: 150x	
Pixelgröße	130 nm	
Nyquist (Em: 520nm)	XY: 89 nm	

2.6.5 Allgemeine Versuchs-Prozeduren

Bei Versuchen mit Z-Stapel-Aufnahmen wurden „PS Speck Kit Beads“ (\varnothing 170 nm) oder „FluoSpheres“ (\varnothing 200 nm) der entsprechenden Kanal-Fluoreszenz (s. 2.5.1) mit den jeweiligen Versuchsbedingungen (Z-Abstand: 0,1 μ m) zur Erstellung von „Point-Spread-Functions“ (PSFs) aufgenommen (s. 2.7.2).

Bei Versuchen mit mehreren Fluoreszenzkanälen wurden „TetraSpeck Beads“ mit 500 nm Durchmesser (s. 2.5.1) mit den jeweiligen Versuchsbedingungen aufgenommen, um durch optische Fehler auftretende räumliche Verschiebungen zwischen den Kanälen auszugleichen (s. 2.7.1).

Bei Experimenten mit „Dualband“- oder „Quadband“-Filtersätzen wurden Referenzmessungen mit den einzelnen Farbstoffen bei den jeweiligen Versuchsbedingungen aufgenommen, um Signal-Einstreuungen zwischen mehreren Fluoreszenzkanälen herauszurechnen (s. 2.7.1).

2.7 Bildbearbeitung

2.7.1 Bild-Korrektur

Bei Experimenten mit „Dualband“- oder „Quadband“-Filtern wurden die Kanäle mithilfe von Referenz-Aufnahmen, bei denen immer nur ein Farbstoff vorhanden war, aber dennoch alle Fluoreszenzkanäle aufgenommen wurden (s. 2.6.5), mit dem Modul „Multichannel Unmixing“ der Software „AxioVision“ (Zeiss) entmischt. Dies war notwendig, da beispielsweise bei der Anregung eines grün-fluoreszierenden Farbstoffs ebenfalls vorhandene rot-fluoreszierende Farbstoffe mitangeregt werden und ein Dualband-Emissionsfilter beide Signale gleichzeitig passieren lässt.

Bei allen Experimenten mit mehreren Fluoreszenzkanälen wurden vierfach-gefärbte 500 nm „TetraSpeck Beads“ als Referenz-Messungen aufgenommen. Mithilfe dieser Aufnahmen wurden die Fluoreszenzkanäle räumlich kalibriert. Die Kalibrierung in der Z-Dimension wurde mithilfe des Deckglases vereinfacht.

2.7.2 Dekonvolution

Alle Z-Stapel-Fluoreszenzaufnahmen mit Ausnahme einer LSM-Aufnahme (s. 2.6.3.1) wurden mithilfe von iterativer Dekonvolution deutlich in der Auflösung und dem Kontrast verbessert. Mit Ausnahme des Hoechst 33342-Kanals (UV, DAPI HE) in 2.6.1.1 und 2.6.1.3 wurde zur Generierung der jeweiligen „Point-Spread-Function“ (PSF) eine Referenzaufnahme von „PS Speck Kit Beads“ der jeweiligen Kanalfarbe angelegt und die PSF mit dem Modul „3D Dekonvolution“ der Zeiss Analysesoftware „AxioVision“ oder dem „PSF Distiller Wizard“ des Programms „Huygens Essentials“ (SVI), mit Angabe der Deckglas-Position und einem Signal-zu-Rauschen-Verhältnis von 40-100, erstellt. Zur Dekonvolution der Hoechst 33342-Aufnahmen in 2.6.1.1 und 2.6.1.3 wurde eine theoretische PSF durch Angabe der jeweiligen Experiment-Parameter mit dem Programm „Huygens Essentials“ berechnet.

Alle Laser-Scanning-Mikroskop-Z-Stapel-Aufnahmen von fixierten Zellen und die Epi-Fluoreszenz-Z-Stapel-Aufnahmen in 2.6.1.4, 2.6.2.1, 2.6.2.2 und 2.6.3.3 wurden mit der Software AxioVision mit dem höchsten Qualitäts-Modus „iterativ“ des Moduls „3D Dekonvolution“ („maximum-likelihood-estimation“) über 50 Iterationen mit der höchsten Stärke und experimentell-bestimmten PSFs dekonvoluiert.

Alle übrigen Epi-Fluoreszenz-Z-Stapel-Aufnahmen wurden mit der Software „Huygens Essentials“ iterativ („maximum-likelihood-estimation“) dekonvoluiert. Die Parameter der Software waren: automatische Hintergrundbestimmung, maximal 500 Iterationen, „Quality Threshold“ 0,001 %, „Classic“ Modus und „One Brick“ (wenn möglich). Das Signal-zu-Rauschen Verhältnis wurde bei der Nutzung experimenteller PSFs auf 100-200, bei theoretischen PSFs auf 50 eingestellt.

2.7.3 Bild-Darstellung

Zur Darstellung in Abbildungen und Filmen wurden die dekonvoluierten und korrigierten Z-Stapel-Aufnahmen je nach Signal und Kanal in der Helligkeit und dem Kontrast eingestellt. Bei manchen Kanälen wurde der Gammawert für die Darstellung angepasst. Bei Auswahl einzelner Fokusebenen wurden sogenannte „Schnittansichten“ genutzt, mit jeweils einer XY-, XZ- und YZ-Ebene, deren Position in Z-Stapeln durch weiße Striche bzw. Punkte angezeigt wird. Zur Anzeige aller Ebenen des Z-Stapels wurden die einzelnen Ebenen in den XY-, XZ- und YZ-Richtungen als „Maximal-Intensitäts-Projektion“ (MIP) zusammengelegt, bei der immer der hellste Pixel aller Ebenen angezeigt wird. In manchen Abbildungen wurden nur vereinzelte Ebenen als MIP zusammengelegt. Diese sind in Abbildungen des Ergebnisteils als „Schnitt-MIP“ gekennzeichnet und die jeweiligen Ebenen durch weiß-gepunktete Rechtecke markiert.

Bei Volumenmessungen werden im Ergebnisteil dreidimensional rekonstruierte („gerenderte“) Graphiken gezeigt (s. **Abb. 31 a**), die mit den jeweiligen Z-Stapeln und dem Modul „Inside 4D“ der Software „AxioVision“ (Zeiss) angefertigt wurden. Bei mehreren Zelltypen in einer Graphik wurde der Z-Stapel für die Beispielgraphik zuvor mit der Software „ImageJ“ zusammengesetzt.

Zeitrafferaufnahmen wurden zusätzlich mit der Software „AxioVision v.4.8“ als „Windows AVI“ Filme angelegt und mit der Software „ImageJ“ zusammengesetzt. Diese AVI-Filme sind im Ergebnisteil über öffentliche Verlinkungen und per „QR-Codes“ auf der Online-Festplatte „Dropbox“ abrufbar (s. **6.4**).

2.8 Auswertung

2.8.1 Bestimmung prozentualer Anteile

2.8.1.1 Ausbreitung von T-Zellen über Deckgläser

Um den Anteil von T-Zellen zu bestimmen, die 5 bzw. 30 Minuten nach dem Absetzen auf Deckgläsern über diese ausgebreitet waren (s. **Abb. 15**), wurden zunächst alle vitalen Zellen in den Versuchen aus 2.6.1.1 zum jeweiligen Zeitpunkt gezählt. Anschließend wurde jede gezählte Zelle in der XZ-Schnittansicht der Plasmamembran-Färbung auf ihre Form hin untersucht. Befand sich der breiteste Teil der Zelle am Deckglas, galt diese Zelle als auf dem Deckglas ausgebreitet. Wies dieselbe Zelle zusätzlich in der XY-Ansicht die Migrationsform auf (s. *Barreiro et al. 2007*), galt sie als „gestreckt“.

2.8.1.2 Organell-Lokalisationsanalysen in HeLa- und T-Zellen

Alle vitalen Zellen in den dekonvoluierten und bearbeiteten Aufnahmen aus 2.6.1.1 wurden gezählt und auf die jeweilige Organell-Lokalisation untersucht. Alle T-Zellen wurden in die in Kapitel 3.1.1 definierten Zellformen eingeteilt. Mitotische Zellen wurden mittels Tubulin- und dDNS- Färbung identifiziert.

2.8.1.3 Zentrosom-Dynamik in SEA-stimulierten CD8⁺ T-Zellen im Kontakt mit SEA-beladenen Raji B-Zellen und Auftreten apoptotischer „Blebs“ bei Raji

γ -Tubulin-EGFP-exprimierende SEA-stimulierte CD8⁺ T-Zellen aus 2.6.2.2 im Kontakt mit einer einzigen Raji B-Zelle, die keine weiteren T-Zell-Kontakte hatten, wurden identifiziert und das Auftreten apoptotischer Membranbläschen („Blebs“) bei der B-Zelle sowie das Bewegungsverhalten des T-Zell-Zentrosoms zur Kontaktfläche (IS) untersucht und die jeweiligen Zeiträume bestimmt (s. **Abb. 32 B d**).

Bei allen aufgenommenen α - bzw. γ -Tubulin-EGFP-exprimierenden SEA-stimulierten CD8⁺ T-Zellen aus 2.6.2.5 und 2.6.2.6 mit einem oder mehreren Raji-Kontakten wurde untersucht, wann das Zentrosom welche Kontaktstelle erreichte und ob und wann die Raji B-Zellen apoptotische Membranbläschen („Blebs“) aufwiesen (s. **Abb. 37 a**).

2.8.1.4 Apoptotische „Blebs“ bei Raji B-Zellen im Kontakt mit T-Zellen

Alle nicht direkt zu Experimentbeginn apoptotisch erscheinenden Raji B-Zellen in den Versuchen aus 2.6.2.2 wurden gezählt und in „kontaktlos“, „1 T-Zell Kontakt“ und „mehrere T-Zell Kontakte“ eingeteilt. Anschließend wurde der Zeitpunkt nach Experimentbeginn bei kontaktlosen Zellen bzw. der Zeitpunkt nach dem ersten T-Zell-Kontakt festgehalten, an dem apoptotische Membranbläschen („Blebs“) im Hellfeld zu erkennen waren. Diese Zeitpunkte wurden in einem Histogramm mit 5-Minuten-Intervallen zusammengetragen (s. **Abb. 32 B e**).

2.8.1.5 Orai1-Lokalisationsanalyse

Alle Orai1-mEGFP bzw. Orai1-mEGFP und STIM1-TagRFP-T exprimierenden Jurkat CD4⁺ T-Zellen aus 2.6.2.7 im Kontakt mit einer oder mehreren Raji B-Zellen oder anti-CD3-Antikörper-beschichteten „Beads“ und die fixierten und permeabilisierten anti-Orai1-Antikörper-Färbungen aus 2.6.3.4 wurden 60 Minuten nach Experimentbeginn bzw. Zugabe der Raji-Zellen auf ihre Orai1- bzw. STIM1-Lokalisation hin untersucht (s. **Abb. 41 b**). Dabei wurde je nach Intensitätsprofil in „Akkumulation am Uropod“ oder „Akkumulation an der Immunologischen Synapse (IS)“ eingeteilt, wie in Kapitel 3.2.2.2 beschrieben. Es wurde zwischen einer intrazellulären Akkumulation des Orai1 am Golgi und einer membranständigen Akkumulation von Orai1 unterschieden. Zur Beurteilung signifikanter Unterschiede wurden ungepaarte Standard t-Tests durchgeführt.

2.8.2 Volumenmessungen von Zellen und Organellen

2.8.2.1 Durchmesser-Bestimmung

Mithilfe des Moduls „Interaktives Messen“ der Software „AxioVision“ (Zeiss) wurde der Durchmesser (D) von runden Zellen im Hellfeld-Bild manuell bestimmt und mit der Formel $V = \frac{4}{3} * \pi * \left(\frac{D}{2}\right)^3$ das theoretische Kugelvolumen (V) berechnet.

2.8.2.2 Auflösungs-Bestimmung

Zur Bestimmung der theoretischen Auflösung bei idealen Bedingungen wurde die Halbwertsbreite (FWHM: „full width at half maximum“) für Punkt-Objekte am Deckglas in allen Experimenten mit 3D-Volumenmessungen berechnet (*Amos, McConnell und Wilson 2012*).

Für Epi-Fluoreszenz-Aufnahmen von Mitochondrien (s. **Abb. 31**) wurden die folgenden Formeln genutzt:

$$FWHM_{(XY)} = \frac{0,51 * \lambda_{em}}{NA} \qquad FWHM_{(Z)} = \frac{0,88 * \lambda_{em}}{n - \sqrt{n^2 - NA^2}}$$

Mit der Numerischen Apertur des Objektivs (NA) und dem Brechungsindex der Objektiv-Immersion (n). Die NA des für diese Epi-Fluoreszenz-Aufnahmen eingesetzten Multi-Immersion-Objektivs (NA mit Glycerin: 1,3) wurde mit Wasser-Immersion (n: 1,334) mittels $NA = n * \sin \alpha$ auf 1,18 berechnet. Als Wellenlänge (λ) wurde das Emissions-Maximum des jeweiligen Farbstoffs herangezogen (λ_{em}).

Für konfokale LSM-Aufnahmen (s. **Abb. 20 b** und **Abb. 28 a**) wurden die folgenden Formeln verwendet, bei denen von einer unendlich kleinen Lochblende ausgegangen wird:

$$FWHM_{(XY)} = \frac{0,37 * \left(\frac{\lambda_{ex} + \lambda_{em}}{2}\right)}{NA} \qquad FWHM_{(Z)} = \frac{0,64 * \left(\frac{\lambda_{ex} + \lambda_{em}}{2}\right)}{n - \sqrt{n^2 - NA^2}}$$

Das eingesetzte 100x Objektiv hatte eine NA von 1,45 mit Immersionsöl (n: 1,518). Als Wellenlänge (λ) wurde der geometrische Mittelwert aus der Wellenlänge des Anregungslasers (λ_{ex}) und des Emissionsmaximums des jeweiligen Farbstoffs (λ_{em}) herangezogen.

Die reale Halbwertsbreite in den Experimenten wurde bei möglichst dünnen und sich nicht in der Z-Richtung ausbreitenden Mitochondrien und ER-Filamenten am Deckglas und mit 5 μ m Z-Abstand zum Deckglas für die XY-Ebene und axial in der Z-Richtung ausgemessen.

Alle berechneten und gemessenen Werte sind in **Tabelle 14** zusammengetragen und in **Abbildung 11** in der Z-Richtung visualisiert. Zusätzlich ist das Verhältnis zwischen XY- und Z-Auflösung (Z/XY) in **Tabelle 14** aufgelistet.

Um die Überhöhung der mit der erreichten Auflösung ermittelten Volumenwerte zu bestimmen (s. 3.1.3), wurden Ellipsoid-Volumina mit der XY- und Z-Auflösung mittels $V = \frac{4}{3} * \pi * \frac{XY^2}{4} * \frac{Z}{2}$ berechnet.

Tabelle 14: Halbwertsbreiten (FWHM)-Berechnung und -Messung.

Experiment	Weitfeld dekonv. (3D Epi)			Konfokal dekonv. (3D LSM)			Konfokal dekonv. (3D LSM)		
Abbildung	25, 26, 27, 31			28 a			20 b		
Organell	Mitochondrien			Mitochondrien			Endoplasmatisches Retikulum		
Farbstoff	MitoTracker red			mTFP1			TagRFP-T		
Anregung / Emission [nm]	579 / 599			488 Laser, 462 / 492			568 Laser, 555 / 584		
FWHM [nm]	XY	Z	Z/XY	XY	Z	Z/XY	XY	Z	Z/XY
Berechnung	259	741	2,9	125	293	2,3	147	345	2,3
Messung									
n	7			8			6		
N	3			2			3		
am Deckglas \varnothing	150	534	3,5	109	323	3	114	414	3,9
SD	24	122	0,3	24	72	0,7	24	67	1,4
absolutes Minimum	130	385	3	77	252	2,2	79	303	2,3
5 μ m Z-Abstand \varnothing	189	630	3,3	116	430	3,8	114	410	3,6
SD	25	110	0,4	30	70	1	16	56	0,3
absolutes Minimum	160	500	2,9	81	300	2,5	88	335	3,2

2.8.2.3 Volumenmessungen

Mithilfe des Moduls „Inside 4D“ der Software „AxioVision“ (Zeiss) wurden die dekonvolvierten Fluoreszenzkanäle der „Hoechst 33342“- , „MitoTracker red“- und „CellMask deep red“-Färbungen aus 2.6.1.1 normiert und zu 3D-Z-Stapel-Binärbildern umgewandelt. Die Volumina für die Hoechst- und MitoTracker-Färbungen wurden direkt mithilfe der normierten 3D-Binärbilder bestimmt. Die mithilfe des CellMask-Kanals erzeugten 3D-Binärbilder wurden mit der Software „ImageJ“ in jeder Z-Ebene manuell innerhalb der PM-Färbung ausgefüllt. Die anschließende Messung dieser ausgefüllten 3D-Binärbilder mit „Inside 4D“ ergab das Gesamtvolumen der Zellen (s. **Abb. 31**).

Die LSM-Z-Stapel-Aufnahmen von ER (s. **Abb. 20 b**) und Mitochondrien (s. **Abb. 28 a**) in fixierten Jurkat-Zellen wurden ebenfalls mittels „Inside 4D“ in 3D-Binärbilder umgewandelt und die jeweiligen Volumina bestimmt. Zur Bestimmung des Gesamt-Zellvolumens bei ER-TagRFP-T-transfizierten Jurkat-Zellen wurde das ER-Signal als Vorlage für die Zellform genommen, die in jeder Z-Ebene des 3D-Binärbilds manuell mit der Software „ImageJ“ vollständig ausgefüllt wurde.

2.8.2.3 3D-Analyse der mitochondrialen Fission

Zur Analyse der mitochondrialen Fission wurden weitere Parameter wie die Gesamt-Fluoreszenz und die „Rundheit“ (Wert zwischen 0 und 1: Verhältnis kleinster/größter Durchmesser) der separierten Mitochondrien mithilfe des Moduls „Inside 4D“ der Software „AxioVision“ durchgeführt. Dabei wurden durch Normierung 3D-Binärbilder erstellt, die zur Bestimmung dreidimensionaler Messbereiche („regions-of-interest“, ROIs) für die densitometrischen Ursprungs-Bilder (mit Pixelwerten) genutzt wurden. Zur Beurteilung signifikanter Unterschiede wurden ungepaarte Standard t-Tests durchgeführt (s. **Abb. 28 a iii**).

2.8.3 Manuelles XY-Tracking

Zur Nachverfolgung der Zellen und verschiedener identifizierbarer Zellstrukturen in der Zelle selbst und in den Zellmembranen wurden manuell mithilfe des Moduls „Manual Tracking“ der Software „ImageJ“ sogenannte „Tracks“ in den Einzelebenen bzw. den XY-Maximal-Intensitäts-Projektionen mehrerer Experimente angefertigt (s. **Abb. 17, 24, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 42**). Stationäre Deckglas-Verunreinigungen wurden ebenfalls getrackt, um Objektiv-Bewegungen aus den Objekt-Tracks herauszurechnen. Die Position der Zellmitte, der Mitte des Zellkerns und der Mitte der Kontaktstelle

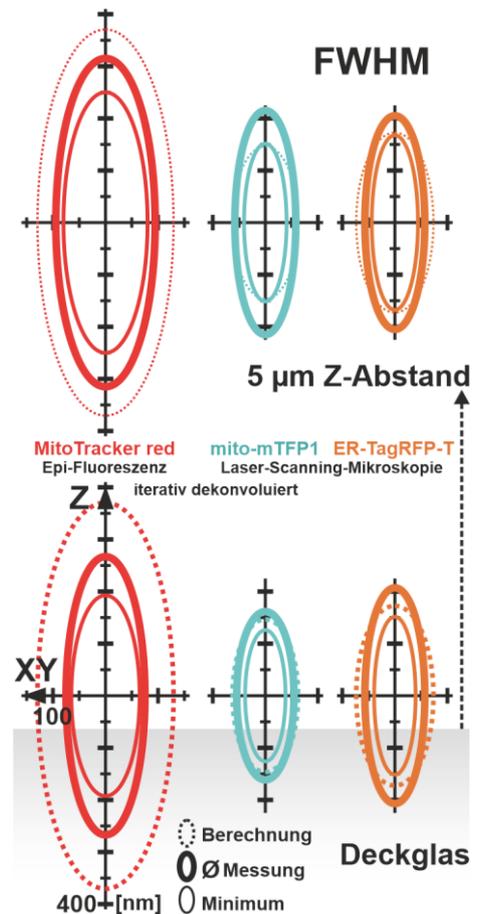


Abb. 11:

FWHM-Berechnung und -Messung.

Berechnete und gemessene Halbwertsbreiten (FWHM) am Deckglas und gemessene FWHM mit 5 µm Z-Abstand bei dekonvolvierten MitoTracker red (rot, n: 7, N: 3) Epi-Fluoreszenz-Aufnahmen und mito-mTFP1 (blaugrün, n: 8, N: 2) und ER-TagRFP-T (orange, n: 6, N: 3) Laser-Scanning-Mikroskop (LSM)-Aufnahmen. Der gemessene Durchschnitt (dicke Linien) und der Minimalwert (dünne Linien) sind mit der Berechnung am Deckglas (gepunktete Linien) dargestellt. Es wurden möglichst dünne Mitochondrien bzw. ER-Strukturen vermessen.

zwischen T-Zellen und B-Zellen (IS) wurde im Hellfeld-Bild bestimmt. Ebenso wurde im Hellfeld durch Bewegungen der Zellen die Kontaktstelle mit dem Deckglas identifiziert, als „Uropod“ definiert und dessen Mittelpunkt getrackt. In den Fluoreszenzkanälen wurde zwischen intrazellulären und membranständigen Signalen unterschieden und deren jeweiligen Mittelpunkte getrackt. Bei der Nachverfolgung maximaler membranständiger Aktin- und Orail-Fluoreszenzen wurde zu jedem Zeitpunkt der höchste membranständige Pixelwert des jeweiligen Kanals getrackt.

Zur Berechnung des Objekt-Abstands „A“ in μm wurde die folgende Formel angewandt:

$$A = \sqrt{(X_1 - X_2)^2 + (Y_1 - Y_2)^2}$$

X und Y waren in diesem Fall die XY-Koordinaten von Objekt 1 und 2 in μm .

Zur Berechnung der XY-Geschwindigkeit „V“ in nm/s wurde die folgende Formel angewandt:

$$V = \frac{\sqrt{(X_t - X_{t-1})^2 + (Y_t - Y_{t-1})^2}}{\Delta t \text{ (s)}}$$

Mit X_t und Y_t als XY-Koordinaten des jeweiligen Objekts zum jeweiligen Zeitpunkt und X_{t-1} und Y_{t-1} als XY-Koordinaten einen Zeitpunkt zuvor, in Nanometern (nm), und Δt als Zeitintervall zwischen zwei Zeitpunkten, in Sekunden (s).

Bei Normierung der Geschwindigkeiten mit der Zellmitte, der IS oder dem Zentrosom wurde zur Berechnung der Geschwindigkeiten die Differenz zwischen der jeweiligen Objekt-Position und der Normierungs-Position zum jeweiligen Zeitpunkt herangezogen:

$$V = \frac{\sqrt{((X_0 - X_N)_t - (X_0 - X_N)_{t-1})^2 + ((Y_0 - Y_N)_t - (Y_0 - Y_N)_{t-1})^2}}{\Delta t \text{ (s)}}$$

Mit den XY-Koordinaten des jeweiligen Objekts (X_0 , Y_0) und des jeweiligen Normierpunkts (X_N , Y_N).

2.8.4 Semi-automatisches XYZ-Vesikel-Tracking

Zur dreidimensionalen Nachverfolgung von Vesikeln in Bead-stimulierten CD8^+ T-Zellen (s. **Abb. 30, 42**) wurden die dekonvoluierten und bearbeiteten Aufnahmen von 2.6.2.3 in der Software „IMARIS“ (Bitplane) mit dem Modul „advanced particle tracking“ getrackt. Dazu wurden zunächst in allen Z-Stapeln aller Zeitpunkte Objekte mit einem geschätzten Durchmesser von $0,2 \mu\text{m}$ identifiziert („Spots“). Anschließend wurden Tracks der zuvor identifizierten „Spots“ mit dem Tracking-Modus „Autoregressive Motion“ mit einer „MaxDistance“ Einstellung von $3 \mu\text{m}$ und einer „MaxGapSize“ von 0 oder 1 Zeitpunkt angefertigt.

Aus allen so erzeugten Tracks wurden diejenigen Tracks herausgefiltert, bei denen die Bewegungen einzelner Vesikel annähernd korrekt aufgezeichnet wurden. Im Bereich der Vesikel-Akkumulationen konnten durch die Limitierung der Auflösung einige fehlerhafte Sprünge nicht aus den Tracks entfernt werden. Deshalb wurden diejenigen Tracks manuell ausgewählt, die eindeutig Vesikeln zuzuordnen waren und keine Artefakte mit Geschwindigkeiten $> 50 \text{ nm/s}$ enthielten.

Da in diesen Experimenten nur Einzelzeitpunkt-Hellfeld-Bilder vor dem Beginn der Fluoreszenz-Zeitrafferaufnahmen erstellt wurden, wurde zum Ausgleich der zellulären Eigenbewegung das Zentrum der intrazellulären Perforin-mCherry-Akkumulation manuell in allen drei Raumdimensionen mit der intern programmierten Software „Gryphos“ (Gerhard Bračić, Biophysik Homburg/Saar) getrackt. So entstandene Z-Schritte von 0,5 µm wurden manuell interpoliert.

Zur Normierung der Vesikel-Position wurde zu jedem Zeitpunkt die Differenz des Akkumulations-Tracks und jedes Vesikel-Tracks berechnet. Die XYZ-Geschwindigkeit „V“ der Vesikel und der Akkumulation wurde mit folgender Formel in nm/s berechnet:

$$V = \frac{\sqrt{(X_t - X_{t-1})^2 + (Y_t - Y_{t-1})^2 + (Z_t - Z_{t-1})^2}}{\Delta t (s)}$$

Die Berechnung erfolgte mit den nicht-normierten XYZ-Koordinaten für die Akkumulation und die mit dem Akkumulations-Track wie in 2.8.3 normierten XYZ-Koordinaten der Vesikel in Nanometern (nm).

Aus den so erhaltenen Geschwindigkeiten „V“ wurde die jeweils höchste (V_{max}), und geringste (V_{min}) Geschwindigkeit pro Track bestimmt und die durchschnittliche Geschwindigkeit (V_Ø) jedes einzelnen Tracks berechnet. Der Durchschnitt dieser Werte wurde für alle Tracks einer Vesikel-Art aus allen Zellen gebildet („Pro Track“, n: 706 (Perforin) bzw. 502 (endoCD3) Tracks), zusätzlich wurden die Tracks in verschiedene Trackdauern eingeteilt und für diese Gruppen jeweils V_{max}, V_{min} und V_Ø berechnet.

Außerdem wurde zunächst der Durchschnitt dieser Werte für einzelne Tracks in jeder einzelnen Zelle berechnet und davon wiederum das Mittel bestimmt („Pro Track & Zelle“, n: 9 Zellen).

Abschließend wurde V_{max}, V_{min} und V_Ø in jeder einzelnen Zelle bestimmt und der Durchschnitt dieser Werte berechnet („Pro Zelle“, n: 9 Zellen).

3 Ergebnisse

Die Zell- und Organell-Morphologie, sowie das Volumen von HeLa-Zellen und T-Zellen ohne Aktivierung wird im ersten Teil der Ergebnisse untersucht, die Zell- und Organell-Morphologie von T-Zellen im Kontakt mit stimulierenden B-Zellen, sowie apoptotische Anzeichen bei den B-Zellen im zweiten Teil.

3.1 Zell- und Organell-Morphologie, -Dynamik und -Volumina von HeLa- und T-Zellen

Da sich HeLa-Zellen und T-Zellen bezüglich der Rolle ihrer Mitochondrien bei der Kalzium-Homöostase (*Quintana et al. 2006; Giacomello et al. 2010; Quintana et al. 2011*) und der Zellform drastisch unterscheiden, wurde die Morphologie der Zellen und ihrer Organellen im Detail miteinander verglichen.

3.1.1 Morphologie von HeLa- und T-Zellen

Bevor die Organell-Morphologie und -Lokalisation in HeLa-Zellen und verschiedenen T-Zellen quantifiziert werden, wird zunächst die Morphologie der Gesamtzellen im Detail charakterisiert.

HeLa-Zellen. Die Zelllinie HeLa flachte sich bei der Kultur auf Glas-Deckgläsern stark ab (s. Abb. 2). Bei eigenen Experimenten nahmen manche Zellen eine gleichmäßig kreisförmig abgeflachte Form an, die meisten Zellen breiteten sich allerdings spindelförmig oder mit einer dritten Zellausstülpung („dreieckig“) bis über 100 μm aus (**Abb. 12**). In Hellfeldaufnahmen von HeLa-Zellen mit hoher Auflösung (Beispiel in **Abb. 12 A**) zeigten sich auch intrazelluläre Details wie Zellkerne, Nukleoli, Vesikel und weitere Zellorganellen wie Mitochondrien. Die Maximal-Intensitäts-Projektion (MIP, **ii**) des aufgenommenen Z-Stapels lässt vor allem intrazelluläre Vesikel hervortreten. In den Z-Ansichten des Hellfeld-Z-Stapels sind die Zellmembranen aufgrund der Lichtstreuung nur sehr unscharf zu erkennen.

Durch die Färbung mit dem organischen Farbstoff „CellMask deep red“ und die iterative Dekonvolution des aufgenommenen Fluoreszenz-Z-Stapels konnte eine deutliche Färbung der Plasmamembran (PM) erreicht werden, ohne dass das PM-Signal vom deutlich stärkeren Signal internalisierter Vesikel überstrahlt wurde (**Abb. 12 B**). Zellgrenzen, Mikrovilli und internalisierte Vesikel treten nun auch in der Z-Ansicht deutlich hervor. In der Einzelebene (**i**) ist der Zellkern aufgrund der Abwesenheit des Farbstoff-Signals lokalisierbar. Vor allem die Z-Ansicht der Maximal-Intensitäts-Projektion (**ii**) zeigt die Ausbreitung und Abflachung der Zellen auf dem Deckglas und ihre stark mit Mikrovilli übersäten Oberflächen. Die mit dem PM-Farbstoff internalisierten Vesikel waren im gesamten Zytoplasma verteilt. Eine detaillierte Untersuchung der Vesikelverteilung wird in Kapitel 3.1.2.6 durchgeführt.

In dieser Experimentreihe wurden, durch die zusätzliche Färbung mit „TubulinTracker green“ und „Hoechst 33342“ (Tubulin und dDNS), auch 7 mitotische HeLa-Zellen in der Metaphase identifiziert, die eine „Kugel“-Form annahmen (**Abb. 12 A i, B iii**). Der mittlere Durchmesser dieser Zellen betrug 21,1 μm (SD: 1,5 μm , n: 7, N: 2). Auffällig waren bei der Plasmamembran-Färbung der Beispielzelle die Membranfäden, die sich von der ehemaligen Kontaktfläche mit dem Deckglas zur Kugelform spannten.

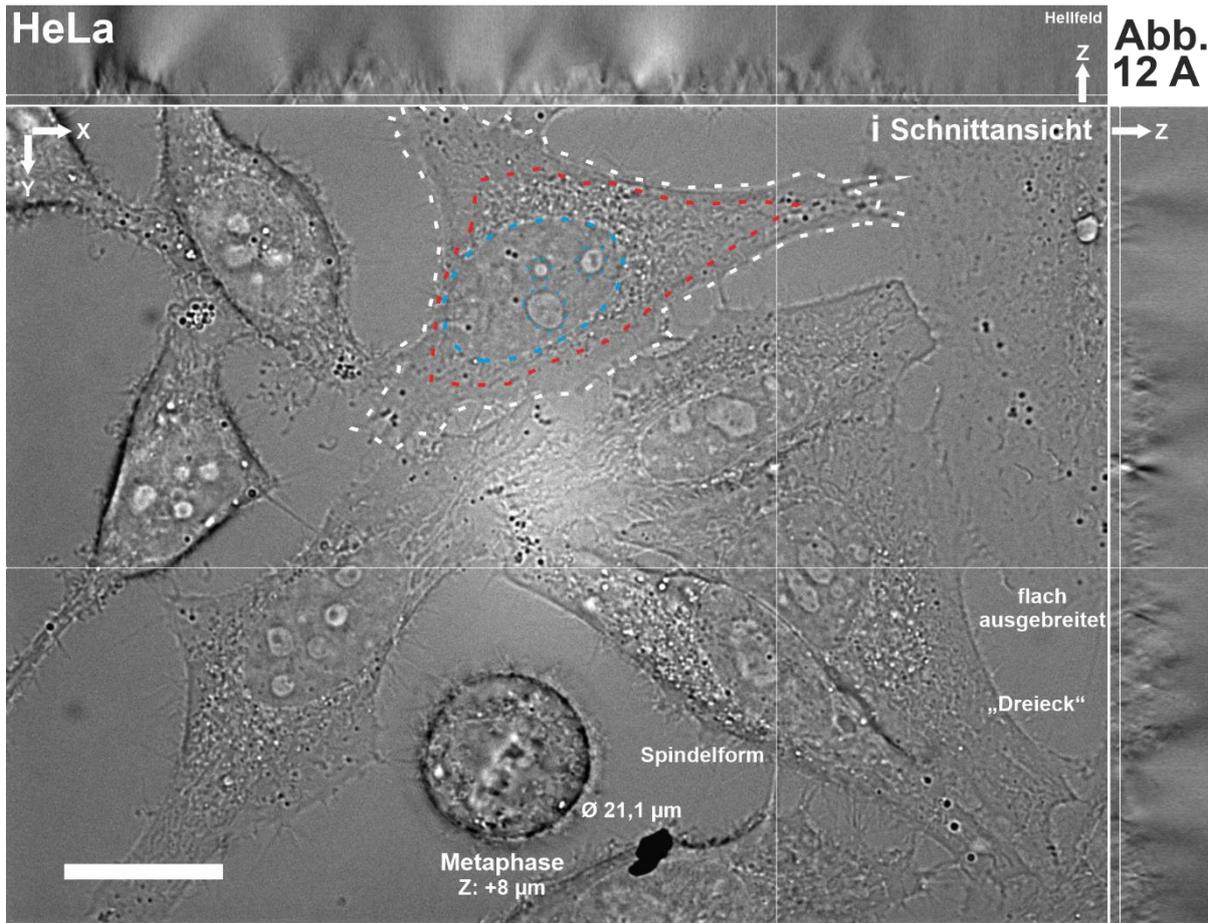
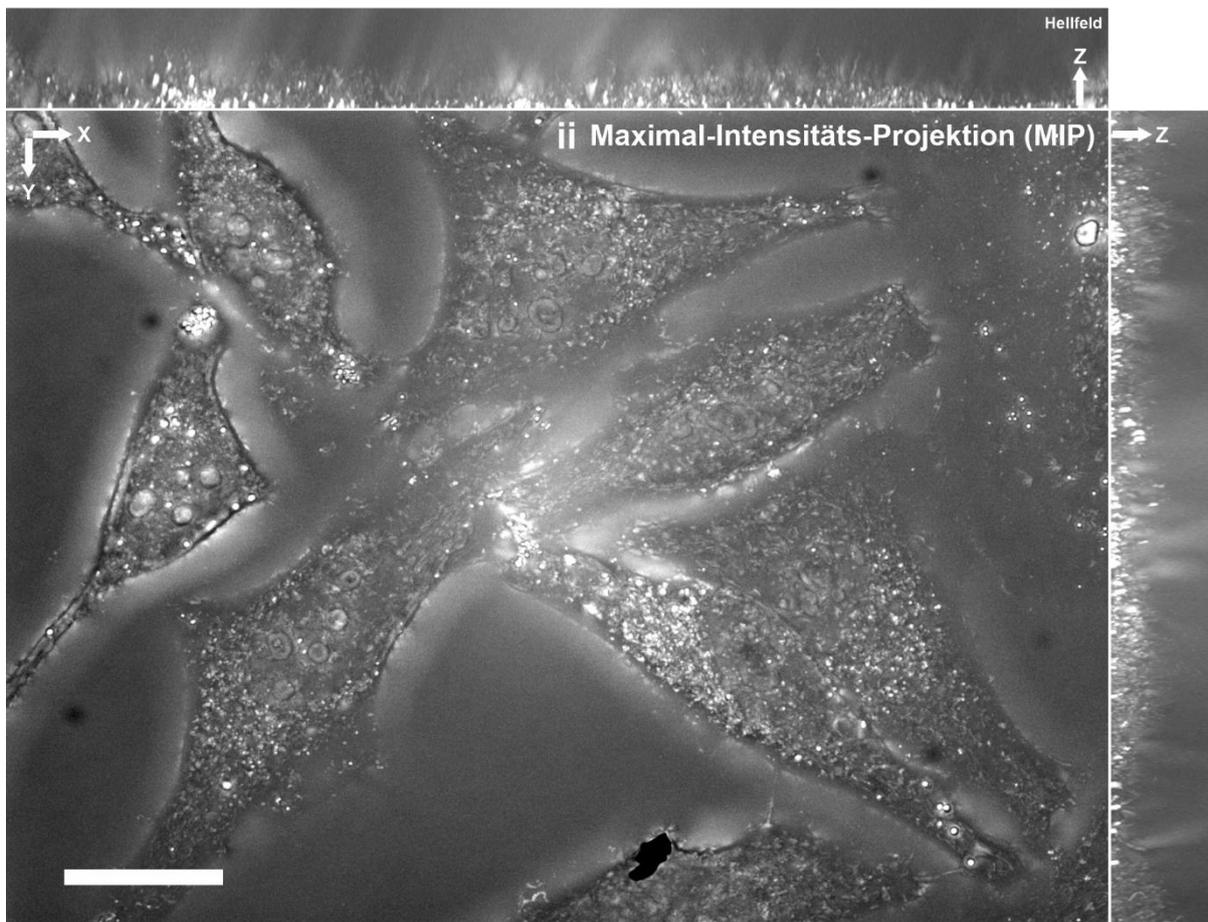


Abb. 12 A: Hellfeld Z-Stapel-Aufnahmen von HeLa-Zellen



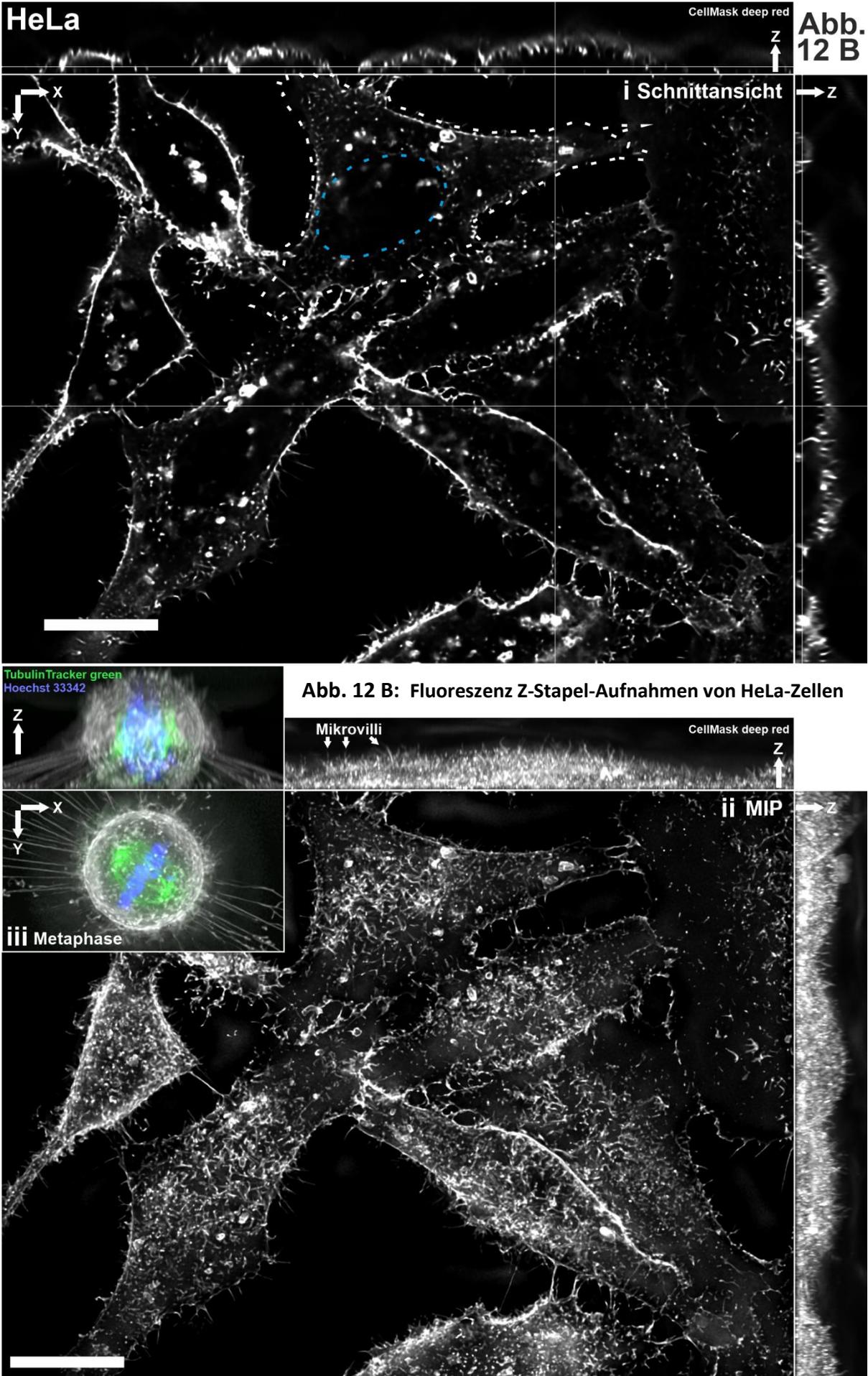


Abb. 12 B: Fluoreszenz Z-Stapel-Aufnahmen von HeLa-Zellen

Abb. 12: Z-Stapel-Aufnahmen von auf Glas-Deckgläsern kultivierten HeLa-Zellen.

Typischer Ausschnitt von auf Glas-Deckgläsern wachsenden Zellen der Epithel-Zelllinie HeLa in Ringer-Lösung bei 37°C, aufgenommen als Z-Stapel (0,25 µm Z-Abstand) mit einem 63x Wasser-Objektiv und einer Standard-CCD-Kamera (6,45 µm Pixelgröße). Die Zellen wurden mit CellMask deep red (weiß), MitoTracker red (nicht gezeigt), TubulinTracker green (grün) und Hoechst 33342 (blau) gefärbt.

Maßstabsbalken: 20 µm, XYZ-Pfeile: 5 µm

- A Hellfeld-Aufnahme.** In der 3D-Schnittansicht (i) sind die angezeigten Schnitte in XY-, XZ- und YZ-Richtung mit weißen Hilfslinien angezeigt. Eine Beispielzelle wurde zur Veranschaulichung weiß umzeichnet. Der Zellkern und die Nukleoli sind blau umrahmt. Eine Organell-Akkumulation, die um den Zellkern angehäuft ist, ist rot umrahmt. Eine Zelle in der Metaphase der Mitose wurde aus einer anderen Aufnahme eingefügt. Zusätzlich ist die 3D-Maximal-Intensitäts-Projektion (MIP, ii), ohne metaphasische Zelle, dargestellt.
- B Fluoreszenz-Aufnahme.** Plasmamembran-Färbung der Zellen aus **A** (weiß). Der aufgenommene Z-Stapel wurde mithilfe einer experimentell bestimmten „Point-Spread-Funktion“ (PSF) iterativ dekonvolviert. Darstellung als XY-, XZ- und YZ-Schnittansicht (i) und XY-, XZ- und YZ-MIP (ii). Die XY- und die XZ-MIP der eingefügten metaphasischen Zelle aus **A a**, zusätzlich mit Tubulin- (grün) und dDNS- (blau) Färbung gezeigt, ist in ii eingefügt (iii).

T-Zellen - Übersicht. Neben der adhärennten Zelllinie HeLa wurden drei verschiedene T-Zelltypen (Jurkat CD4⁺ Zelllinie und primäre naive und SEA-stimulierte CD8⁺ T-Zellen) unter anderem mit dem Plasmamembran-Farbstoff „CellMask deep red“ gefärbt, auf Poly-L-Ornithin- oder unbeschichteten Glas-Deckgläsern aufgebracht und 10-15 min nach Zugabe im Hellfeld und der Fluoreszenz als Z-Stapel aufgenommen (**Abb. 13**). Maximal-Intensitäts-Projektionen (MIP) wurden in die Schnittansichten eingebettet (rechtes unteres Viertel in **A**, untere Hälfte in **B**). Der Großteil aller T-Zellen verblieb innerhalb der ersten halben Stunde nach Kontakt mit dem Deckglas in einer annähernd runden „Kugel“-Form und wies im Vergleich zum Durchmesser der Zellen nur eine minimale Kontaktfläche mit dem Deckglas auf.

Die humane CD4-positive (CD4⁺) T-Zell-Lymphom-Zelllinie Jurkat (**Abb. 13 A**) wies bei runden Zellen einen mittleren (\emptyset) Durchmesser von 11 µm auf (SD: 1,15 µm, n: 241, N: 5). Durch ihren hohen Membrankontrast und die im Hellfeld (**Abb. 13 A i**) zu erkennenden Chromosomen fallen zwei sich im oberen linken Bildbereich befindende mitotische Zellen auf (\emptyset -Durchmesser: 13,3 µm, SD: 0,5 µm, n: 14, N: 3). Eine metaphasische Zelle aus einer anderen Aufnahme ist in Form einer 5 µm „Schnitt-MIP“ (s. 2.7.3) eingefügt. Vereinzelt begannen Zellen bereits vor der Aufnahme, sich auf dem Deckglas auszubreiten und/oder Lamellopodien in das umgebende Medium auszubilden. Die Plasmamembran-Färbung (**Abb. 13 A ii**) ließ eine dünne und deutlich abgegrenzte Membran erkennen, die nur bei wenigen Zellen Mikrovilli aufwies. Die mit der PM-Färbung internalisierten Vesikel kamen auch in diesen Zellen vor, waren aber im Gegensatz zu den Vesikeln in HeLa-Zellen nicht gleichmäßig verteilt (s. Abb. 12 B ii). In der Maximal-Intensitäts-Projektion (MIP) erscheint in allen T-Zellen eine punkt- oder wolkenförmige Vesikel-Akkumulation. Die eingefügte metaphasische Jurkat-Zelle ist in der Fluoreszenz zusätzlich mit Tubulin- und dDNS-Färbung gezeigt (**Abb. 13 A iii**).

Periphere Blutlymphozyten (PBL) wurden aus Filtern der Thrombozyten-Spende isoliert. Aus diesen PBL wurden unstimulierte („naive“) CD8-positive (CD8⁺) T-Zellen mittels „Negativ-Isolation“, bei der möglichst alle anderen Zelltypen mittels Antikörpern entfernt wurden, gewonnen und wie die Jurkat-Zellen behandelt und mikroskopisch aufgenommen (**Abb. 13 B a**). Diese Zellen wiesen im Vergleich mit Jurkat-Zellen einen deutlich kleineren \emptyset -Zelldurchmesser von 7 µm (SD: 0,5 µm, n: 289, N: 4), sowie eine stärkere Granularität und ausgeprägtere Mikrovilli auf. Es konnten nur 3 mitotische naive CD8⁺ T-Zellen in 2 Experimenten identifiziert werden (\emptyset -Durchmesser: 11,2 µm, SD: 1,1 µm). Die PM-Färbung wurde von „naiven“ T-Zellen schlecht aufgenommen und schnell in Vesikel internalisiert, sodass die

Plasmamembran aufgrund der Vesikel-Überstrahlung sehr leuchtschwach erschien (**Abb. 13 B a ii**). Auch die naiven T-Zellen wiesen punkt- oder wolkenförmige Akkumulationen von Vesikeln auf, allerdings waren im Rest der Zelle deutlich mehr vereinzelte Vesikel zu erkennen als bei Jurkat-Zellen.

Zu wie zuvor isolierten PBL wurde *Staphylococcus aureus* Enterotoxin A (SEA) und Interleukin-2 hinzugegeben und 2-3 Tage inkubiert. Durch die „Positiv-Isolation“ mit anti-CD8-Antikörperbeschichteten „Beads“ wurden anschließend SEA-stimulierte CD8⁺ T-Zellen gewonnen, wie die vorherigen T-Zellen behandelt und mikroskopisch aufgenommen (**Abb. 13 B b**). Diese Zellen erschienen wie die Jurkat-Zellen und die „naiven“ CD8⁺ T-Zellen vorwiegend rund. Allerdings begannen bereits vor der Aufnahme deutlich mehr Zellen ihre Form zu verändern und sich auf dem Deckglas auszubreiten, als bei beiden anderen untersuchten T-Zelltypen. Der Ø-Zelldurchmesser der annähernd runden Zellen betrug 10,6 µm (SD: 1,17 µm, n: 266, N: 4). Im Gegensatz zu den naiven Zellen konnten relativ viele mitotische Zellen detektiert werden (Ø-Durchmesser: 13,4 µm, SD: 0,9 µm, n: 21, N: 4). Die Membran der SEA-stimulierten CD8⁺ T-Zellen erschien in der Beispielaufnahme ähnlich wie die der Jurkat-Zellen dünn und abgegrenzt, mit einem leicht erhöhten Mikrovilli-Besatz (**Abb. 13 B b ii**). In allen nicht-mitotischen SEA-stimulierten CD8⁺ T-Zellen waren wie bei den anderen T-Zellen punkt- oder wolkenförmige Vesikel-Akkumulationen zu erkennen, mit im Vergleich zu den Jurkat-Zellen relativ vielen vereinzelten Vesikeln im Rest des Zytoplasmas. Zwei in der MIP-Ansicht lokalisierte Zellen ohne Vesikel-Akkumulation befanden sich in der Mitose. Eine metaphasische Zelle aus einer anderen Aufnahme ist im Hellfeld als Schnitt und in der Fluoreszenz als MIP mit zusätzlicher Tubulin- und dDNS-Färbung gezeigt (**Abb. 13 B b iii**).

Besonders trat in allen T-Zellen der große Zellkern hervor. Bemerkenswert war auch die deutlich geringere Größe der naiven CD8⁺ T-Zellen im Vergleich zu den Jurkat-Zellen und SEA-stimulierten CD8⁺ T-Zellen. In den Maximal-Intensitäts-Projektionen (MIP) der Hellfeldaufnahmen (**Abb. 13 i**) ist bei allen T-Zellen, neben vereinzelten Vesikeln, hauptsächlich die Plasmamembran zu erkennen. Während die meisten untersuchten HeLa-Zellen stark mit Mikrovilli übersät waren (s. Abb. 12 B), bildeten nur manche T-Zellen vereinzelte Mikrovilli aus. Bei den restlichen T-Zellen konnten keine Mikrovilli nachgewiesen werden.

Zum Zeitpunkt der Aufnahmen wiesen die meisten Zellen aller drei T-Zelltypen noch ihre runde Zellform auf. Etwa ein Viertel aller T-Zellen begann nach dem Absetzen auf dem Deckglas die Zellform zu verändern. Neben T-Zellen, die sich ähnlich wie die HeLa-Zellen auf dem Deckglas ausbreiteten, bildeten viele T-Zellen Lamellopodien in das umgebende Medium aus. Vor allem SEA-stimulierte CD8⁺ T-Zellen schmiegt sich bei Zell-Zell-Kontakt stark aneinander an. Im folgenden Abschnitt werden alle in diesen Experimenten detektierten T-Zell-Formänderungen im Detail analysiert und kategorisiert.

T-Zellen - Zellformänderung. Zur detaillierten Analyse der Zellform wurden alle drei T-Zelltypen zwischen 5 und 30 min nach Absetzen auf Deckgläsern aufgenommen und die verschiedenen aufgetretenen Zellformänderungen der T-Zellen dokumentiert und kategorisiert. Detailansichten aller drei untersuchten T-Zelltypen in der noch „runden“ Zellform und diverse Zellformänderungen sind in **Abbildung 14** zusammengetragen. Jurkat CD4⁺ T-Zellen sind in **Abb. 14 A**, naive CD8⁺ T-Zellen in **Abb. 14 B** und SEA-stimulierte CD8⁺ T-Zellen in **Abb. 14 C** gezeigt.

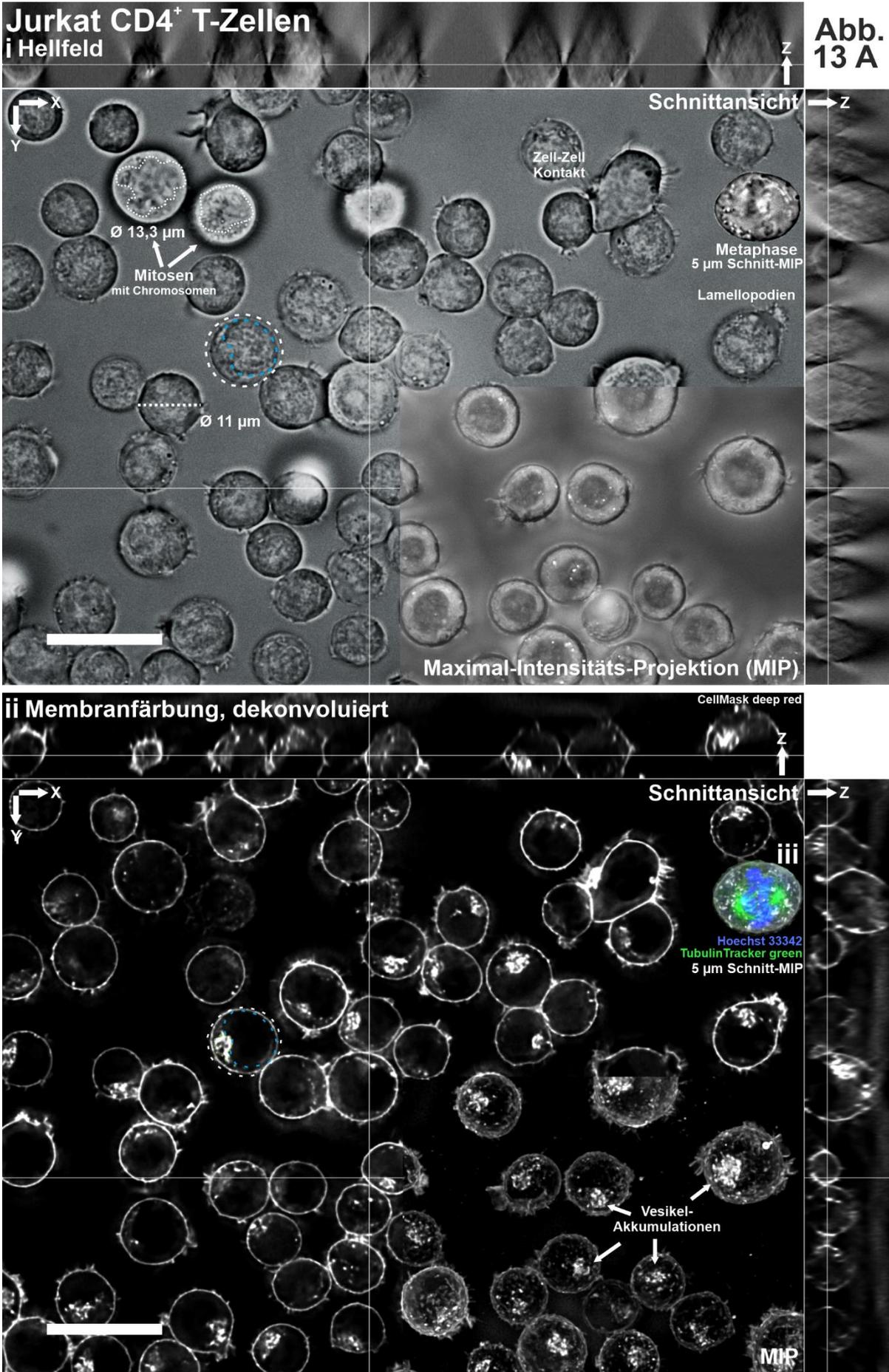
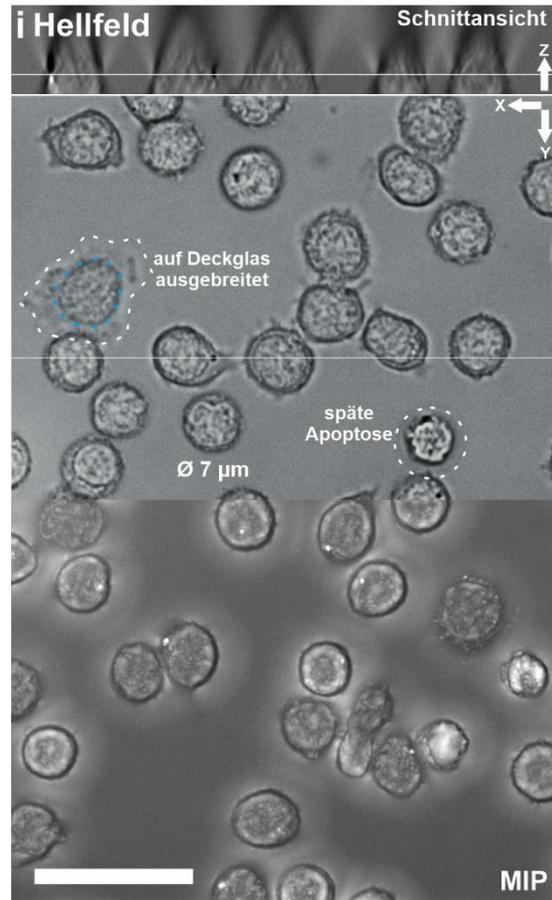
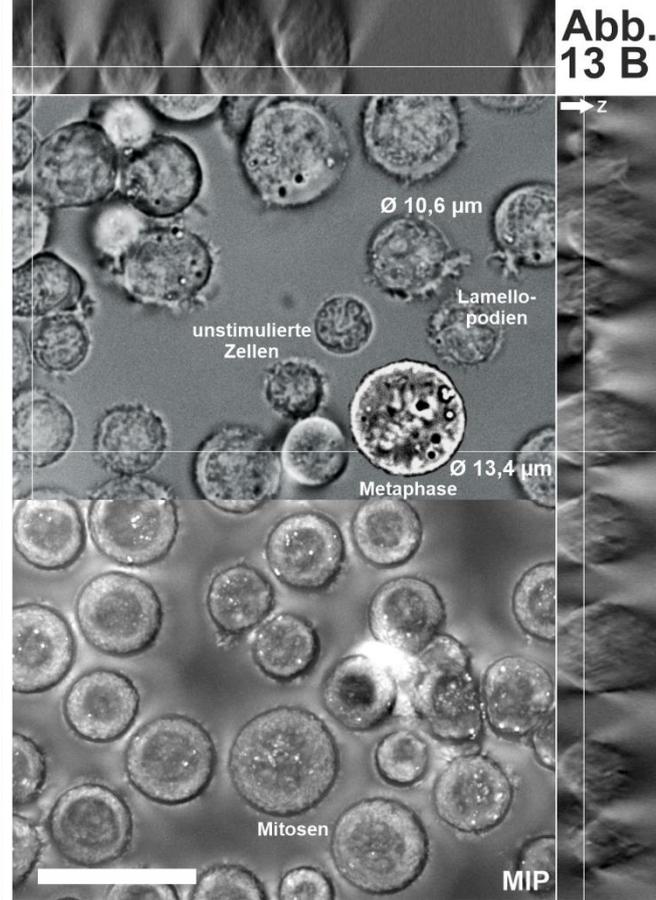


Abb. 13 A: Hellfeld- und Fluoreszenz-Z-Stapel-Aufnahmen von Jurkat CD4⁺ T-Zellen

a naive CD8⁺ T-Zellen



b SEA-stimulierte CD8⁺ T-Zellen



ii Membranfärbung, dekonvolviert

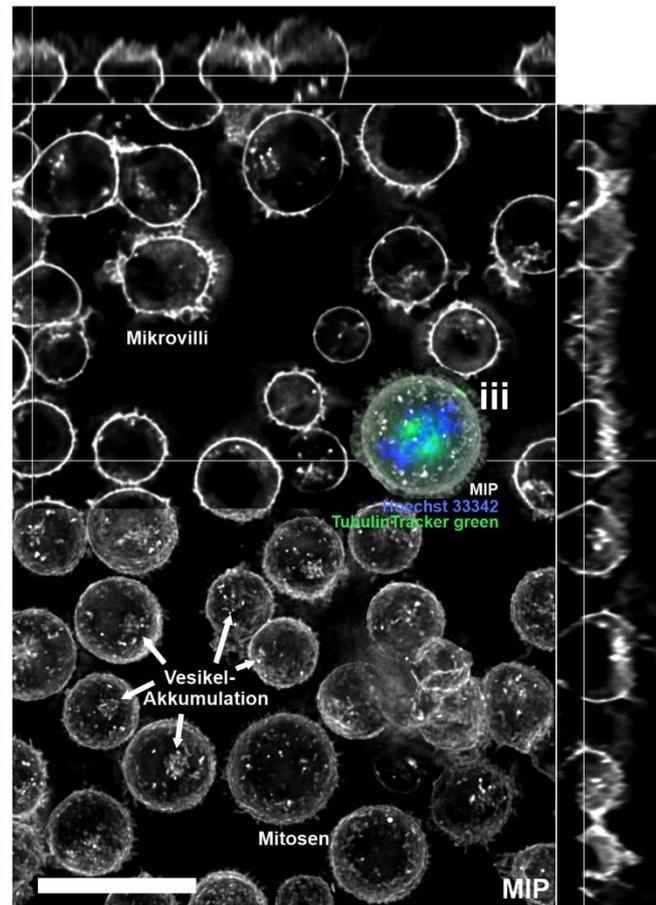
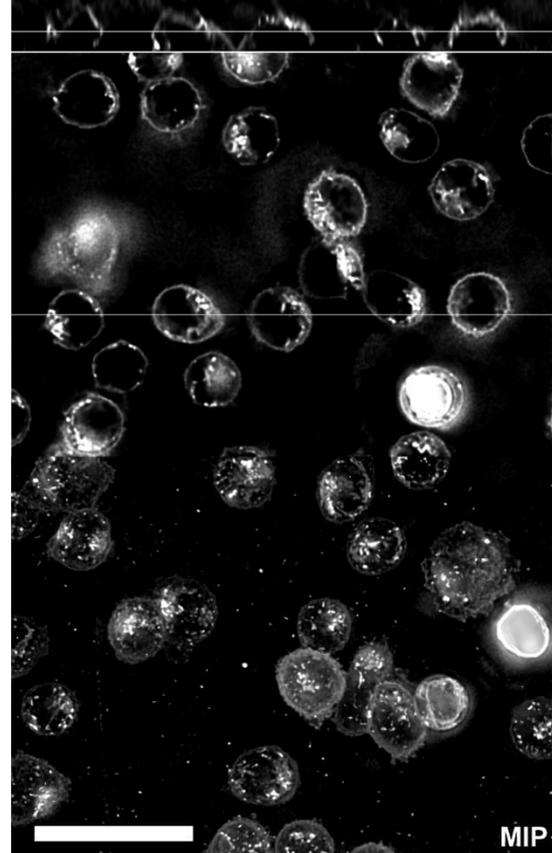


Abb. 13 B: Hellfeld- und Fluoreszenz-Z-Stapel-Aufnahmen von primären CD8⁺ T-Zellen

Abb. 13: Z-Stapel-Aufnahmen von auf Glas-Deckgläsern aufgebracht T-Zellen.

Typische Ausschnitte verschiedener T-Zelltypen 10-15 Minuten nach Zugabe der Zellen zu der als Medium genutzten Ringer-Lösung bei 37°C, aufgenommen mit einem 63x Wasser-Objektiv und einer Standard-CCD-Kamera (6,45 µm Pixelgröße). Die Zellen wurden mit CellMask deep red (weiß), MitoTracker red (nicht gezeigt), TubulinTracker green (grün) und Hoechst 33342 (blau) gefärbt und im Hellfeld (i) und der Fluoreszenz (ii) als Z-Stapel (0,25 µm Z-Abstand) aufgenommen. Die aufgenommenen Fluoreszenz-Z-Stapel wurden iterativ dekonvoluiert. Die Schnitte der Schnittansichten sind durch weiße Hilfslinien angezeigt. Im unteren rechten Viertel (A) bzw. in der unteren Hälfte (B) ist der Z-Stapel als XY-Maximal-Intensitäts-Projektion (MIP) dargestellt. **Maßstabsbalken: 20 µm, X-Y-Z Pfeile: 5 µm**

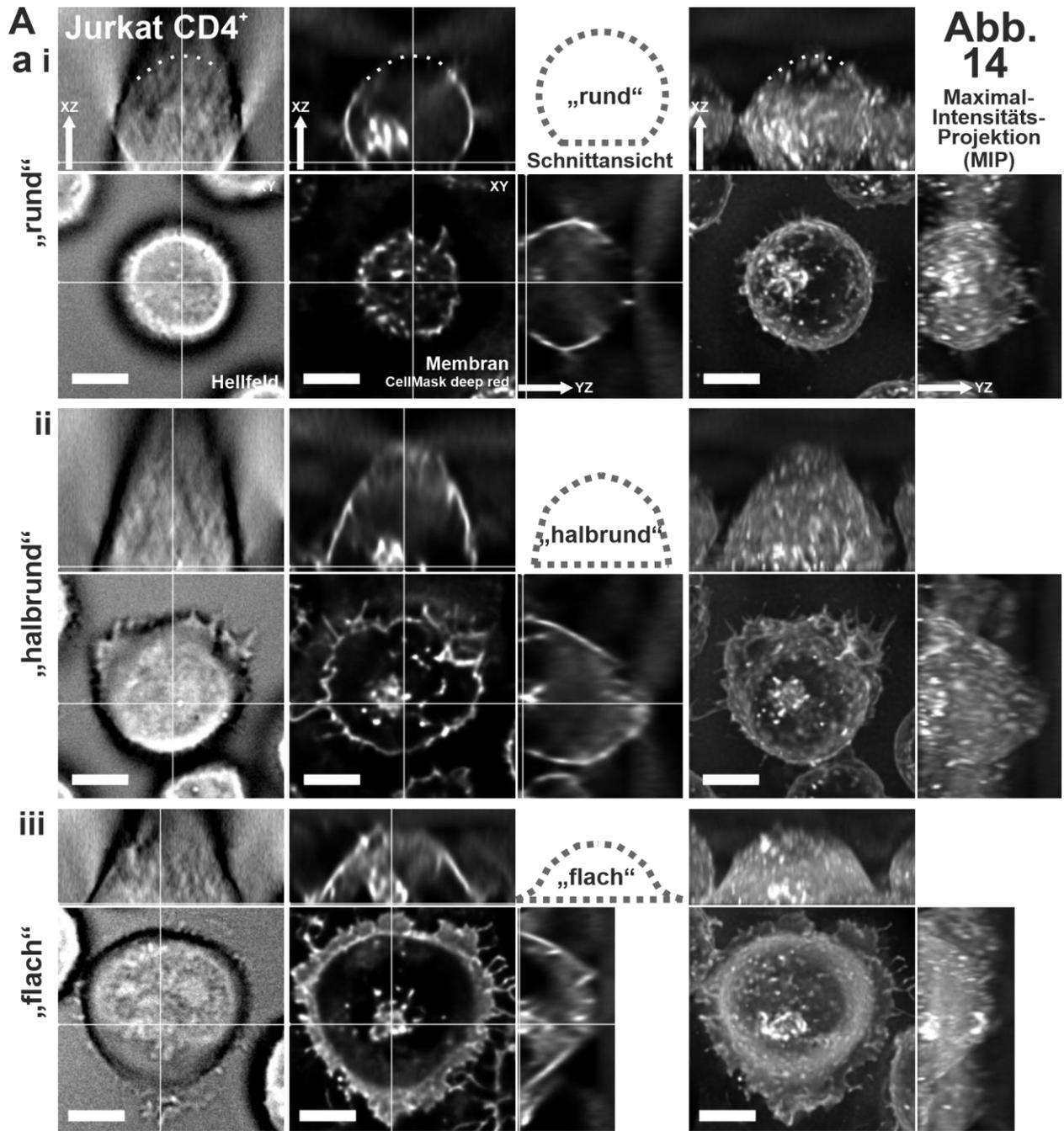
A Hellfeld- (i) und Fluoreszenz- (ii) Z-Stapel-Aufnahme einer typischen Anhäufung von **Jurkat CD4⁺ T-Zellen** auf Glas-Deckgläsern. Eine Beispielzelle ist weiß umrahmt, ihr relativ großer Zellkern blau. In der Schnittansicht der Hellfeldaufnahme sind zwei große Zellen in der Mitose durch ihre Chromosomen zu erkennen. Beispiele für Zell-Zell-Kontakte und Lamellopodienbildung sind in der Abbildung angemerkt. Eine mitotische Zelle in der Metaphase ist als 5 µm Schnitt-MIP aus einer anderen Aufnahme eingefügt. In der Fluoreszenz sind für diese Zelle zusätzlich die Tubulin- (grün) und dDNS- (blau) Färbungen angezeigt (iii).

B Hellfeld- (i) und Fluoreszenz- (ii) Z-Stapel-Aufnahmen typischer Anhäufungen von naiven (a) und SEA-stimulierten (b) primären **CD8⁺ T-Zellen** auf Glas-Deckgläsern. Eine stark abgeflachte und eine stark apoptotische naive Zelle sind hervorgehoben. In der Beispielaufnahme von SEA-stimulierten T-Zellen sind zwei mitotische Zellen ohne Vesikel-Akkumulation in den MIP-Ansichten erkennbar. Eine metaphasische SEA-stimulierte CD8⁺ T-Zelle aus einer anderen Aufnahme ist in der Hellfeld-Schnittansicht als Schnitt und in der Fluoreszenz, zusätzlich mit Tubulin- (grün) und dDNS- (blau) Färbung, als MIP (iii) eingefügt.

Alle nach dem Spülen mit Ringer-Lösung noch vorhandenen T-Zellen hatten eine Kontaktfläche mit dem Deckglas ausgebildet, etwa vier Fünftel dieser Zellen behielt aber ihre runde Zellform größtenteils bei, mit einer im Vergleich zum Zelldurchmesser kleinen Kontaktfläche mit dem Deckglas („rund“, **Abb. 14 A a i, B a i, C a i**). Etwa ein Fünftel aller T-Zellen vergrößerte die Kontaktfläche mit dem Deckglas, sodass sich die breiteste Stelle dieser Zellen am Deckglas befand („halbrund“, **Abb. 14 A a ii**). Einige dieser Zellen breiteten sich sehr flach auf dem Deckglas aus („flach“, **Abb. 14 A a iii, B a ii**), und zeigten häufig einen Lamellopodien-„Ring“. Diese Zellform wurde auch dadurch charakterisiert, dass der Zellkern sowohl am Deckglas als auch an der oberen Zellmembran anlag.

Zusätzlich zu der Ausbreitung auf dem Deckglas änderten bei allen drei untersuchten T-Zelltypen viele Zellen ihre Zellform, indem sie Lamellopodien in das umgebende Medium ausbildeten (**Abb. 14 A b**). Diese Ausstülpungen traten sowohl bei runden Zellen mit kleiner Deckglas-Kontaktfläche, als auch bei auf dem Deckglas ausgebreiteten Zellen auf. Zudem kam es bei allen untersuchten T-Zelltypen zu Zell-Zell-Kontakten mit einer Ausbreitung der Plasmamembran über die kontaktierten Zellen (**Abb. 14 B c**).

Nur sehr wenige naive CD8⁺ T-Zellen, aber etwa die Hälfte aller auf dem Deckglas ausgebreiteten SEA-stimulierten CD8⁺ T-Zellen, nahmen die für T-Zellen typische Migrationsform an („gestreckt“, **Abb. 14 B b, C a ii**). Bei den Jurkat-Zellen konnten mit den genutzten gereinigten Glas-Deckgläsern oder Poly-L-Ornithin-beschichteten Deckgläsern keine Zellen in dieser Zellform identifiziert werden. In anderen Studien mit Poly-L-Lysin-beschichteten Deckgläsern und Kulturmedium statt Ringer-Lösung konnten Jurkat-Zellen über diese Deckgläser migrieren (*Backes et al. 2018*). Viele SEA-stimulierte CD8⁺ T-Zellen bildeten nicht nur Lamellopodien in das umgebende Medium aus, sondern nahmen sogar die Migrationsform im Medium an, mit einem schmalen Kontaktpunkt auf dem Deckglas und dem breiten Zellkörper mit dem Zellkern im Medium (**Abb. 14 C a iii**). Da die Zellen stark an den unbeschichteten bzw. Poly-L-Ornithin-beschichteten Deckgläsern anhafteten, konnten die meisten Zellen, die die Migrationsform auf dem Deckglas annahmen, nicht über die Deckglasoberfläche migrieren. Manche dieser Zellen nahmen deshalb artifiziell stark „gestreckte“ Formen an (**Abb. 14 C b**).



b Lamellopodien-Bildung in das umgebende Medium

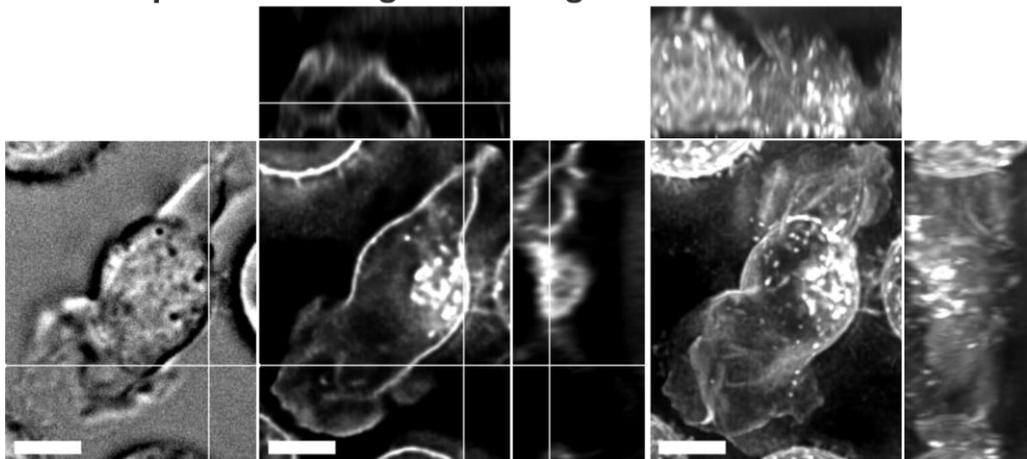


Abb. 14: Morphologische Zellformen von auf Glas-Deckgläsern aufbrachten T-Zellen

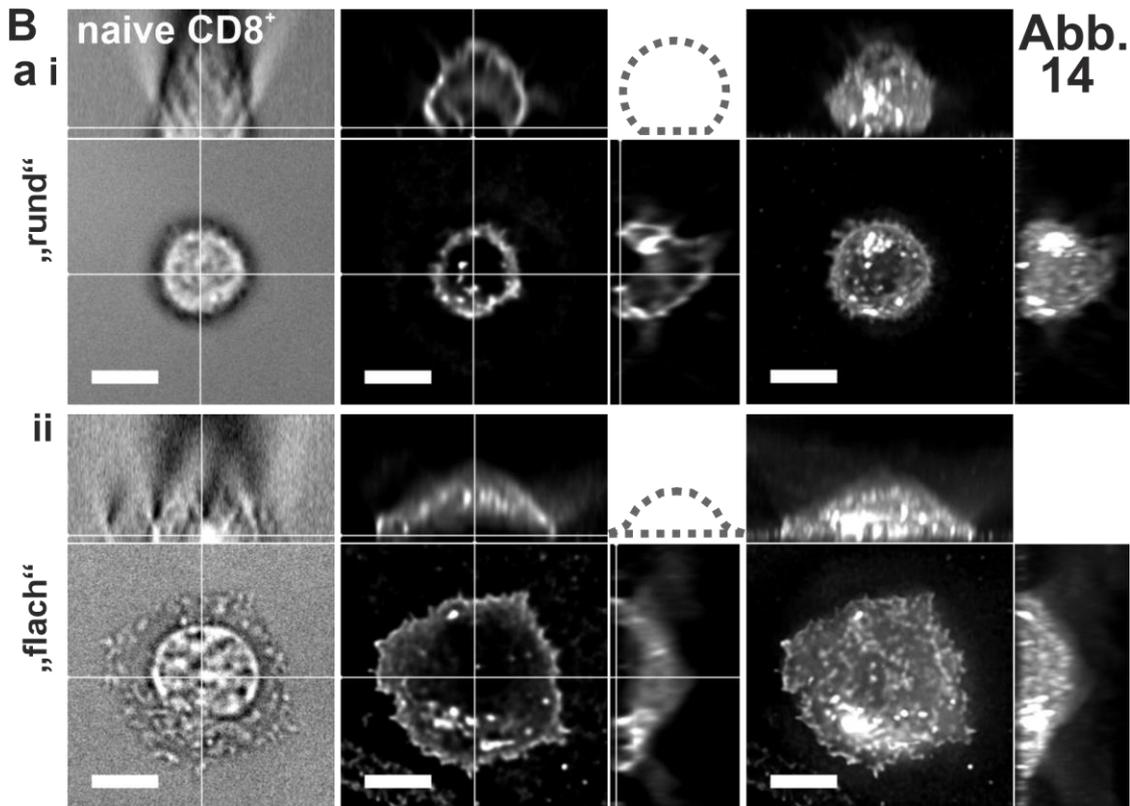
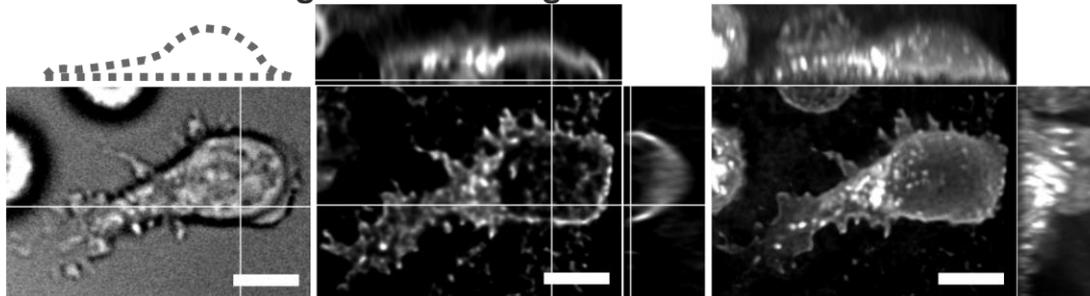


Abb. 14

b Zell-Ausstreckung auf dem Deckglas



C Zell-Zell-Kontakt zwischen T-Zellen

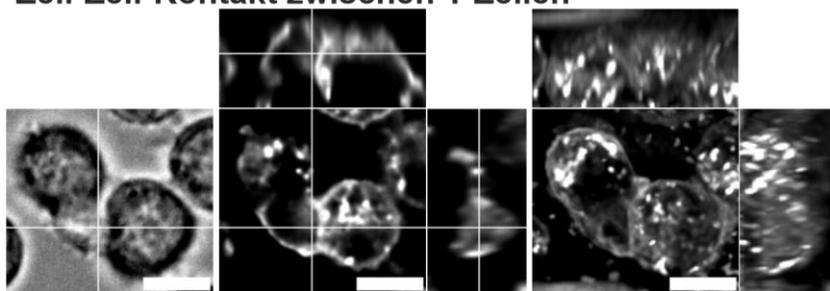


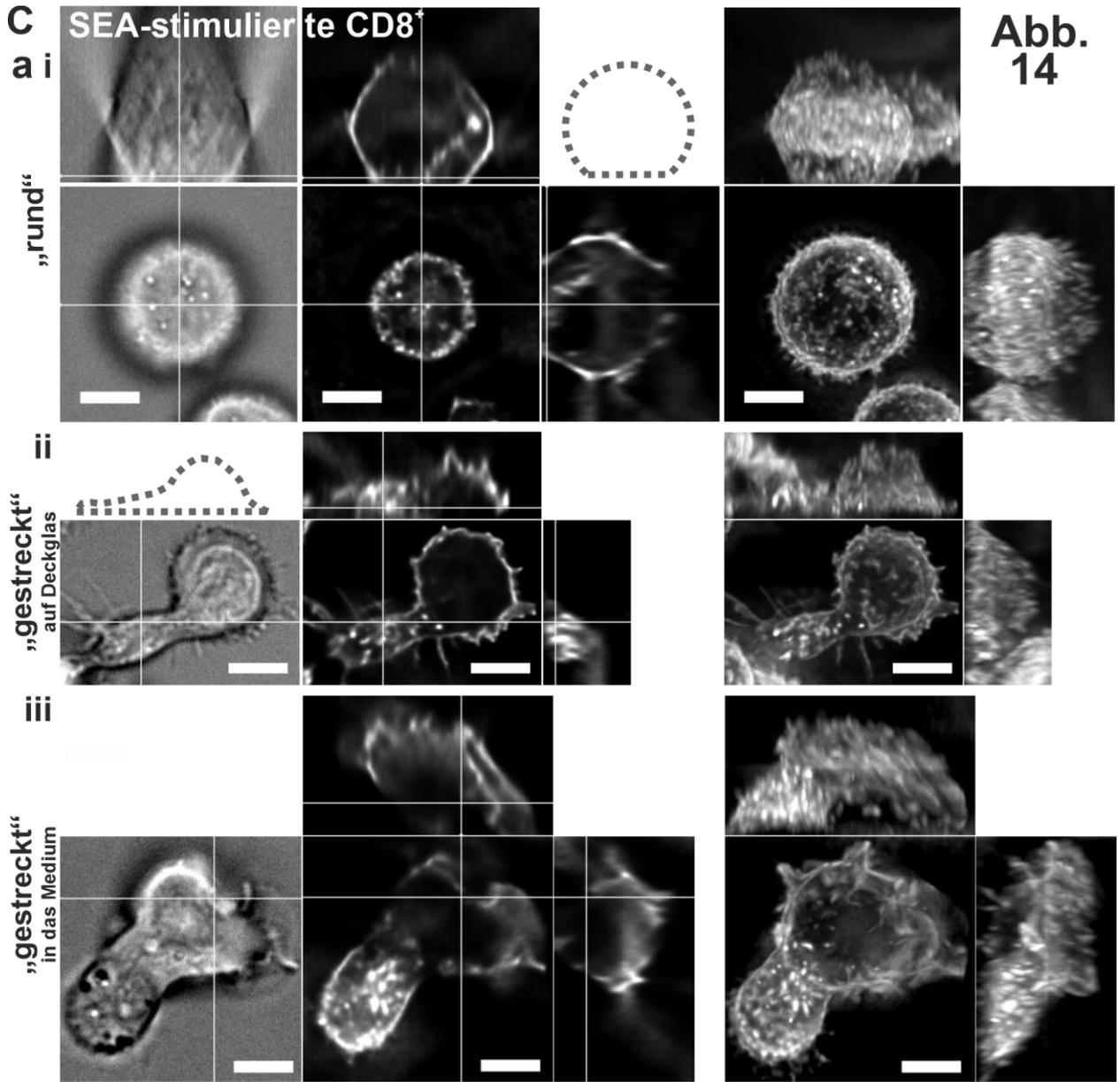
Abb. 14:
Morphologische Zellformen
von auf Glas-Deckgläsern
aufgebrachten T-Zellen.

Einzelzell-Ausschnitte drei verschiedener T-Zelltypen in verschiedenen Zellformen 5-30 Minuten nach Zugabe der T-Zellen zu Ringer-Lösung bei 37°C. Die Zellen wurden mit CellMask deep red (weiß, Membran), MitoTracker red, TubulinTracker green und Hoechst 33342 (nicht gezeigt) gefärbt und im Hellfeld und der Fluoreszenz als Z-Stapel (0,25 µm Z-Abstand) aufgenommen. Die aufgenommenen Fluoreszenz-Z-Stapel wurden iterativ dekonvolviert und sind als 3D-Schnittansichten und 3D-Maximal-Intensitäts-Projektionen (MIP) dargestellt. Die Schnitte der Schnittansichten sind durch weiße Hilfslinien angezeigt.
Maßstabsbalken, XYZ-Pfeile: 5 µm

A Typische Zellformen von T-Zellen auf Glas-Deckgläsern am Beispiel von Jurkat CD4⁺ T-Zellen (humane T-Lymphoma-Zelllinie). Neben einer relativ runden (a i) und einer gleichmäßig auf dem Deckglas abgeflachten Form (A a iii) wurde zusätzlich eine Zwischenform als „halbrund“ definiert (A a ii). Eine Jurkat-Zelle mit zwei ins Kulturmedium ausgebildeten Lamellopodien ist als Beispiel dieser Zellform für alle T-Zellen in A b gezeigt.

B Typische Zellformen von T-Zellen auf Glas-Deckgläsern am Beispiel von humanen unstimulierten („naiven“) CD8⁺ T-Zellen aus Blutfiltern der Thrombozyten-Spende mit Beispielen von als „rund“ (B a i) und „flach“ (B a ii) definierten Zellformen. Eine Beispielzelle in der „gestreckten“ Migrationsform ist in B b gezeigt. Eine naive CD8⁺ T-Zelle im Kontakt mit der Nachbarzelle mittels Lamellopodien-Ausbildung ist als Beispiel für Zell-Zell-Kontakte für alle T-Zellen in B c gezeigt.

C Beispiele für humane SEA-stimulierte CD8⁺ T-Zellen in der „runden“ (C a i) und „gestreckten“ (C a ii) Zellform. Neben der „Ausstreckung“ auf dem Deckglas streckten sich die Zellen auch in das umgebende Medium aus (C a iii). Durch eine starke Anhaftung an die verwendeten Deckgläser kam es zu artifiziell stark „gestreckten“ Zellformen (b). Die weißen Punkte in der Z-Perspektive deuten die Zellhöhe an.



b Deckglas-Artefakte

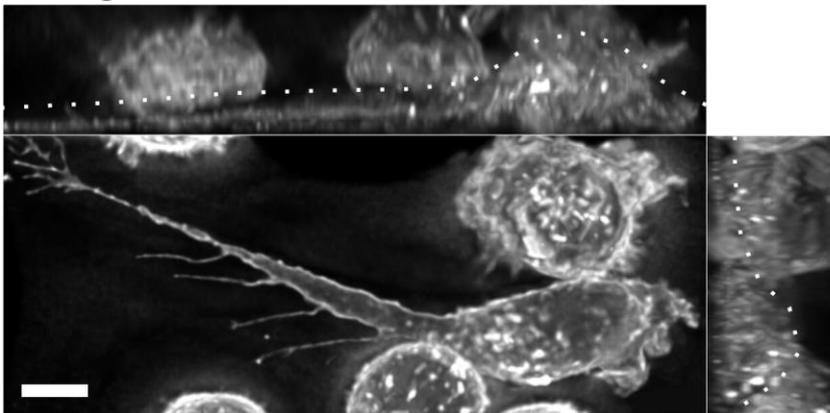


Abb. 14: Morphologische Zellformen von auf Glas-Deckgläsern aufgebracht T-Zellen

Formänderung - Dynamik. Zusätzlich zur allgemeinen Kategorisierung der T-Zell-Formänderung wurden die T-Zellen in Aufnahmen, die entweder 5 oder 30 Minuten nach Zugabe der Zellen angefertigt wurden, auf Zellformänderungen an die verwendeten Deckgläser untersucht (**Abb. 15**).

Bei den Jurkat-Zellen waren nach 5 min 6 % und nach 30 min 22 % der Zellen auf dem Deckglas ausgebreitet, indem sie die in Abbildung 14 definierte „halbrunde“ oder „flache“ Form annahmen.

Bei den naiven CD8⁺ T-Zellen nahmen nach 5 min 4 % und nach 30 min 15 % die „halbrunde“ oder präferiert die „flache“ Zellform auf dem Deckglas an. (s. Abb. 14 B a ii). In den für diese Analyse genutzten Aufnahmen konnten keine „gestreckten“ naiven CD8⁺ T-Zellen detektiert werden.

Nach 5 min hatten sich 22 Prozent der SEA-stimulierten T-Zellen auf dem Deckglas ausgebreitet, davon 40 % in der „gestreckten“ Migrationsform (s. Abb. 14 C a ii). Nach 30 min waren 27 % ausgebreitet, davon 64 % in der Migrationsform.

Die Ausbreitung auf dem Deckglas war demnach bei naiven CD8⁺ T-Zellen am seltensten aufgetreten, die sich dann aber größtenteils sehr flach ausbreiteten. Bei SEA-stimulierten CD8⁺ T-Zellen waren nach 5 min bereits deutlich mehr Zellen auf dem Deckglas ausgebreitet, als bei beiden anderen T-Zelltypen. Der Anteil an formverändernden T-Zellen nahm bei allen drei T-Zelltypen mit der Zeit zu, mit einem zusätzlichen Anstieg des Anteils „gestreckter“ Zellen bei den SEA-stimulierten CD8⁺ T-Zellen.

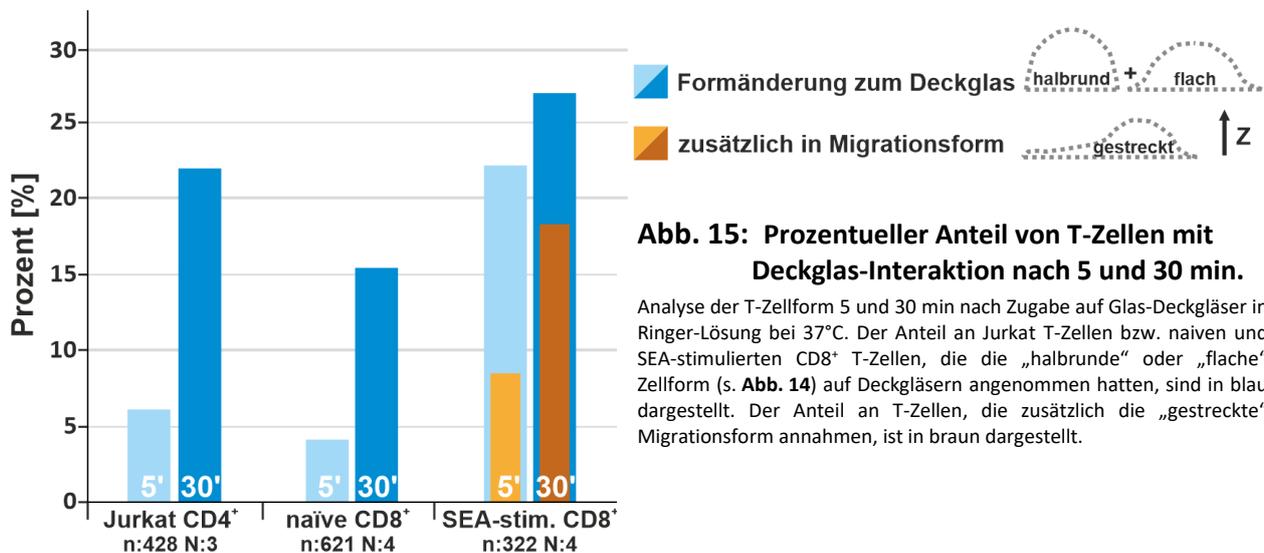


Abb. 15: Prozentueller Anteil von T-Zellen mit Deckglas-Interaktion nach 5 und 30 min.

Analyse der T-Zellform 5 und 30 min nach Zugabe auf Glas-Deckgläser in Ringer-Lösung bei 37°C. Der Anteil an Jurkat T-Zellen bzw. naiven und SEA-stimulierten CD8⁺ T-Zellen, die die „halbrunde“ oder „flache“ Zellform (s. **Abb. 14**) auf Deckgläsern angenommen hatten, sind in blau dargestellt. Der Anteil an T-Zellen, die zusätzlich die „gestreckte“ Migrationsform annahmen, ist in braun dargestellt.

Zusammenfassung. HeLa-Zellen (**Abb. 12**) veränderten ihre durch Lamellopodienbildung über das Deckglas stark abgeflachte Zellform über mehrere Stunden nicht. Die Mehrheit der T-Zellen verblieb innerhalb von 30 Minuten in der runden Zellform, mit einigen Zellen, die Lamellopodien in das umgebende Medium ausbildeten (**Abb. 13**). Innerhalb von 30 Minuten breitete sich etwa ein Fünftel der T-Zellen ähnlich wie die HeLa-Zellen auf den verwendeten Glas-Deckgläsern aus oder „streckten sich“ im Fall von SEA-stimulierten CD8⁺ T-Zellen zum Teil in die Migrationsform aus (**Abb. 14, Abb. 15**). Der Anteil dieser Zellen nahm mit fortlaufender Zeit auf dem Deckglas zu (**Abb. 15**).

3.1.2 Zytoskelett- und Organell-Morphologie in HeLa- und T-Zellen

Im folgenden Kapitel werden die in Kapitel 3.1.1 eingeführten HeLa-Zellen und verschiedenen T-Zelltypen bezüglich der Morphologie und Lokalisation der Zytoskelett-Bestandteile Aktin und Tubulin und der Organellen Zellkern, ER, Zentrosom, Mitochondrien und Vesikel im Detail miteinander verglichen.

3.1.2.1 Morphologie und Dynamik des Aktin-Zytoskeletts in HeLa- und T-Zellen und Lamellopodien-Geschwindigkeiten

Um die für die Zellformänderung essenzielle Aktin-Dynamik in lebenden Zellen zu untersuchen, wurden unstimulierte („naive“) CD8⁺ T-Zellen mithilfe von anti-CD3- und anti-CD28-Antikörper-beschichteten Plastik-„Beads“ zu Effektorzellen stimuliert und mit dem Plasmid „Lifeact-mEGFP“ transfiziert. Die Expression dieses Plasmids führt zur Bildung von monomerischem EGFP mit einer angefügten Aminosäure-Sequenz, die an filamentöses Aktin bindet (*Riedl et al. 2008*).

Aktin-Morphologie. HeLa-Zellen, die mit diesem Plasmid transfiziert wurden (**Abb. 16 a**), zeigten die für adhärenente Zellen typischen Aktin-Stressfasern, die deutlich dicker erschienen, als einzelne Aktin-Filamente (s. Abb. 2 und 4). Kortikales Aktin, welches unter der Plasmamembran vorhanden ist, wurde in allen 8 untersuchten HeLa-Zellen durch die deutlich stärker fluoreszierenden Stressfasern überstrahlt und war kaum zu detektieren. Deutlicher ist das kortikale Aktin in der Z-Perspektive zu erkennen (weißer Pfeil).

In allen untersuchten ruhenden, runden T-Zellen (n: 200+, N: 10+) war die Aktin-Färbung kaum von einer Plasmamembran-Färbung zu unterscheiden (s. Abb. 14). Dies zeigt, dass in der „runden“ Zellform nur ein kortikales Aktin-Netzwerk an der Plasmamembran vorhanden ist (**Abb. 16 b**). Zeitrafferaufnahmen der so transfizierten T-Zellen bei 37°C (Beispiel in **Abb. 16 c, Film 1**) zeigten ein höchst plastisches Verhalten mit ständiger Zellformänderung und „Ausstreckungen“ in das umgebende Medium in Form von blatt- oder fingerförmigen Lamellopodien, die sich bei Kontakt mit dem Deckglas fächerförmig ausbreiteten (weiße Pfeile). Allen Ausstülpungen ging an der Austrittsstelle eine Akkumulation von filamentösem Aktin voraus. Nach der Rückbildung eines Lamellopodiums verblieb meist ein punktförmiges Aktin-Signal, das bis zum Experimentende detektierbar blieb (rote Pfeile) und mit weiteren dieser Signale akkumulierte.

Lamellopodien-Geschwindigkeiten. Die anhand einer Beispielizele in **Abb. 16 c** und **Film 1** gezeigten Lifeact-mEGFP-exprimierenden Bead-stimulierten CD8⁺ T-Zellen wurden mithilfe manueller Nachverfolgung („Tracking“) in der XY-Richtung ausgewertet (**Abb. 17**). Dazu wurden die Z-Stapel-Aufnahmen von 6 Zellen aus der vorher genannten Versuchsreihe zu den XY-Dimensionen zusammengelegt (XY-Maximal-Intensitäts-Projektion) und seitliche Ausstülpungen manuell über 10 Minuten „getrackt“. Ebenso wurde die maximale Aktin-Fluoreszenz und die Mitte der T-Zelle nachverfolgt. Zur Veranschaulichung sind in **Abb. 17 a** alle für die Beispielizele aus Abb. 16 c angelegten „Tracks“ angezeigt. Die Tracks für Zellmitte (schwarz) und maximale Aktin-Fluoreszenz (rot) sind von Minute zu Minute dargestellt. Lamellopodien-Tracks wurden in Zeitpunkten nach ihrem Ende ausgeblendet. Die Geschwindigkeitswerte der nachverfolgten Lamellopodien wurden nach der Normierung der Lamellopodien-Tracks mit dem Track der Zellmitte bestimmt (**Abb. 17 b**).

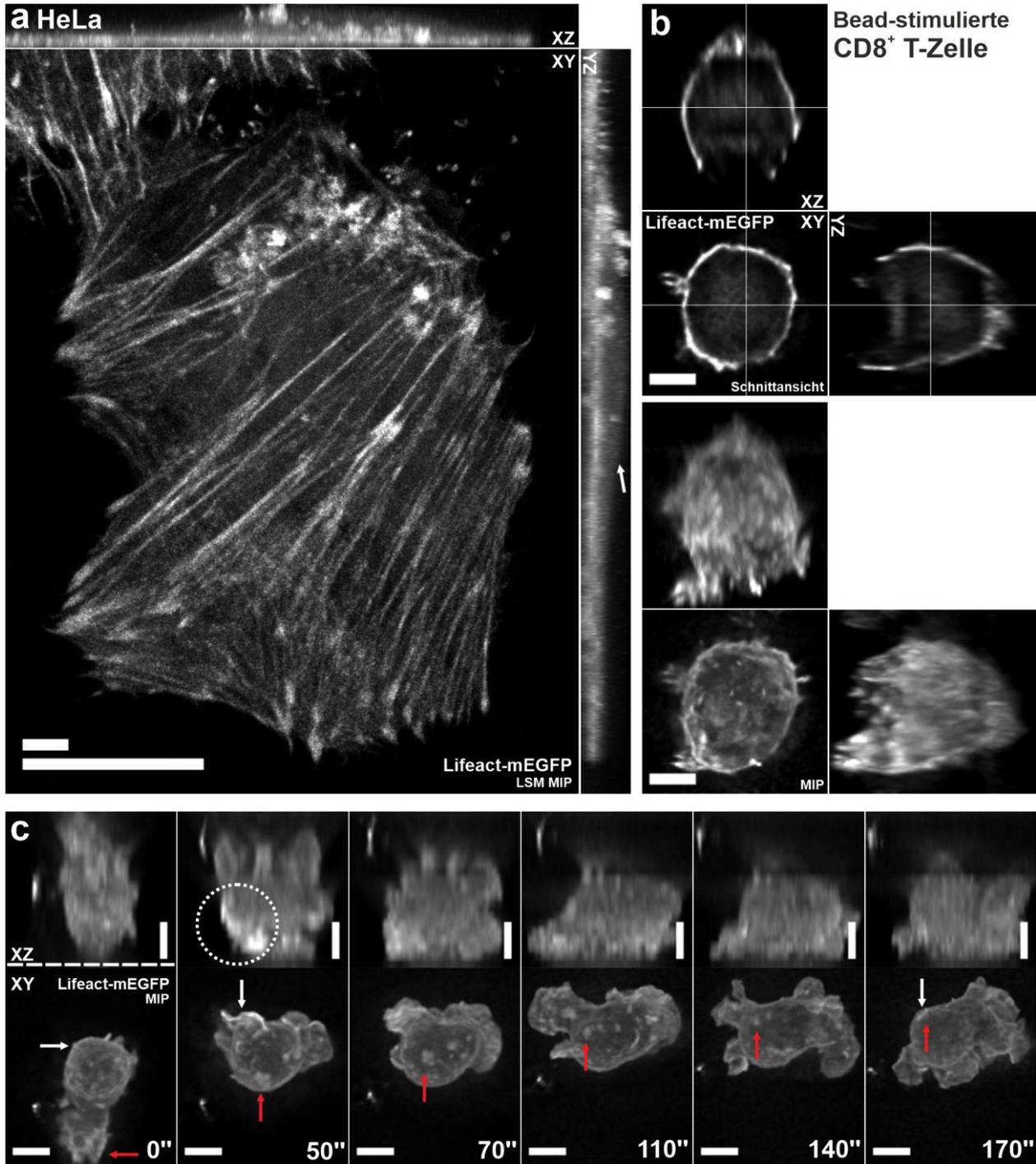


Abb. 16: Fluoreszenz-Z-Stapel-Aufnahmen von Lifact-mEGFP-transfizierten Zellen.

a Laser-Scanning-Mikroskopie (LSM)-Z-Stapel-Aufnahme (Maximal-Intensitäts-Projektion, MIP) einer lebenden Lifact-mEGFP-transfizierten HeLa-Zelle, mit für adhärenztypischen Aktin-Stressfasern. Kortikales Aktin ist in der Z-Ansicht schwach zu erkennen (weißer Pfeil).

b Dekonvolvierte Epi-Fluoreszenz-Z-Stapel-Aufnahme (0,5 µm Z-Abstand) einer sich gerade auf dem Deckglas absetzenden Lifact-mEGFP-transfizierten Bead-stimulierten CD8⁺ T-Zelle. Schnittansicht (i) und MIP (ii) zeigen größtenteils eine kortikale Färbung.

c Dekonvolvierte Z-Stapel-Zeitrafferaufnahme (0,5 µm Z-Abstand, 5 s Zeitauflösung) einer Lifact-mEGFP-transfizierten, auf dem Deckglas stationären, Bead-stimulierten CD8⁺ T-Zelle. Gezeigt sind die XY- und die XZ-Maximal-Intensitäts-Projektionen ausgewählter Zeitpunkte über einen Zeitraum von 170 Sekunden. Die gesamte Aufnahme umfasst einen deutlich längeren Zeitraum von 600 Sekunden (siehe **Film 1**). Detailliert aufgelöst ist die Aus- und Rückbildung eines Lamellopodiums über das Deckglas (weiße Pfeile). Eine nach Lamellopodien-Rückbildung entstehende punktförmige Aktin-Akkumulation ist durch rote Pfeile gekennzeichnet. n: 22, N: 3. **Film1:** dropbox.com/s/yguwx2x30jg7ljy/Film1.AVI?dl=0



Film 1

Maßstabsbalken: 5 bzw. 20 µm

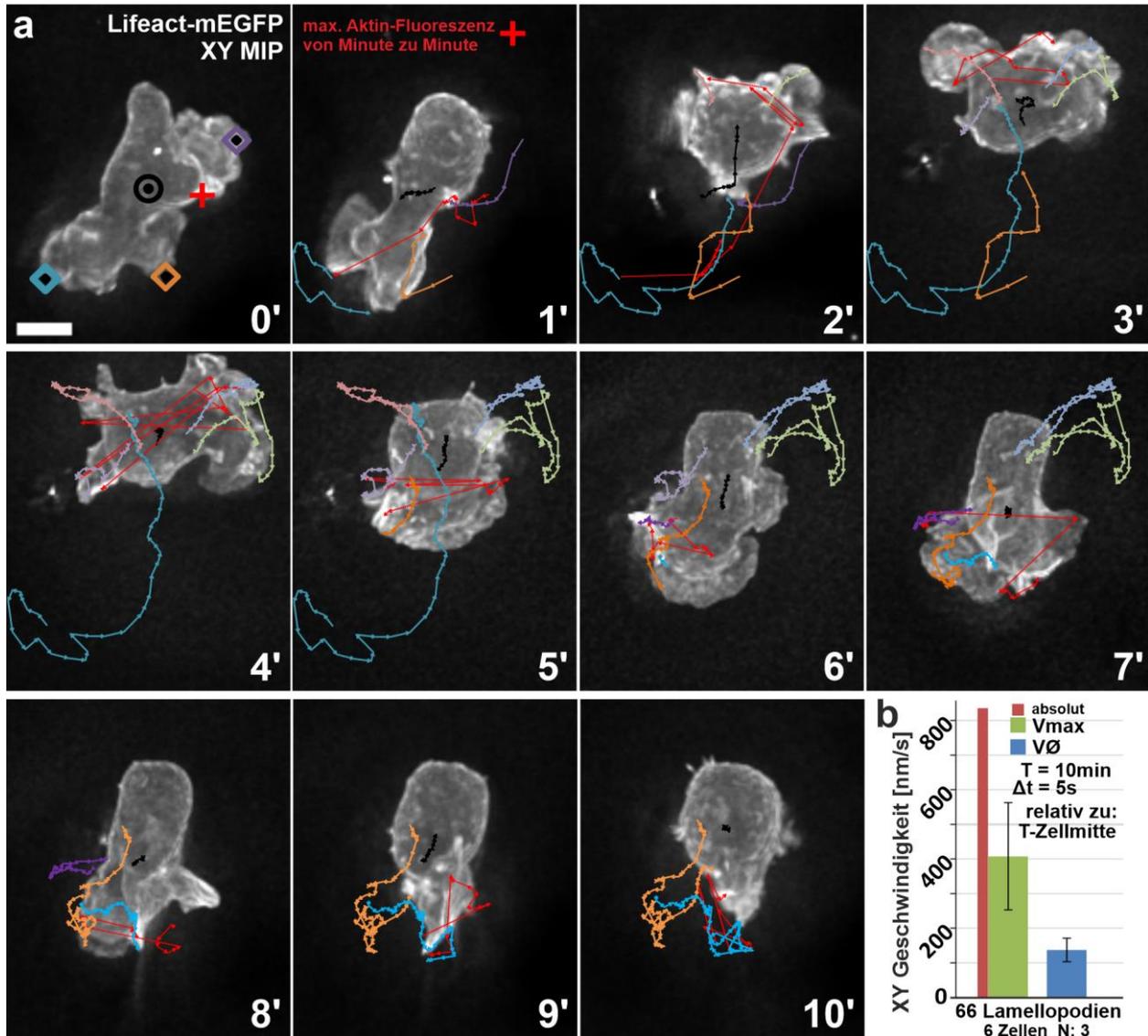


Abb. 17: Manuelles XY-Tracking von Lamellopodien stationärer Bead-stimulierter CD8⁺ T-Zellen.

Bead-stimulierte CD8⁺ T-Zellen wurden mit Lifeact-mEGFP transfiziert und lebend bei 37°C in Kulturmedium als Fluoreszenz-Z-Stapel-Zeitraffer (0,5 μm Z-Abstand, 5 s Zeitauflösung) aufgenommen. Die Aufnahmen wurden iterativ dekonvolviert. **Maßstabsbalken: 5 μm**

a XY-Maximal-Intensitäts-Projektionen der Beispielizele aus **Abb. 16 c** alle 60 Sekunden über den gesamten Experiment-Zeitraum von 10 Minuten. Überlagert sind manuell erstellte XY-Tracks der Enden nachverfolgter Lamellopodien in verschiedenen Farben, zur Übersicht ausgeblendet ab Ende des jeweiligen Tracks. Die maximale detektierte Aktin-Fluoreszenz zu jedem Zeitpunkt ist für den jeweiligen Zeitraum (12 x 5 Sekunden) mit roten Kreuzen, ihr Verlauf mit roten Linien dargestellt. Die Zellmitte ist ebenso mit schwarzen Linien gekennzeichnet.

b Insgesamt wurden in 6 Zellen aus 3 Experimenten 66 Lamellopodien von Beginn der Ausbildung an bis zur vollständigen Rückbildung in der XY-Richtung nachverfolgt. Dabei wurde immer die Mitte der Front markiert. Zum Ausgleich der Zellbewegung wurden alle Lamellopodien-Tracks mit dem Track der Zellmitte normiert. Der höchste berechnete Geschwindigkeitswert (absolut, rot), die durchschnittliche Maximalgeschwindigkeit (V_{max} , grün), und die mittlere Durchschnittsgeschwindigkeit ($V_{\text{Ø}}$, blau) sind in Nanometer pro Sekunde (nm/s) dargestellt. Fehlerbalken sind Standardabweichung.

Film1: dropbox.com/s/yguwx2x30jg7lij/Film1.AVI?dl=0



Film 1

Die Zellen bildeten mehrere Ausstülpungen in eine oder zwei Richtungen gleichzeitig aus. Während in der Beispielizele die Ausbreitung auf dem Deckglas fächerförmig in XY-Richtung verlief, wiesen die Ausstülpungen in das Medium eine Fächerform in der Z-Richtung auf. Durch die Verschiebung des Zellkerns in eine Zellausstülpung wanderte die Zellmitte in die Bewegungsrichtung der Lamellopodien (5'-8°). Die durchschnittliche Maximalgeschwindigkeit (V_{max}) aller getrackten Lamellopodien betrug 408 Nanometer pro Sekunde (nm/s), mit einem Spitzenwert von 835 nm/s. Die mittlere Durchschnittsgeschwindigkeit ($V_{\text{Ø}}$) betrug 137 nm/s.

Aktin bei Migration. Neben der „Ausstreckung“ in das Kulturmedium streckten sich viele stimulierte CD8⁺ T-Zellen auf dem Deckglas in die für T-Zellen typische Migrationsform aus (s. *Barreiro et al. 2007*). Durch den Einsatz von „Total-Internal-Reflection-Fluorescence“ (TIRF)-Mikroskopie und Fibronektin-beschichteten Deckgläsern konnte die Aktin-Dynamik von zwei über Deckgläser migrierenden SEA-stimulierten CD8⁺ T-Zellen etwa 200 nm nahe dem Deckglas aufgelöst werden (grün) (**Abb. 18, Film 2**). Zusätzlich wurde das Aktin-Signal in der Epi-Fluoreszenz aufgenommen (rot). Die Aufnahmen umfassten einen Zeitraum von 30 Minuten mit einer zeitlichen Auflösung von 5 Sekunden. Eine Beispielzelle ist in **Abb. 18 a** über einen Zeitraum von knapp 14 Minuten zu ausgewählten Zeitpunkten gezeigt. Von der „Handspiegel“-Form ausgehend (Zeitpunkt 0) bildete die Zelle zunächst auf beiden Seiten des Zellkerns in Laufrichtung Lamellopodien aus (2'55“, 6'30“, 11'50“), um danach den Zellkern in eine der beiden Seiten hineinzubewegen (3'25“, 9'30“, 12'45“). Anschließend wurde der Uropod nachgezogen und die Handspiegel-Form wieder angenommen (5'40“, 11'50“, 13'50“). Dieser sich kontinuierlich

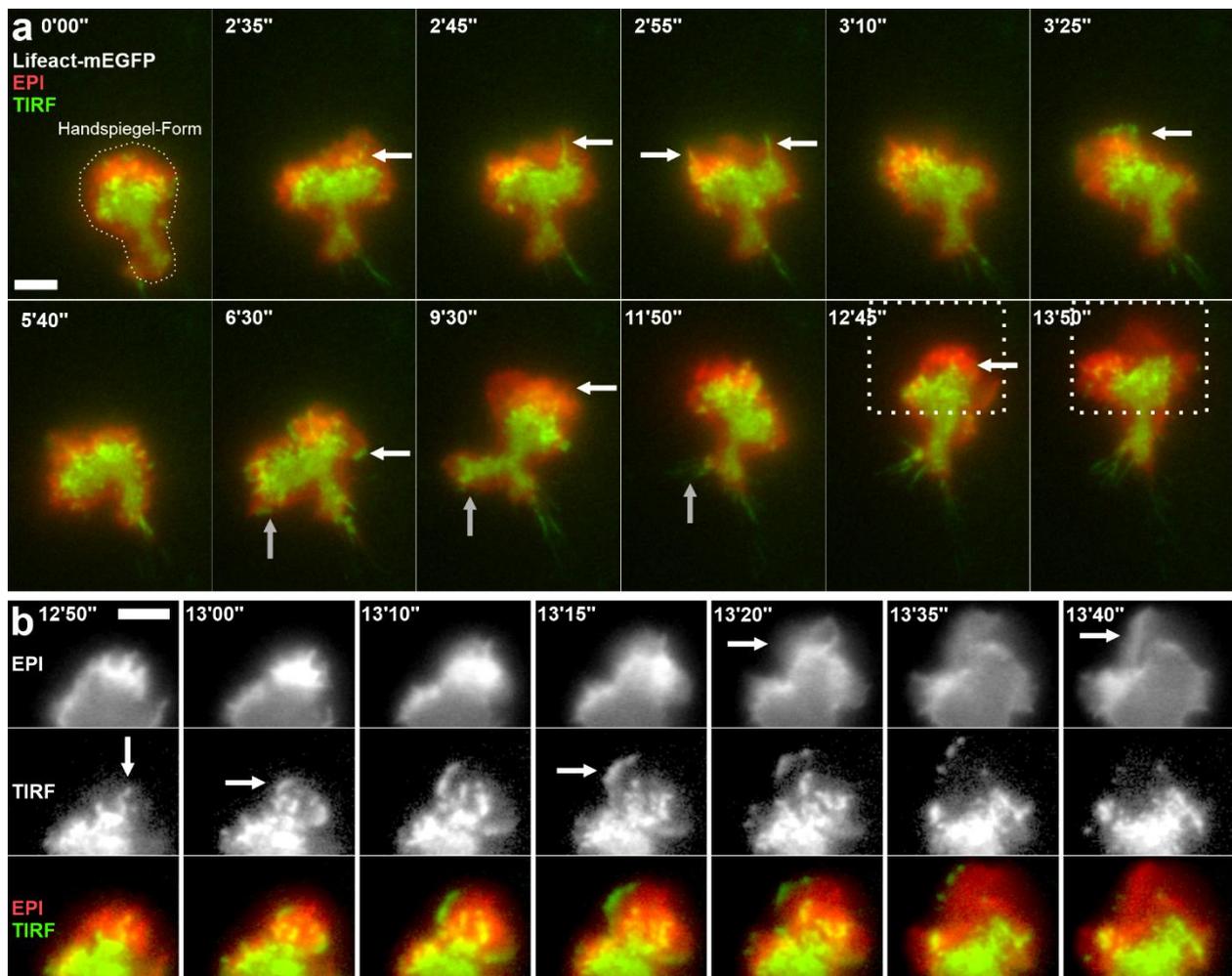


Abb. 18: Aktin-Dynamik in migrierenden SEA-stimulierten CD8⁺ T-Zellen.

Llifeact-mEGFP-transfizierte CD8⁺ T-Zellen wurden bei Raumtemperatur auf Fibronektin-beschichtete Deckgläser in Kulturmedium aufgetragen und in der Epi-Fluoreszenz und mit „Total-Internal-Reflection-Fluorescence“ (TIRF) aufgenommen. n, N: 2 Maßstabsbalken: 5 μ m

Gesamte Aufnahme der Beispielzelle: siehe **Film 2: dropbox.com/s/gdbe4q6rz749mog/Film2.AVI?dl=0**

a Ausgewählte Zeitpunkte der Zeitrafferaufnahme mit Epi-Fluoreszenz (rot) und TIRF-Kanal (grün) der Aktin-Filament-Fluoreszenz. „Fühler“- und „Fächer“-Bildung bei der Lamellopodien-Ausstreckung sind mit weißen Pfeilen, die Rückbildung von Lamellopodien ist mit grauen Pfeilen gekennzeichnet. Zellmitte V_{max} : 223 nm/s, $V\phi$: 21 nm/s, relativ zum Deckglas.

b Vergrößerter Ausschnitt zwischen 12'45" und 13'50" in voller Zeitaufösung (5 s) mit getrennten Kanälen sowie der Zusammenlegung (Epi rot, TIRF grün). „Fühler“- und „Fächer“-Bildung bei der Lamellopodium-Ausstreckung im TIRF-Kanal sowie die spätere Bildung des Lamellopodiums im Epi-Kanal sind mit weißen Pfeilen gekennzeichnet.



Film 2

wiederholende Vorgang nahm jedes Mal etwa 2-3 Minuten in Anspruch. Der TIRF-Kanal zeigte die Details der Aktin-Dynamik im Ablauf dieses Prozesses auf. Die Ausstülpung der Lamellopodien sah an der Membran zunächst nur wie ein dünner „Fühler“ oder „Finger“ aus (2‘55“, 11‘50“), der entweder wieder zurückgebildet wurde (3‘10“, Pfeil rechts) oder sich lateral in beide Richtungen ausbreitete (Pfeil links), wodurch Raum für den Zellkern geschaffen wurde (3‘25“). Dieser Vorgang wurde für die letzte Minute der Aufnahme für jeden Zeitpunkt vergrößert dargestellt (s. gepunkteter Rahmen), beide Aufnahmekanäle sind zusätzlich einzeln gezeigt (**Abb. 18 b**). Zunächst bildete sich ein „Fühler“ aus (12‘50“), von dem lateral jeweils eine „Wellenfront“ ausging, die sich ausbreitete (12‘55“-13‘35“). Auf diese Aktin-Wellenfront am Deckglas folgte im Epi-Fluoreszenzkanal die intrazelluläre Aktin-Akkumulation. Der Zellkörper bildete demnach dort Lamellopodien aus, die sich auch in das umgebende Medium erstreckten (13‘30“, 13‘40“).

3.1.2.2 Zellkern-Morphologie und -Lokalisation in HeLa- und T-Zellen

Durch die Färbung der Zellen mit dem blau-fluoreszierenden organischen Farbstoff „Hoechst 33342“ wurde doppelsträngige DNS (dDNS) in den zuvor eingeführten Zellen (s. 3.1.1) visualisiert. Aufnahmen im „blauen Fluoreszenzkanal“ konnten aufgrund der schlechten Optimierung des Mikroskops für UV-Anregung nicht mithilfe einer Referenzmessung dekonvoluiert werden. Stattdessen wurde für diesen Fluoreszenzkanal eine theoretische „Point-Spread-Function“ (PSF) mit den Parametern des Experiments berechnet. In **Abb. 19 c** sieht man in den Z-Perspektiven das Ergebnis dieser Methodik. Der Zellkern erscheint zu weit in das Deckglas gestreckt und an der Zell-Oberseite wurde der Zellkern nicht vollständig dargestellt. Dennoch konnten alle Aufnahmen auf das annähernd korrekte Volumen normiert werden.

In der adhärennten Epithel-Zelllinie HeLa war der Zellkern immer zentral an der höchsten Erhebung der Zelle vom Deckglas anzufinden (n: 83, N: 3; Beispiele in **Abb. 19 a**). Die Form der Zellkerne variierte von fast kreisrunden Zellkernen über ovale Formen bis hin zu nierenförmigen Gebilden. Bei allen Zellkernen konnten mehr oder weniger ausgeprägte Einbuchtungen nachgewiesen werden.

Bei den im Rahmen dieser Arbeit untersuchten T-Zellen (2000+ Jurkat CD4⁺, N: 10+; 800+ naive CD8⁺, N: 4 und 1000+ SEA-stimulierte CD8⁺, N: 8+; Beispiele in **Abb. 19 b, c**) nahm der Zellkern einen auffällig großen Teil des Zellinneren ein, sodass der restliche Raum für das Zytosol und die übrigen Zellorganellen sehr klein erschien. In allen untersuchten T-Zellen konnten mindestens eine oder mehrere Einbuchtungen des Zellkerns festgestellt werden. In den meisten T-Zellen war die größte Zellkern-Einbuchtung zum größten Zytosol-Volumen hin ausgerichtet, wo sich auch das Zentrosom befand (s. Abb. 22).

Durch die UV-Anregung des genutzten DNS-Farbstoffes kam es zur Anregung von NADH in Mitochondrien, welches schwach neben einer Zellkern-Einbuchtung in **Abb. 19 c** zu erkennen war (*Schaefer et al. 2019*). Die gleichzeitige Färbung mit „MitoTracker red“ zeigte eine räumliche Übereinstimmung beider Signale (s. Abb. 26 b).

Bei allen T-Zellen, die in das Medium oder auf dem Deckglas „gestreckt“ die Migrationsform annahmen oder „gestreckt“ andere T-Zellen kontaktierten, konnte der Zellkern an der Front der Zellen nachgewiesen werden (n: 500+, N: 13). Die ausgeprägteste Zellkern-Einbuchtung war im Großteil dieser Zellen zum Zentrosom ausgerichtet (s. Abb. 23 b).

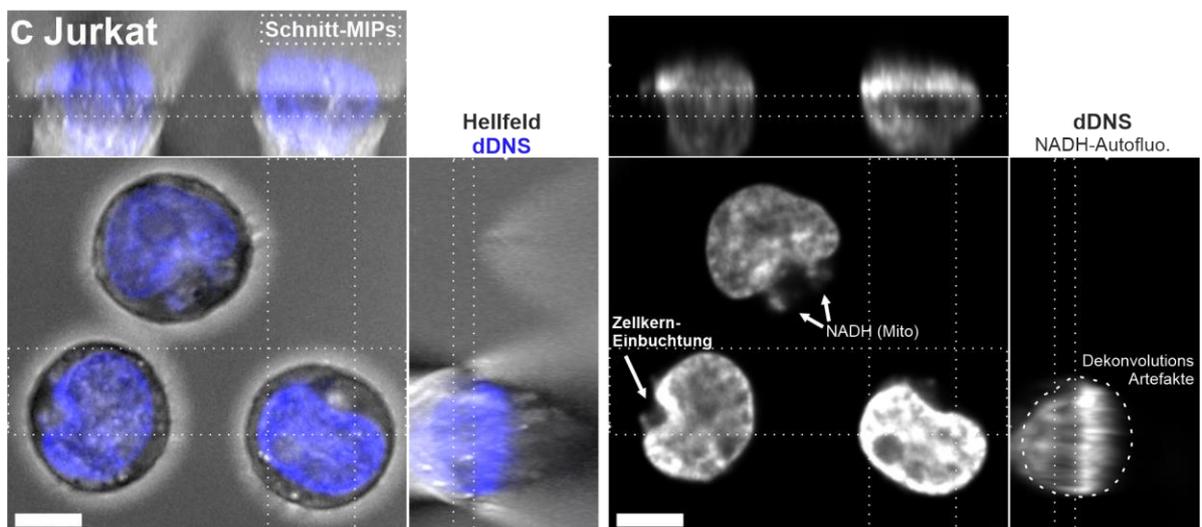
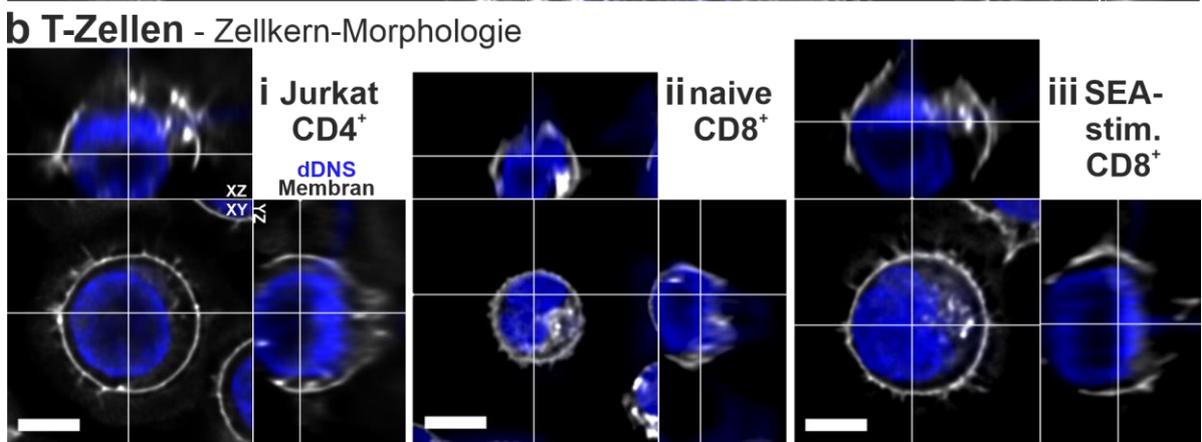
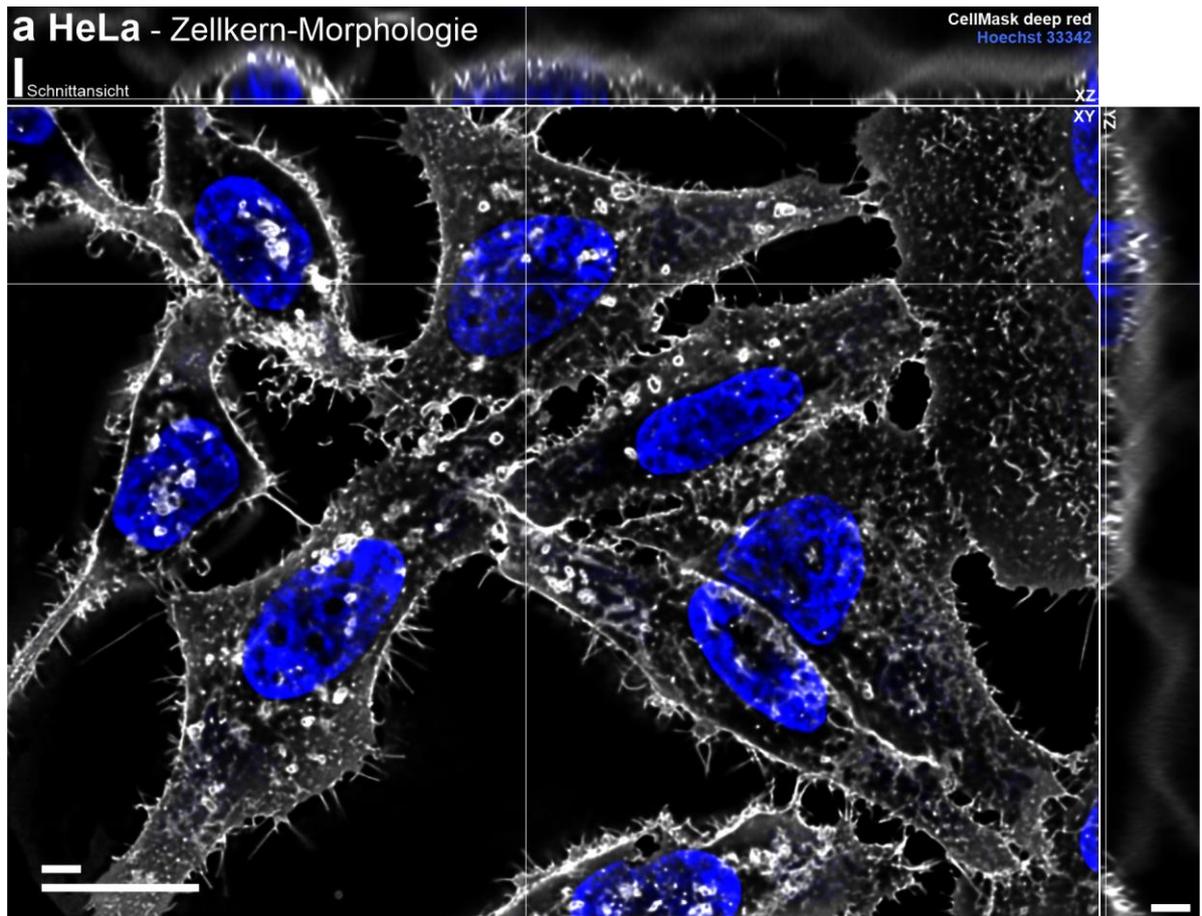


Abb. 19: Zellkern-Morphologie in HeLa-Zellen (a) und T-Zellen (b, c)

Abb. 19: Zellkern-Morphologie in HeLa- und T-Zellen.

Die Zellen wurden mit CellMask deep red (weiß, Membran), Hoechst 33342 (blau, dDNS), MitoTracker red und TubulinTracker green (nicht gezeigt) gefärbt und in Ringer-Lösung bei 37°C als Hellfeld- und Fluoreszenz-Z-Stapel (0,25 µm Z-Abstand) aufgenommen. Alle Fluoreszenzaufnahmen wurden iterativ dekonvolviert. **Maßstabsbalken: 5 bzw. 20 µm**

a 3D-Schnittansicht der in **Abb. 12** eingeführten Beispiel-Aufnahme von HeLa-Zellen.

b 3D-Schnittansichten durch repräsentative Jurkat CD4⁺ (i), naive CD8⁺ (ii) und SEA-stimulierte CD8⁺ T-Zellen (iii).

c Selektive 3D-Maximal-Intensitäts-Projektionen (Schnitt-MIP, siehe gepunktete weiße Rechtecke) von drei Jurkat CD4⁺ T-Zellen im Hellfeld und der dDNS-Färbung (blau bzw. weiß). Eine Zellkern-Einbuchtung und durch die UV-Anregung fluoreszierendes mitochondriales NADH sind durch weiße Pfeile angezeigt. Die gleichzeitige Färbung der Zellen mit MitoTracker red bestätigte die mitochondriale Lokalisation dieses Signals (s. **Abb. 26**). In den Z-Ansichten wird die Verzerrung der Zellkernform durch die gewählte Dekonvolutions-Methodik ersichtlich.

3.1.2.3 Morphologie des Endoplasmatischen Retikulums (ER) in HeLa-Zellen und Jurkat T-Zellen und ER-Volumina von Jurkat T-Zellen

Der Plasmamembran (PM)-ständige Kalziumkanal „Orai“ wird durch die Bindung mit oligomerisierten „STIM“-Proteinen geöffnet, die sich in der Membran des Endoplasmatischen Retikulums (ER) befinden. Da die räumliche Nähe des ER zur PM daher ausschlaggebend für diesen Mechanismus ist, wurde die Morphologie und die Verteilung des ER-Netzwerks in HeLa- und T-Zellen untersucht.

Das ER wird in Schemata des Zellinneren meist als ein Stapel von Membranen dargestellt, der sich in einem abgegrenzten Bereich der Zelle befindet (s. **Abb. 7, 8**). Aufnahmen des ER in lebenden HeLa- oder T-Zellen zeigen hingegen eine deutlich unterschiedliche Struktur: Hier erscheint das ER als Netzwerk von röhrenförmigen Strukturen, das sich mit Ausnahme des Zellkern-Bereichs durch die gesamte Zelle bis zur Plasmamembran erstreckt (Beispiele in **Abb. 20**). Durch die sehr flache Ausbreitung der adhärenen HeLa-Zellen auf dem Deckglas ließ sich die Feinstruktur des ER, vor allem in den äußersten Ausläufern der Zelle, deutlich erkennen (**Abb. 20 a**). Andere Studien mit modernsten „Superresolution“-Mikroskopen zeigten allerdings, dass diese Röhren mit etwa 60 nm Durchmesser deutlich feiner sind, als es mit der hier genutzten Methodik aufzulösen wäre (*Hein, Willig und Hell 2008; Schroeder et al. 2019*). Dennoch wird in den hier gezeigten Aufnahmen die Ausbreitung des ER durch das gesamte Zytosol bis zur PM ersichtlich.

Um in den relativ kleinen und runden T-Zellen das ER darstellen zu können, wurden Zellen der CD4⁺ T-Zelllinie Jurkat mit dem Plasmid „ER-TagRFP-T“ transfiziert und das ER mittels einer Kombination aus Laser-Scanning-Mikroskopie (LSM) und Dekonvolution visualisiert (**Abb. 20 b**). So konnte auch in diesen Zellen ein Netzwerk aus Röhren nachgewiesen werden, wobei es hier deutlich feiner und dichter erschien als in den HeLa-Zellen. In allen 15 untersuchten Jurkat T-Zellen aus 3 Experimenten konnten ER-Strukturen im gesamten Zellinneren mit Ausnahme des Zellkern-Bereichs nachgewiesen werden. Jurkat-Zellen, die ihre Zellform veränderten und sich auf dem Deckglas ausbreiteten (n: 11), zeigten trotz der Zellformänderung im gesamten Zytosol, auch in ihren Lamellopodien, ER-Strukturen (**Abb. 20 b ii**).

Volumenberechnungen des ER-Signals dieser 15 Zellen mit der hier erreichten Auflösung (FWHM: XY: Ø 114 nm, Z: Ø 412nm; s. **Abb. 11**) ergaben ein durchschnittliches ER-Volumen pro Zelle von 107,6 Femtolitern (fl) mit einer Standardabweichung von 48,9 fl. Das mittlere Gesamtvolumen der in diesen Experimenten eingesetzten Jurkat-Zellen wurde durch manuelles Ausfüllen der 3D-Binärbilder auf 401,5 fl (SD: 111,8 fl) bestimmt. Das ER hatte demnach daran einen Anteil von 26,4 % (SD: 9,3 %). Allerdings sind diese Werte aufgrund der vor allem in der Z-Richtung zu schwachen Auflösung der hier verwendeten Mikroskopie-Methodik als bis zu 19-fach überhöht anzusehen.

Ergebnisse

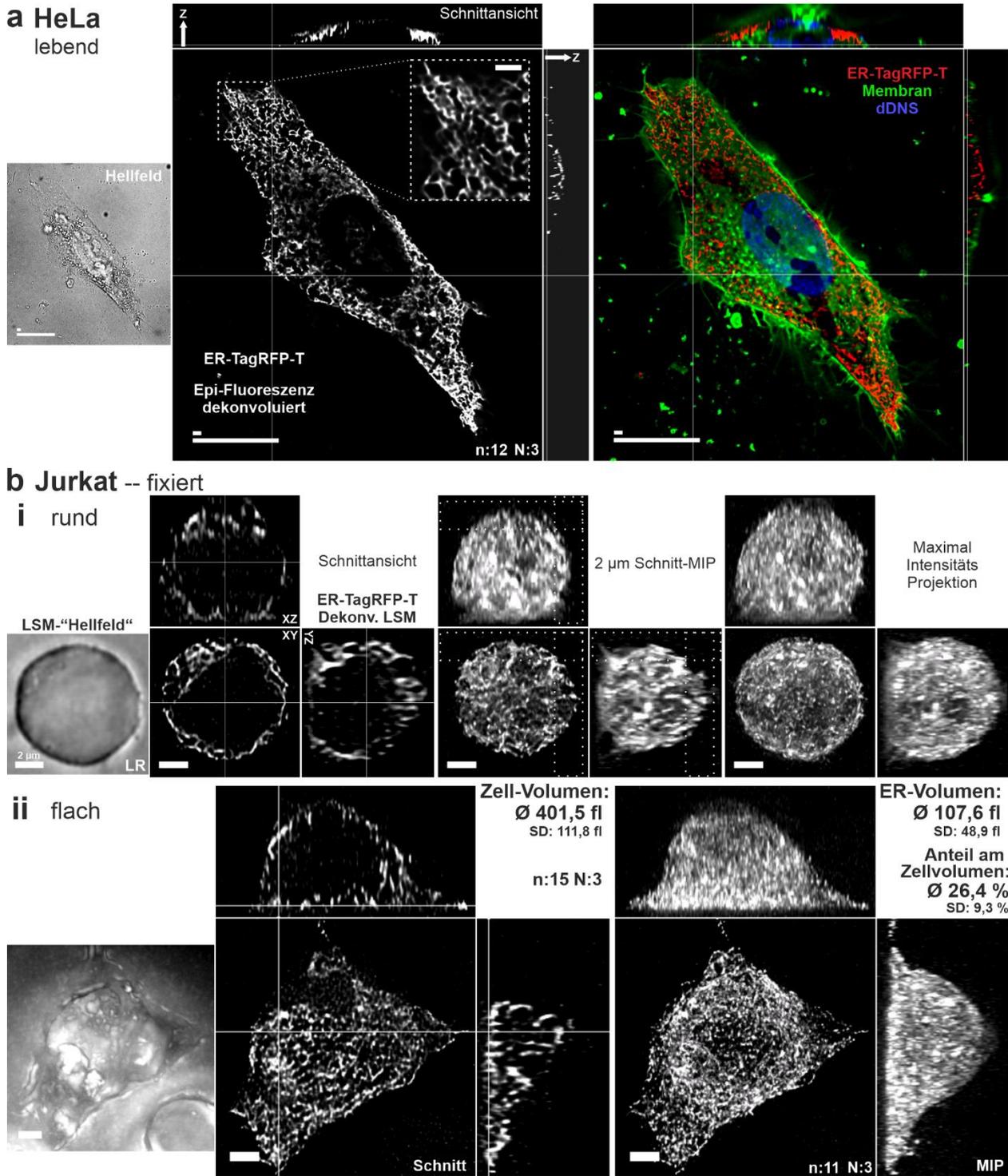


Abb. 20: ER-Morphologie in HeLa-Zellen und Jurkat CD4⁺ T-Zellen.

a Hellfeld- und Fluoreszenz-Z-Stapel-Aufnahmen (0,25 µm Z-Abstand) einer lebenden ER-TagRFP-T- (weiß bzw. rot) transfizierten HeLa-Zelle in Ringer-Lösung bei 37°C, zusätzlich gefärbt mit CellMask deep red (Membran, grün) und Hoechst 33342 (dDNS, blau). Gezeigt sind eine XY-Schnittansicht der Hellfeldaufnahme und eine 3D-Schnittansicht der iterativ dekonvolvierten Fluoreszenzaufnahmen, als ER-TagRFP-T-Einzelfluoreszenz und als Zusammenlegung aller Fluoreszenzkanäle. In der ER-TagRFP-T-Einzelfluoreszenz ist ein Zellausläufer vergrößert dargestellt.

b Iterativ dekonvolvierte Laser-Scanning-Mikroskopie (D-LSM)-Z-Stapel-Aufnahmen (0,2 µm Z-Abstand) von fixierten ER-TagRFP-T-transfizierten Jurkat T-Zellen in der „runden“ (i) und auf dem Deckglas abgeflachten (ii) Zellform (s. **Abb. 14**), dargestellt als 3D-Schnittansichten, 3D-Maximal-Intensitäts-Projektionen (MIP) und für i zusätzlich als 2 µm 3D-Schnitt-MIP. Durch die Messung der Laser-Refraktion wurden „Hellfeld“-Bilder erzeugt („LR“). Diese sind als XY-MIP dargestellt. Das mit der erreichten Auflösung (0,1 µm x 0,1 µm x 0,4 µm) ermittelte mittlere ER-Volumen und dessen Anteil am mittleren Gesamt-Zellvolumen sind angegeben.

Maßstabsbalken: 2 bzw. 20 µm, Z-Pfeile: 5 µm

3.1.2.4 Morphologie des Tubulin-Zytoskeletts und Zentrosom-Lokalisation in HeLa- und T-Zellen und bei CD8⁺ T-Zell-Streckung und -Migration

Aufgrund der essenziellen Bedeutung des Tubulin-Zytoskeletts und des Zentrosoms für den intrazellulären Transport und die Lokalisation von Organellen und Proteinen wurde die Morphologie der Mikrotubuli und die Lokalisation des Zentrosoms in den zuvor eingeführten HeLa- und T-Zellen (s. 3.1.1) untersucht.

Tubulin-Morphologie. In den HeLa-Zellen (n: 83, N: 3) war eine große Anzahl dicht verwobener Fäden zu erkennen, die sich bis in die Ausläufer der Zelle erstreckten und deren grobe Ausrichtung von der Zellform abhing (**Abb. 21**). Einzelne Tubulin-Filamente waren mit der hier erreichten Auflösung kaum zu erkennen. Das Zentrosom konnte in den meisten Zellen durch zwei punktförmige Signale (s. Abb. 5), meist in der Nähe des Zellkerns, identifiziert werden (weiße Pfeile). Die Vergrößerung oberhalb eines Zellkerns zeigt Schleifen von Tubulin-Filamenten, die sich um den Zellkern legten (s. „Schnitt-MIP“).

In allen untersuchten T-Zelltypen (n: 3000+, N: 13) zeigte sich ebenso ein feines Netzwerk aus Fäden, mit der höchsten Fluoreszenz in der Nähe der in Abbildung 19 identifizierten größten Zellkern-Einbuchtung (**Abb. 22 a**). Von dieser Höchst-Fluoreszenz ausgehend legten sich Tubulin-Filamente um den Zellkern herum (**Abb. 22 b ii**). In allen nicht-„gestreckten“ T-Zellen konnte das Zentrosom an der größten Zellkern-Einbuchtung im größten Zytosol-Volumen lokalisiert werden (**Abb. 22 b i**). In Lamellopodien, ohne „Ausstreckung“ in die Migrationsform durch Verschiebung des Zellkerns (s. Abb. 14 A b), konnte kein filamentöses Tubulin nachgewiesen werden (n: 300+ Zellen, N: 13; **Abb. 22 c**).

Zentrosom-Position bei T-Zell-Formänderung. Um einen möglichen Einfluss der Zell-Abflachung auf die Lokalisation des Zentrosoms zu untersuchen, wurde dessen Position als „am Deckglas“, „seitlich des Zellkerns“ bzw. „im oberen Zellviertel“ kategorisiert und die in **Abbildung 14** als „halbrund“ und „flach“ definierten Zellpopulationen so analysiert (**Abb. 23 a**). Bei allen drei T-Zelltypen zeigte sich bei halbrunden Zellen eine unpolarierte Lokalisation (gleichmäßige Verteilung bei Jurkat-Zellen, seitliche Lokalisation bei naiven und SEA-stimulierten CD8⁺ T-Zellen). Bei abgeflachten T-Zellen konnte das Zentrosom in 59-87 % der Fälle nah am Deckglas detektiert werden (**Abb. 23 a ii**). Befanden sich andere T-Zellen oberhalb einer abgeflachten T-Zelle, war das Zentrosom in 60 % der Fälle zwischen Deckglas und Nachbarzelle und bei einem Drittel der Fälle am Kontakt mit der Nachbarzelle lokalisiert (**Abb. 23 a iii**). Auch in den abgeflachten T-Zellen war die größte Zellkern-Einbuchtung zum Zentrosom orientiert.

In etwa der Hälfte aller untersuchten Zellen in der „gestreckten“ Migrationsform (**Abb. 23 b**) fand sich der Sonderfall, dass das Zentrosom nicht an der größten Zellkern-Einbuchtung lokalisiert war (**Abb. 23 b ii**). Mikrotubuli legten sich auch in der Migrationsform um den Zellkern (**Abb. 23 b i**). Dies war auch bei Zellen zu beobachten, die sich durch Verschiebung des Zellkerns in ein Lamellopodium in das umgebende Medium „ausstreckten“ (**Abb. 23 b ii**) (s. Abb. 14 C a iii). In allen 8 untersuchten naiven CD8⁺ T-Zellen befand sich das Zentrosom relativ zur Bewegungsrichtung direkt hinter dem Zellkern (**Abb. 23 b iii**). Bei 99 untersuchten SEA-stimulierten CD8⁺ T-Zellen war das Zentrosom in etwa 62 % der Zellen hinter dem Zellkern und in etwa einem Drittel der Zellen zwischen Zellkern und Uropod lokalisiert. Nur in wenigen Zellen konnte das Zentrosom relativ zur Bewegungsrichtung seitlich des Zellkerns detektiert werden.

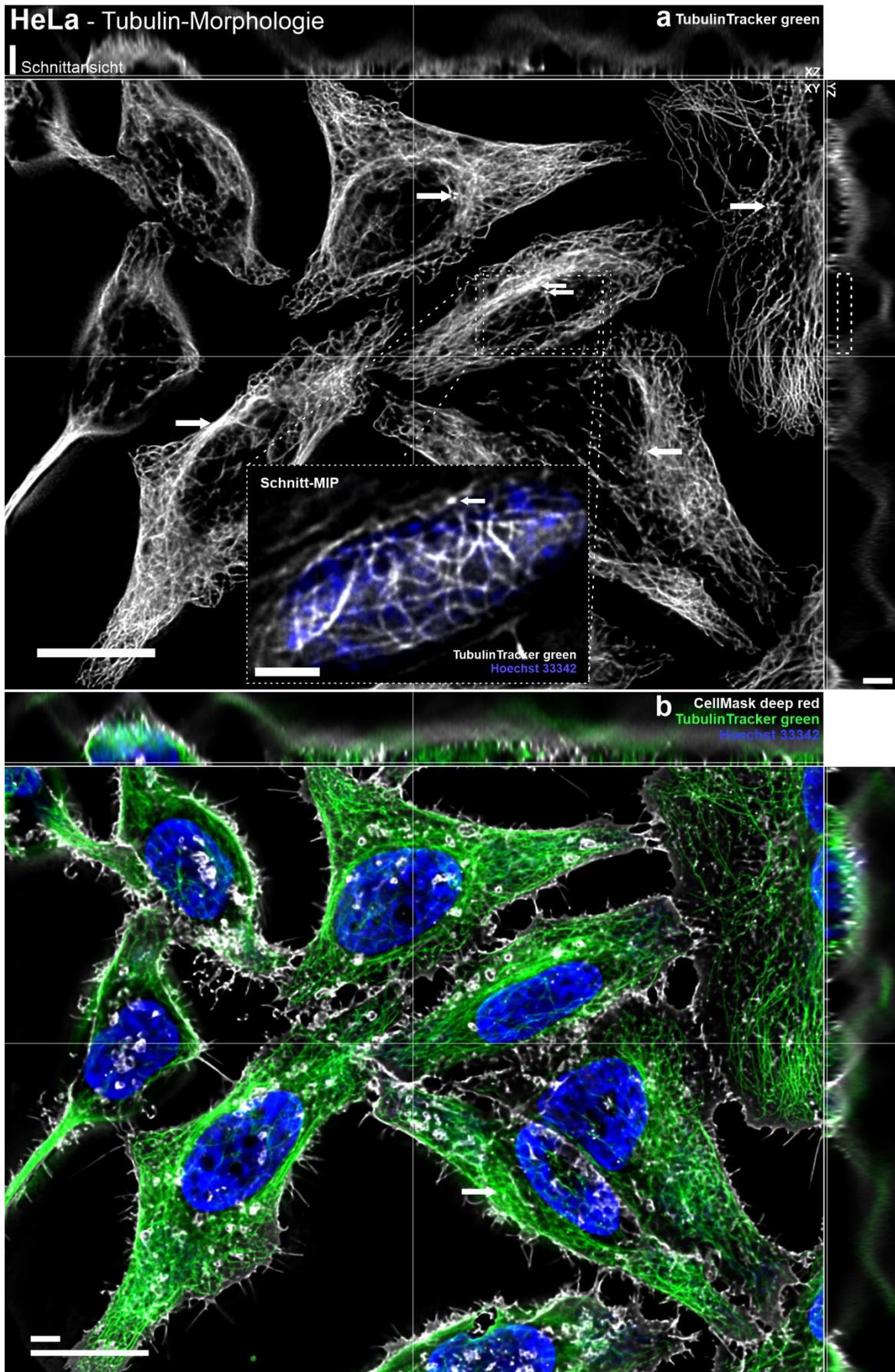
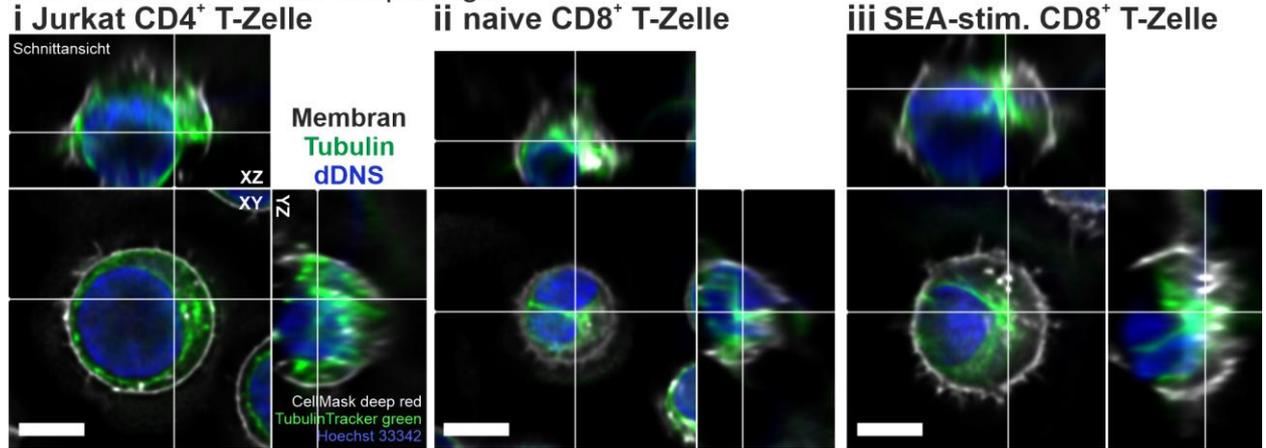


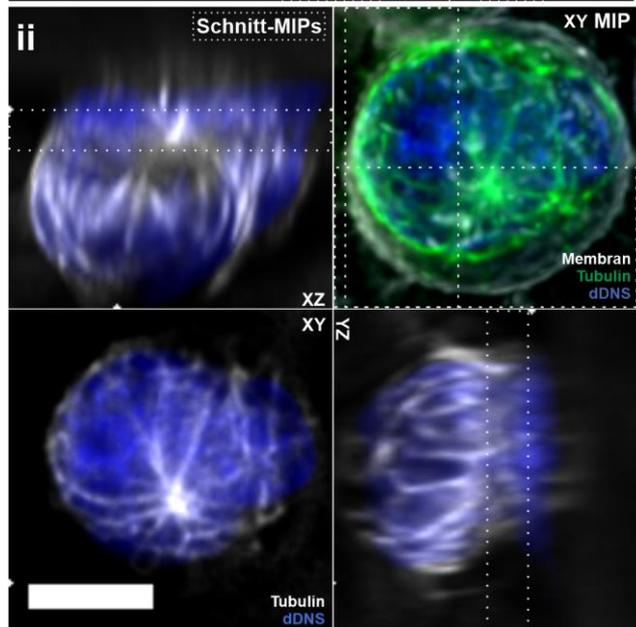
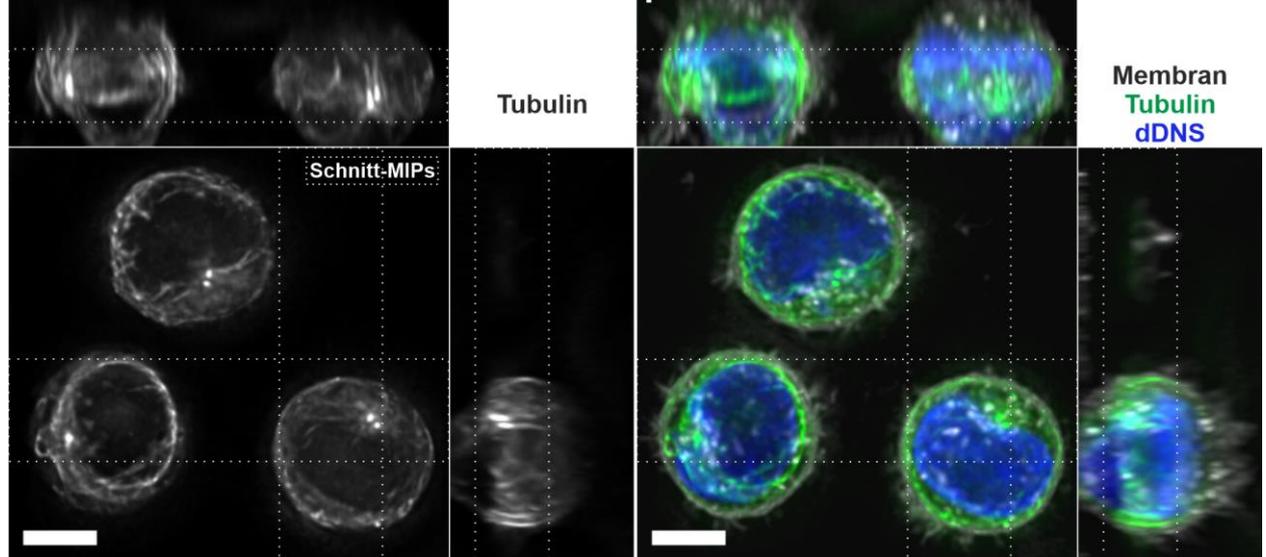
Abb. 21: Tubulin-Morphologie und Zentrosom-Lokalisation in HeLa-Zellen.

HeLa-Zellen wurden mit CellMask deep red, TubulinTracker green, Hoechst 33342 und MitoTracker red (nicht angezeigt) gefärbt und in Ringer-Lösung bei 37°C als Z-Stapel (0,25 µm Z-Abstand) aufgenommen. Alle Fluoreszenzaufnahmen wurden iterativ dekonvoluiert. Gezeigt sind 3D-Schnittansichten der Tubulin-Färbung (a, weiß) bzw. aller drei zusammgelegten Färbungen (b, Membran weiß, Tubulin grün, dDNS blau). Die Positionen der Zentrosome sind durch weiße Pfeile angezeigt. Die Tubulin-Einzelansicht enthält eine Vergrößerung oberhalb eines Zellkerns als selektive XY-Maximal-Intensitäts-Projektion (Schnitt-MIP, blaue Zellkern-Färbung). **Maßstabsbalken: 5 bzw. 20 µm**

a T-Zellen -- Tubulin-Morphologie



b Jurkat - Zentrosom-Kontrast



c Lamellopodien

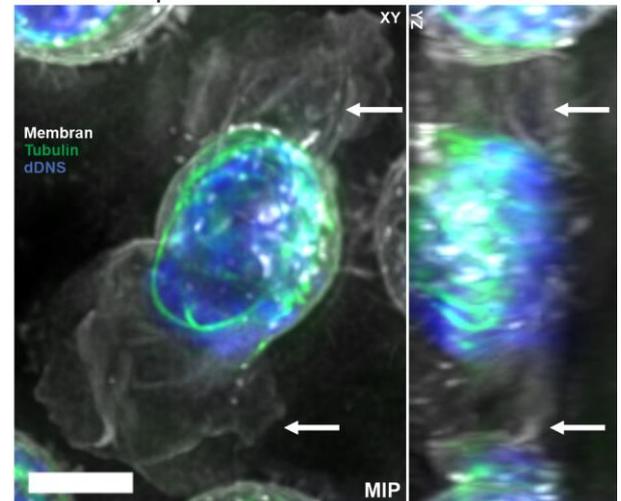


Abb. 22: Tubulin-Morphologie und Zentrosom-Lokalisation in T-Zellen.

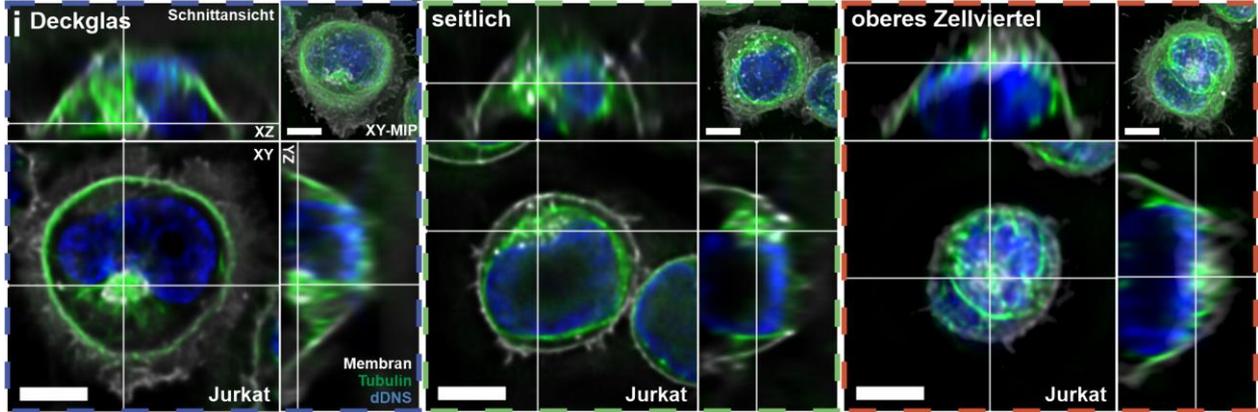
Drei verschiedene T-Zelltypen wurden mit CellMask deep red (weiß, wenn angezeigt), TubulinTracker green (weiß bzw. grün), Hoechst 33342 (blau) und MitoTracker red (nicht angezeigt) gefärbt und 5-30 min nach Zugabe zu Ringer-Lösung auf Glas-Deckgläsern bei 37°C als Z-Stapel (0,25 µm Z-Abstand) aufgenommen. Alle Fluoreszenzaufnahmen wurden iterativ dekonvolviert. **Maßstabsbalken: 5 µm**

a Beispiele von Jurkat CD4⁺ (i), naiven CD8⁺ (ii) und SEA-stimulierten CD8⁺ (iii) T-Zellen mit Gesamt-Tubulin-Kontrastierung als 3D-Schnitte.

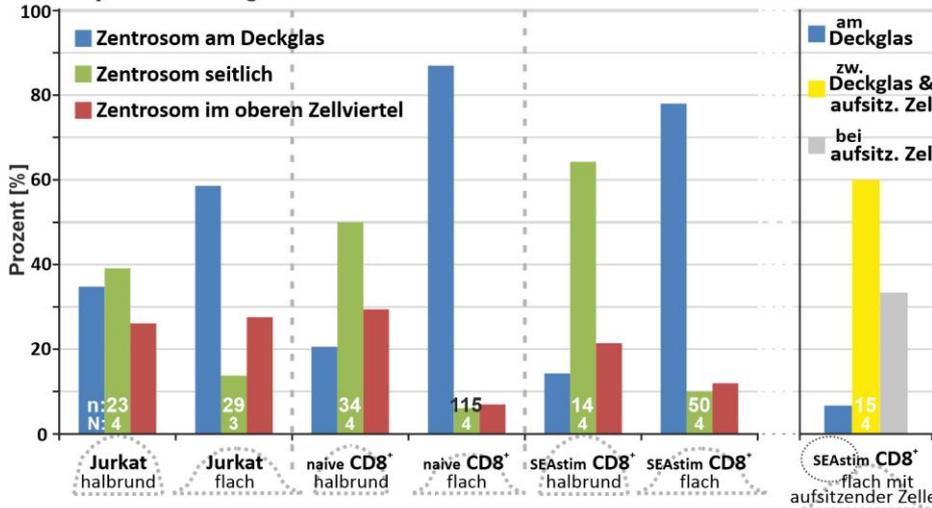
b 3D-Schnitt-MIPs von Jurkat CD4⁺ T-Zellen mit Zentrosom-Kontrastierung (i) und Tubulin-Zellkern Assoziation (ii, zusätzlich als XY-MIP).

c XY- und YZ-MIP einer Beispiel Jurkat -Zelle mit in das umgebende Medium ausgestreckten Lamellopodien ohne Tubulin-Signal (weiße Pfeile).

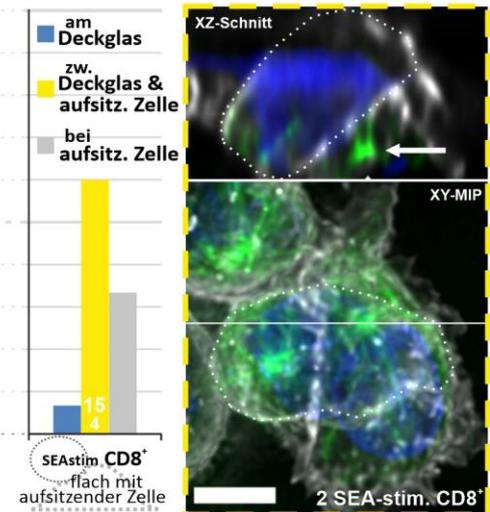
a Zentrosom-Position in abgeflachten T-Zellen



ii Analyse und Vergleich flache / halbrunde Zellen



iii Sonderfall aufsitzende Zellen



b Zentrosom-Position in gestreckten CD8⁺ T-Zellen

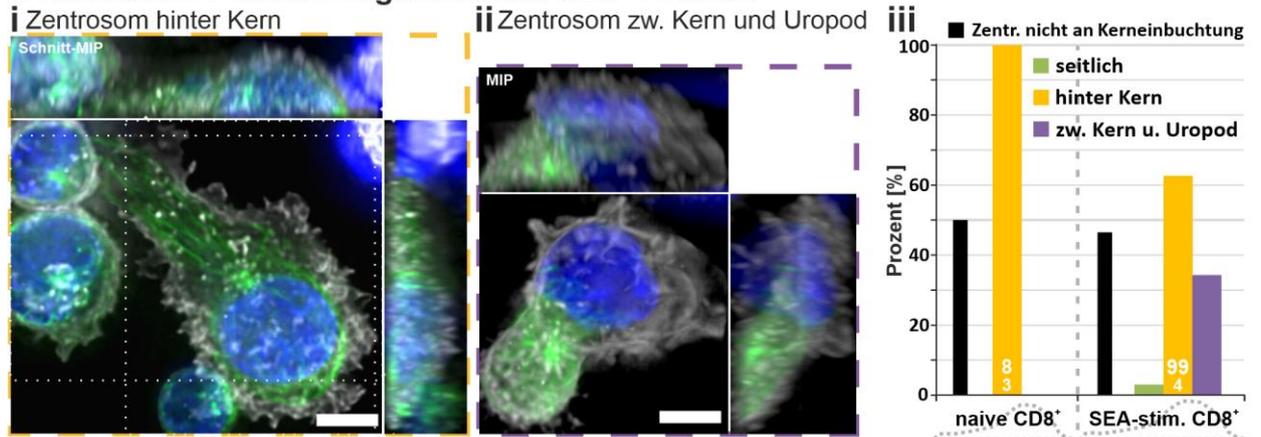


Abb. 23: Zentrosom-Lokalisation in formveränderten T-Zellen.

Während der Zellform-Analyse (s. Abb. 14) als „halbrund“, „flach“ oder „gestreckt“ definierte T-Zell-Populationen wurden auf ihre Zentrosom-Lokalisation untersucht. Die Zellen wurden mit CellMask deep red (Membran, weiß), TubulinTracker green (filamentöses Tubulin, grün), Hoechst 33342 (dDNS, blau) und MitoTracker red (nicht angezeigt) gefärbt und als Z-Stapel (0,25 µm Z-Abstand) aufgenommen. Alle Fluoreszenzaufnahmen wurden iterativ dekonvolviert. **Maßstabsbalken: 5 µm**

a Zentrosom-Position in abgeflachten T-Zellen. i Drei als „flach“ definierte Beispiel Jurkat CD4⁺ T-Zellen mit den zur Analyse definierten Zentrosom-Positionen „am Deckglas“ (blauer Rahmen), „seitlich“ (grüner Rahmen) und „im oberen Zellviertel“ (roter Rahmen) als 3D-Schnitte durch das Zentrosom und XY-MIP. ii Anteile der in i definierten Zentrosom-Position in „halbrunden“ und „flachen“ Jurkat CD4⁺, naiven CD8⁺ T-Zellen und SEA-stimulierten CD8⁺ T-Zellen. iii Es wurden 15 „flache“ SEA-stimulierte CD8⁺ T-Zellen mit auf ihnen aufliegenden Nachbarzellen ausgewertet. Gezeigt ist die XY-MIP einer Beispielzelle (gelber Rahmen) mit dem Zentrosom zwischen Deckglas und aufsitzender Nachbarzelle (weiße Punkte), mit XZ-Schnittansicht durch das Zentrosom.

b Zentrosom-Position in gestreckten CD8⁺ T-Zellen. Analyse (iii) des Anteils an gestreckten CD8⁺ T-Zellen mit dem Zentrosom „seitlich am Kern“ (grün), „hinter dem Kern“ (gelb, i gelber Rahmen) und „zwischen Kern und Uropod“ (violett, ii violetter Rahmen). Die gestreckte Zellform (Migrationsform) war die einzige T-Zellform, bei der das Zentrosom bei einem Anteil der Zellen nicht in der Nähe einer Zellkern-Einbuchtung lokalisiert war (iii schwarz).

Zentrosom-Position bei Zellbewegung. Zur Analyse der Zentrosom-Dynamik in stark formverändernden T-Zellen wurden SEA-stimulierte CD8⁺ T-Zellen mit „ γ -Tubulin-EGFP“ transfiziert, auf Poly-L-Ornithin-beschichtete Deckgläser aufgebracht und in Z-Stapel-Zeitraffer-Experimenten aufgenommen. Dabei konnten neben sich in das umgebende Kulturmedium ausstreckenden Zellen (wie in Abb. 17) auch einige wenige über das Deckglas migrierende Zellen (wie in Abb. 18) ausgewertet werden.

Bei der „Ausstreckung“ in das umgebende Kulturmedium (n: 19, N: 4; Beispielzelle in **Abb. 24 a, Film 3**) verblieb das Zentrosom (gelb) fortwährend am Deckglas. Bei Migration auf dem Deckglas (n: 9, N: 4; Beispielzelle in **Abb. 24 b i, Film 4**) befand sich das Zentrosom (grün) vor der Migration (Kugelform der Zelle) in der Zellkern-Einbuchtung (0'00“-2'22“) und im ausgestreckten Zustand am Uropod (4'43“ weißer Pfeil). Während der Bewegung des Uropods über das Deckglas bewegte sich das Zentrosom zwischen dem Uropod-Ende und dem Zellkern (blauer Pfeil) hin und zurück (7'05“-14'10“).

Bei der migrierenden Beispielzelle (**b**) wurden das Zentrosom (grün), sowie die Mittelpunkte von Zelle (schwarz), Zellkern (blau), Front-Lamellopodium (rot) und Uropod-Ende (weiß bzw. grau) mithilfe der XY-Maximal-Intensitäts-Projektion (MIP) manuell nachverfolgt und die XY-Abstände zum Zentrosom von Zellmitte, Zellkern, Front-Lamellopodium und Uropod-Ende über die Zeit berechnet (**Abb. 24 b ii**). Das Ausstrecken und Zusammenziehen der Beispielzelle ist im Graph ersichtlich.

Diese manuelle XY-Nachverfolgung wurde für 3 migrierende T-Zellen aus 3 Experimenten durchgeführt und die Geschwindigkeiten von Zentrosom, Zellmitte, Zellkern, Lamellopodium und Uropod-Ende für 12 Zeitpunkt-Übergänge berechnet, während denen der Uropod über das Deckglas bewegt wurde (**b i** 7'05“-14'10“). Die durchschnittliche Maximalgeschwindigkeit (V_{max}) mit Spitzenwerten (absolut) und die mittlere Durchschnittsgeschwindigkeit (V_{\emptyset}), relativ zum Deckglas berechnet, sind in **Abb. 24 b** in Nanometer pro Sekunde (nm/s) dargestellt. Der Mittelpunkt der Zellen wies während der Uropod-Bewegung über das Deckglas eine V_{\emptyset} von 82 nm/s (4,9 μ m/min) auf. Die V_{max} betrug 95 nm/s mit einem Spitzenwert von 102 nm/s. Zellkerne und Front-Lamellopodien wiesen etwas höhere V_{\emptyset} von 88 nm/s bzw. 100 nm/s auf. Die V_{max} stieg deutlich stärker auf 117 nm/s bzw. 158 nm/s. Das Zentrosom und der Uropod der Zellen wiesen ähnliche Geschwindigkeiten auf (V_{max} : 101/102 nm/s, V_{\emptyset} : 76/73 nm/s). Die Unterschiede zwischen den einzelnen Zellbestandteilen sind auf die Streckung der Zellen relativ zum Zellmittelpunkt und die phasenweise Rückbildung des Uropod zurückzuführen.

Zusammenfassung. Das Zentrosom war in allen nicht-gestreckten T-Zellen in einer ausgeprägten Einbuchtung des Zellkerns lokalisiert und das Mikrotubuli-Zytoskelett breitete sich davon ausgehend in das Zytosol und um den Zellkern herum aus. Bei Adhäsionskontakten mit dem Deckglas und starker Formänderung der T-Zellen war das Zentrosom präferiert an der Adhäsionsfläche anzufinden (**Abb. 23 a**), bei zusätzlichem Kontakt mit anderen T-Zellen eher in der Nähe der Zell-Zell-Kontaktfläche (**Abb. 23 a iii**). Bei „Ausstreckung“ der Zellen in das umgebende Medium verblieb das Zentrosom am Deckglas (**Abb. 24 a**). Während der Migration auf dem Deckglas bewegte es sich dynamisch innerhalb des gesamten Uropods zwischen Zellkern-Einbuchtung und Uropod-Ende, verblieb dabei aber immer in der Nähe des Deckglases (**Abb. 23 b, Abb. 24 b**).

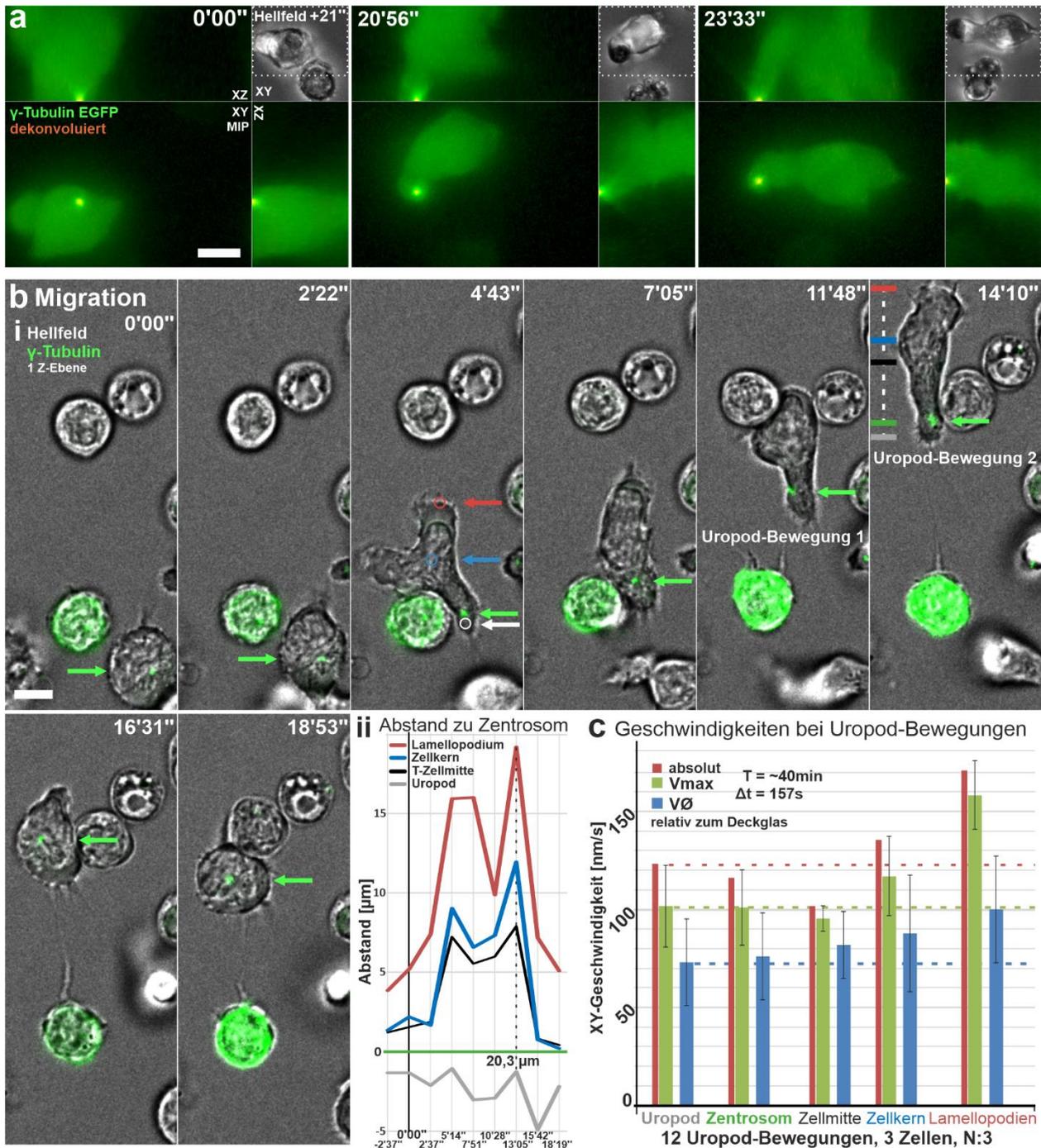


Abb. 24: Zentrosom-Position in Zeitrafferaufnahmen von SEA-stimulierten CD8⁺ T-Zellen und Geschwindigkeiten bei Uropod-Bewegung.

Hellfeld- und Fluoreszenz-Z-Stapel-Zeitrafferaufnahmen (0,3 μm Z-Abstand, 157 Sekunden Zeitauflösung) von mit γ -Tubulin-EGFP transfizierten SEA-stimulierten CD8⁺ Zellen auf Poly-L-Ornithin-beschichteten Glas-Deckgläsern bei 37°C. Die Fluoreszenzaufnahmen wurden iterativ dekonvoluiert. Maßstabsbalken: 5 μm

a Beispielaufnahme einer am Deckglas anhaftenden T-Zelle, die sich in das umgebende Kulturmedium ausstreckt. Zur Visualisierung der Zellform sind der nicht-dekonvoluierte γ -Tubulin-EGFP-Kanal (grün), und zur Hervorhebung des Zentrosoms dessen Dekonvolution (rot bzw. gelbe Mischfarbe) als 3D-Maximal-Intensitäts-Projektion (MIP) angezeigt. Die Hellfeld XY-MIP ist zur Übersicht angefügt.

Film 3: dropbox.com/s/8vt3llc9dmo8qao/Film3.AVI?dl=0

b i Hellfeld- und γ -Tubulin-EGFP- (grün) XY-Einzelebenen (Zentrosom-Fokus) der Beispielaufnahme einer über das Deckglas migrierenden T-Zelle. Das Zentrosom ist zu jedem Zeitpunkt durch grüne Pfeile angedeutet. Zum Zeitpunkt 4'43" sind als Beispiel durch weitere Pfeile die Mittelpunkte der Zellbestandteile „Lamellopodium-Front“ (rot), „Zellkern“ (blau), „Zellmitte“ (schwarz) und „Uropod“-(-Ende) (grau) gekennzeichnet. **ii** Abstandsmessung in μm über die Zeit vom Zentrosom zu: Lamellopodium (rot), Zellkern-Mittelpunkt (blau), Zellmitte (schwarz) und Uropod-Ende (grau) für die Beispielizele (i).

Film 4: dropbox.com/s/w6luyhefxv7iiji/Film4.AVI?dl=0

c Zur Geschwindigkeitsbestimmung wurden 12 Zeitpunkte aus 3 Experimenten ausgewertet, während denen der Uropod von 3 untersuchten T-Zellen über das Deckglas bewegt wurde. Alle Geschwindigkeiten sind relativ zum Deckglas. Die durchschnittliche Maximalgeschwindigkeit (V_{max} , grün) mit Spitzenwerten (absolut, rot) und die mittlere Durchschnittsgeschwindigkeit (V_{\emptyset} , blau) sind in Nanometer pro Sekunde (nm/s) für Uropod(-Ende), Zentrosom, Zellmitte, Zellkern und (Front-)Lamellopodien aufgetragen. Fehlerbalken sind Standardabweichung.



Film 3



Film 4

3.1.2.5 Mitochondriale Morphologie und Lokalisation in HeLa- und T-Zellen und mitochondriale Fission in Jurkat T-Zellen

Der Einfluss von Mitochondrien auf die Kalzium-Homöostase hängt stark von ihrer Position und Form ab. Daher wurden die Morphologie und die Lokalisation von Mitochondrien in HeLa-Zellen und runden und formveränderten T-Zellen, sowie bei mitochondrialer Fission untersucht.

Mitochondrien-Morphologie und -Lokalisation. In Lehrbuch-Schemata des Zellinneren werden Mitochondrien als nieren- oder bohnenförmige Gebilde dargestellt (s. Abb. 7). Vergleicht man Aufnahmen von Mitochondrien in lebenden Zellen mit „typischen“ Aufnahmen in fixierten Zellen (s. Abb. 2), ähneln Mitochondrien nach Fixierungen den Schemata-Abbildungen in der Literatur, während Mitochondrien in lebenden Zellen eher dünne, längliche Strukturen aufweisen (**Abb. 25-27**).

In den in dieser Arbeit durchgeführten Aufnahmen von HeLa-Zellen waren die meisten Mitochondrien mit einem Großteil des Mikrotubuli-Netzwerks assoziiert, mit diesem um den Zellkern angehäuft und in den Zellkörper ausgerichtet (**Abb. 25**). Der vergrößerte Bereich über dem Zellkern einer HeLa-Zelle zeigt Beispiele für diese Assoziation (**Abb. 25 b**). Die meisten HeLa-Zellen zeigten daher eine relativ gleichmäßige Mitochondrien-Lokalisation in allen Zellbereichen, die nicht stark abgeflacht waren (n: 83, N: 4). Etwa 87 % aller HeLa-Zellen wiesen eine ringförmige Akkumulation von Mitochondrien um den gesamten Zellkern auf. Bei den restlichen Zellen befand sich die Seite des Zellkerns, die keine Mitochondrien aufwies, sehr nah an der Plasmamembran. Wiesen die Zellen langgezogene Zellenden auf, fanden sich dort in 93 % der Fälle Mitochondrien, bei einem Drittel dieser Fälle akkumuliert (n: 79, N: 4).

In den meisten untersuchten T-Zellen breiteten sich Mitochondrien an den Mikrotubuli entlang um den Zellkern aus, mit Akkumulationen an der größten Zellkern-Einbuchtung und in einigen Fällen zusätzlich an der Rückseite des Zellkerns (**Abb. 26**). Zur Analyse der Mitochondrien-Lokalisation in runden und zum Deckglas abgeflachten T-Zellen wurden die Zellen wie in Abb. 14 in „rund“, „halbrund“ und „flach“ eingeteilt und die Lokalisation der Mitochondrien-Akkumulationen kategorisiert (**Abb. 26 c i**). In allen nicht-mitotischen T-Zellen befanden sich Mitochondrien am Zentrosom, bei etwa 22-52 % der Zellen konnten ausschließlich dort Mitochondrien-Akkumulationen detektiert werden („reine Zentrosom Akkumulation“, **Abb. 26** blaue Rahmen und Kreise). Bei anderen Zellen trat eine zweite abgrenzbare Akkumulation auf, meist an der Zellkern-Rückseite („halbseitig“, **Abb. 26** grüne Rahmen und Kreise). Die dritte Kategorie Zellen wies neben der Zentrosom-Akkumulation noch mindestens zwei weitere Akkumulationen oder in der gesamten Zelle verteilte Mitochondrien auf („gleichmäßig“, **Abb. 26** rote Rahmen und Kreise). Bei Abflachung zum Deckglas nahm bei allen drei T-Zelltypen der Anteil an Zellen mit reiner Zentrosom-Akkumulation ab und der Anteil an Zellen mit weiteren Akkumulationen zu.

In allen untersuchten mitotischen T-Zellen (**Abb. 26 c ii**) waren die Mitochondrien während Prometaphase, Metaphase und Anaphase gleichmäßig in den runden Zellen verteilt, (n: 33, N: 8). Bei Zellen in der Telophase waren bei fast allen Jurkat-Zellen (n: 8 von 9, N: 4) und bei über der Hälfte der SEA-stimulierten CD8⁺ T-Zellen (n: 4 von 7, N: 3) keine Mitochondrien an den Zentrosomen vorhanden. Stattdessen waren immer Mitochondrien-Akkumulationen an der Trennstelle beider Tochterzellen angehäuft.

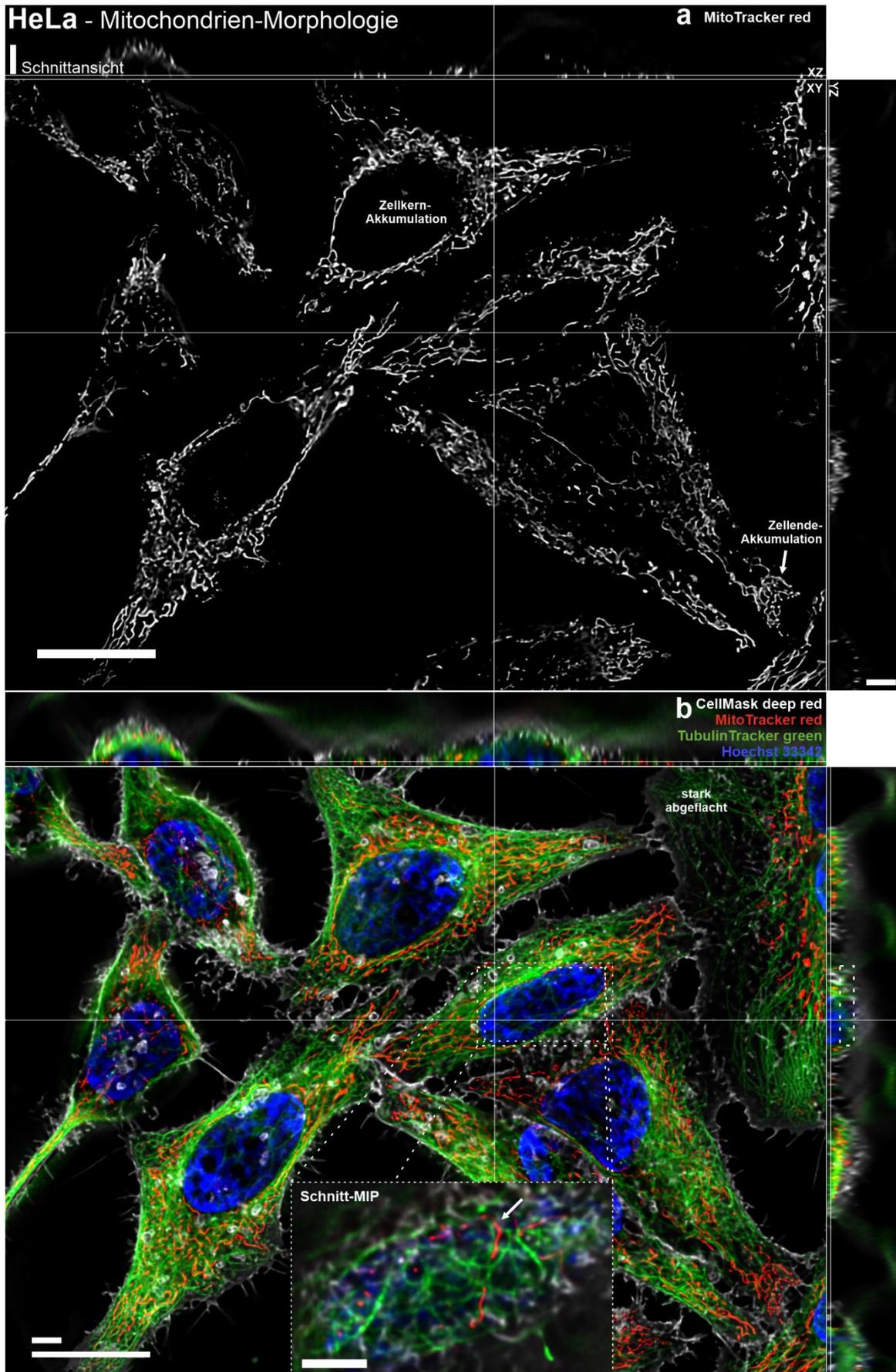
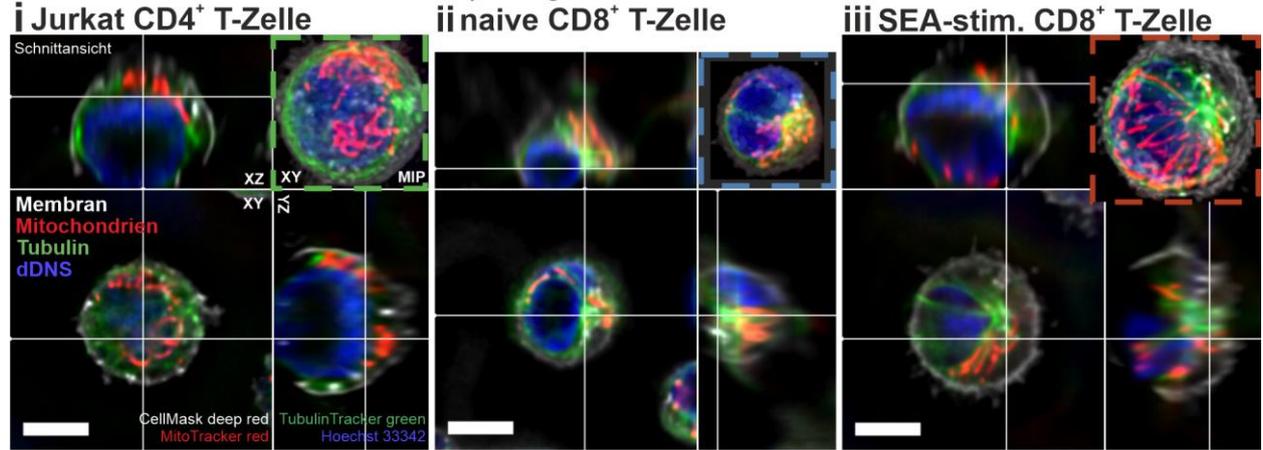


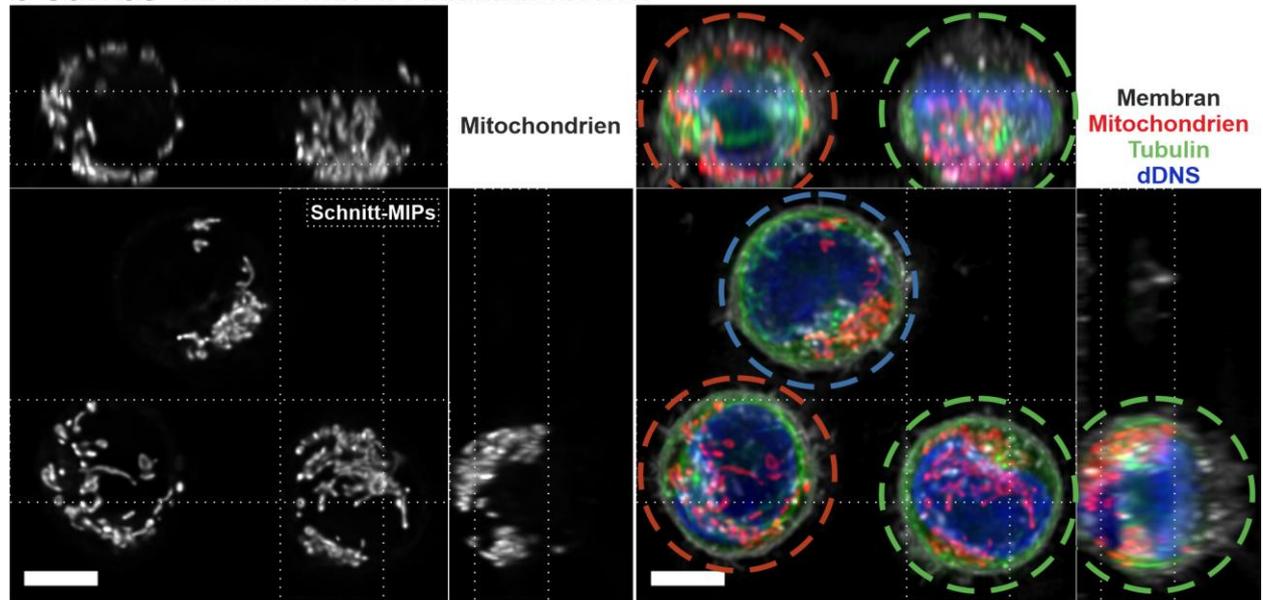
Abb. 25: Mitochondrien-Morphologie und -Akkumulationen in HeLa-Zellen.

HeLa-Zellen wurden mit CellMask deep red, MitoTracker red, TubulinTracker green und Hoechst 33342 gefärbt, in Ringer-Lösung bei 37°C als Z-Stapel (0,25 µm Z-Abstand) aufgenommen und die Fluoreszenzaufnahmen iterativ dekonvoluiert. Gezeigt sind eine 3D-Schnittansicht der Mitochondrien-Färbung (a, weiß) bzw. aller vier Färbungen (b, Membran weiß, Mitochondrien rot, Tubulin grün, dDNS blau). Die zusammengesetzte Ansicht enthält eine Vergrößerung des Bereichs oberhalb eines Zellkerns als selektive XY-Maximal-Intensitäts-Projektion (Schnitt-MIP, s. gepunktete Rahmen) mit Mitochondrien am Tubulin-Zytoskelett (Beispiel: weißer Pfeil). **Maßstabsbalken: 5 bzw. 20 µm**

a T-Zellen - Mitochondrien-Morphologie



b Jurkat - Mitochondrien-Akkumulationen



c T-Zellen -- Mitochondrien Akkumulationen

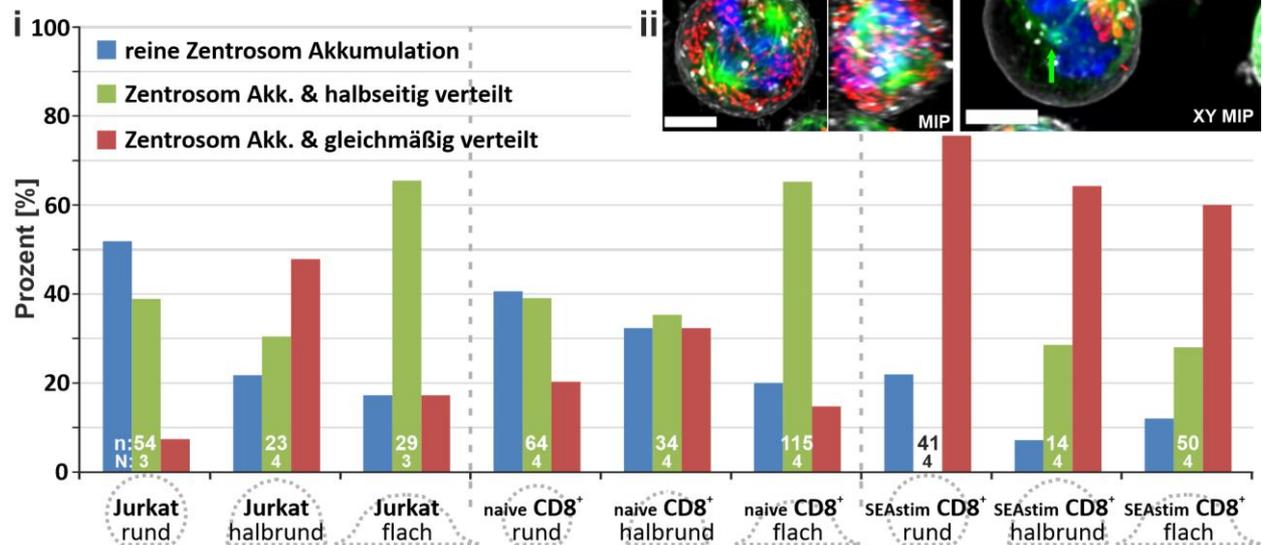


Abb. 26: Mitochondrien-Morphologie und -Akkumulationen in runden und abgeflachten T-Zellen

Abb. 26: Mitochondrien-Morphologie und -Akkumulationen in runden und abgeflachten T-Zellen.

Drei verschiedene T-Zelltypen wurden mit CellMask deep red, MitoTracker red, TubulinTracker green und Hoechst 33342 gefärbt und 5-30 Minuten nach Zugabe zu Ringer-Lösung auf Glas-Deckgläsern bei 37°C als Z-Stapel (0,25 µm Z-Abstand) aufgenommen. Alle Fluoreszenzaufnahmen wurden iterativ dekonvolviert. **Maßstabsbalken: 5 µm**

a Beispielaufnahmen von **Jurkat CD4⁺ (i)**, **naiven CD8⁺ (ii)** und **SEA-stimulierten CD8⁺ (iii)** T-Zellen als 3D-Schnittansichten und XY-MIPs.
b Jurkat CD4⁺ T-Zellen. Selektive 3D-Maximum-Intensitäts-Projektionen (Schnitt-MIP, s. gepunktete weiße Rahmen) der Mitochondrien-Färbung (weiß) bzw. der zusammengelegten Färbungen (Membran weiß, Mitochondrien rot, Tubulin grün, dDNS blau).
c Zur Analyse der Mitochondrien-Akkumulationen in T-Zellen wurden die drei Zustände „Zentrosom Akkumulation ohne weitere Akkumulationen“ (Beispiele: **a ii** blauer Rahmen, **b** blauer Kreis), „Zentrosom Akkumulation und eine weitere Akkumulation“ („halbseitig“, Beispiele: **a i** grüner Rahmen, **b** grüner Kreis) und „Zentrosom Akkumulation und mindestens zwei weitere Akkumulationen bzw. Mitochondrien am gesamten Mikrotubuli-Netzwerk mit Zentrosom Akkumulation“ („gleichmäßig“, Beispiele: **a iii** roter Rahmen, **b** roter Kreis) definiert. Die Anteile (**c i**) aller untersuchten T-Zellen mit diesen zuvor definierten Mitochondrien-Akkumulationen, weiter eingeteilt in die in **Abbildung 14** definierten Zellformen „rund“, „halbrund“ und „flach“, sind zusammengetragen. Weiterhin sind typische Mitochondrien-Verteilungen in Metaphase und Telophase am Beispiel zweier Jurkat-Zellen gezeigt (**c ii**). Die Position beider Zentrosome in der Telophase ist durch grüne Pfeile markiert.

Zur Analyse der Mitochondrien-Lokalisation in „gestreckten“ T-Zellen in der Migrationsform wurden drei verschiedene Zellteile für Mitochondrien-Lokalisationen definiert: „Zentrosom“, „Front-Lamellopodium“ und „Uropod“ (**Abb. 27**). Am Zentrosom wurden auch hier stets Mitochondrien angefunden. Von 8 untersuchten naiven CD8⁺ T-Zellen wiesen 7 Zellen zusätzlich Mitochondrien am Uropod auf (**Abb. 27** violett), bei einer Zelle außerdem an der Front (**Abb. 27 c** gelb). Von 99 untersuchten SEA-stimulierten CD8⁺ T-Zellen konnten 4 Zellen mit reiner Zentrosom-Lokalisation identifiziert werden (**Abb. 27 c** blau). Die Hälfte dieser Zellen hatte zusätzlich zur Zentrosom-Akkumulation Mitochondrien am Uropod (**Abb. 27 b i**), 40 % der Zellen wiesen in allen drei definierten Zellteilen Mitochondrien auf (**Abb. 27** rot).

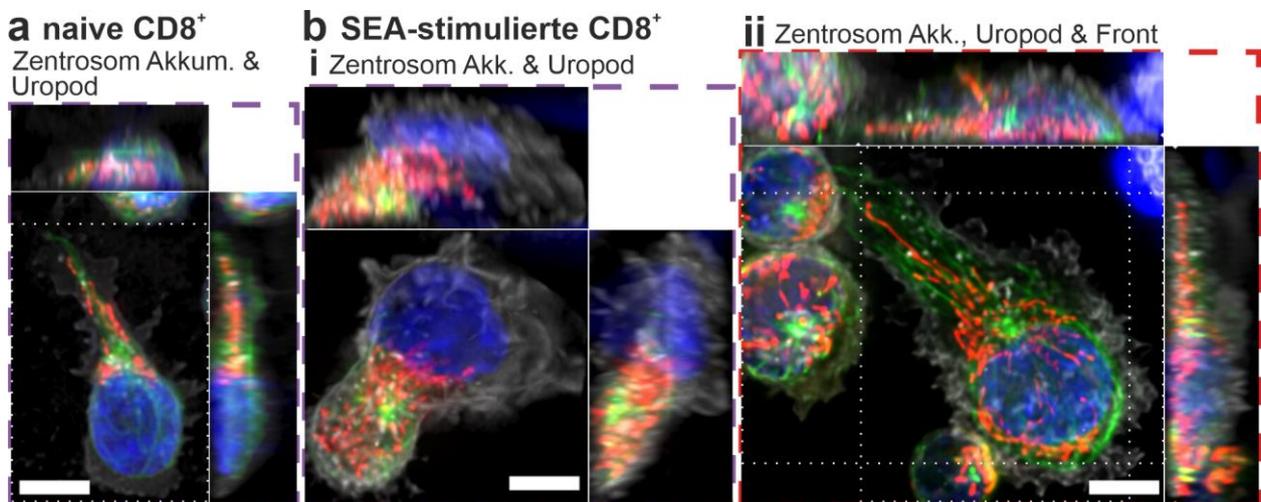
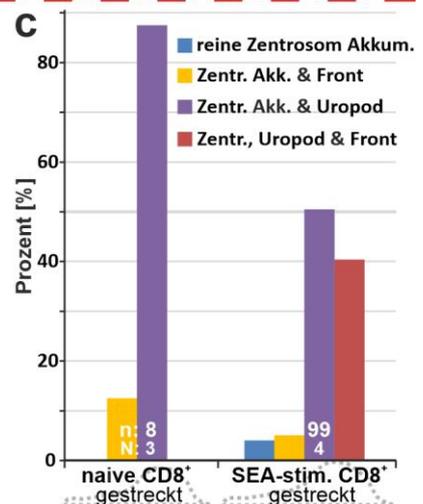


Abb. 27: Mitochondrien-Akkumulationen in gestreckten CD8⁺ T-Zellen.

Primäre CD8⁺ T-Zellen wurden mit CellMask deep red (weiß), MitoTracker red (rot), TubulinTracker green (grün) und Hoechst 33342 (blau) gefärbt und 5-30 Minuten nach Zugabe zu Ringer-Lösung auf Glas-Deckgläsern bei 37°C als Z-Stapel (0,25 µm Z-Abstand) aufgenommen. Alle Fluoreszenzaufnahmen wurden iterativ dekonvolviert. Darstellung als 3D-MIPs und 3D-Schnitt-MIPs (s. **Abb. 26**).

In 8 „gestreckten“ (s. **Abb. 14**) naiven CD8⁺ T-Zellen aus 3 Experimenten (**a**) und 99 gestreckten SEA-stimulierten CD8⁺ T-Zellen aus 4 Experimenten (**b**) wurde die Mitochondrien-Verteilung untersucht (**i** in das Medium gestreckt, **ii** auf dem Deckglas gestreckt). In allen untersuchten Zellen wurden Mitochondrien am Zentrosom angefunden. Die Analyse weiterer Akkumulationen ist in **c** zusammengetragen. Die verschiedenen Mitochondrien-Verteilungen wurden eingeteilt in: „reine Zentrosom Akkumulation“ (blauer Balken), „Zentrosom und Front Akkumulation“ (gelber Balken), „Zentrosom und Uropod Akkumulation“ (violetter Balken, Beispiele: **a & b i** violetter Rahmen) und „Zentrosom, Uropod und Front“ (roter Balken, Beispiel: **b ii** roter Rahmen).

Maßstabsbalken: 5 µm



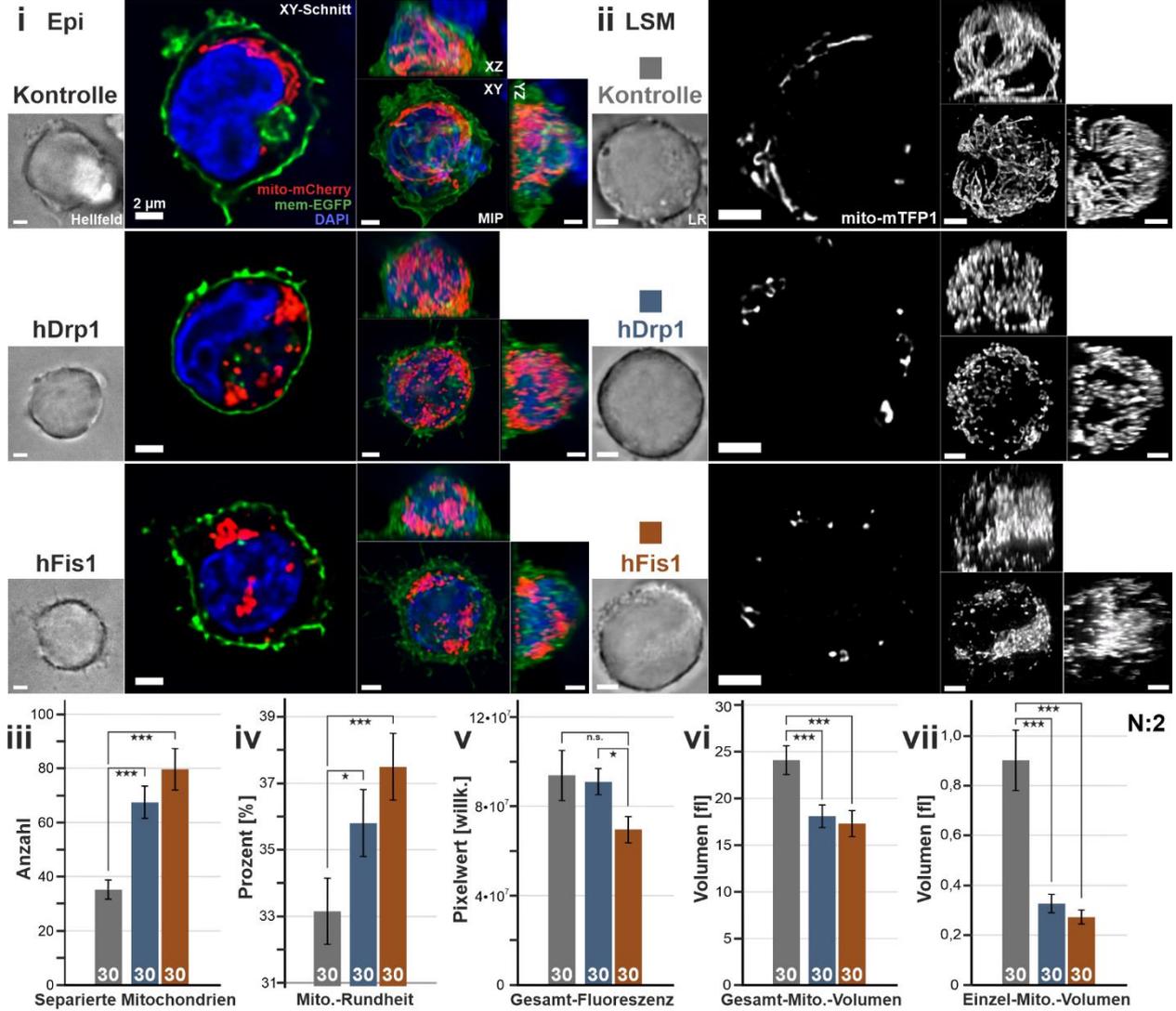
Mitochondriale Fission. Die vorherigen Experimente mit Mitochondrien-Färbung zeigten vorwiegend Bündel von langen, dünnen Mitochondrien. Durch die starke Überexpression der Proteine „humanes Drp1“ und „humanes Fis1“ in der CD4⁺ T-Zelllinie Jurkat wurde der Anteil einzelner kleiner Mitochondrien signifikant erhöht (**Abb. 28**). Um eine möglichst hohe Auflösung zu erreichen, wurden die Zellen mit 2 % PFA fixiert (**Abb. 28 a**) und Z-Stapel-Aufnahmen mit einem Laser-Scanning-Mikroskop (LSM) erstellt (**Abb. 28 a ii**). Zusätzlich wurden Mehrfachfärbungen mittels Epi-Fluoreszenz-Mikroskopie aufgenommen (**Abb. 28 a i**). Alle so erhaltenen Bilder wurden mithilfe von experimentell bestimmten PSFs dekonvoluiert. Die dekonvoluierten LSM-Aufnahmen wiesen unmittelbar am Deckglas durchschnittliche Auflösungen von 109 nm in XY- bzw. 323 nm in Z-Richtung auf, sowie 116 nm in XY- bzw. 430 nm in Z-Richtung bei einem Z-Abstand von 5 µm vom Deckglas (s. Abb. 11). In den hDrp1- bzw. hFis1-überexprimierenden Zellen wurde im Vergleich mit den Kontrollzellen neben einer gleichmäßigeren Verteilung der Mitochondrien auch eine morphologische Änderung zu kleineren runden Strukturen deutlich erkennbar (**Abb. 28 a**). Die Analyse zeigte einen signifikanten Anstieg separierbarer Mitochondrien (**iii**) und deren Rundheit (**iv**), bei nicht-signifikant veränderter Gesamt-Fluoreszenz (**v**). Das berechnete Volumen aller Mitochondrien pro Zelle nahm im Vergleich zur Kontrolle von etwa 24 Femtolitern (fl) auf 17 fl ab (**vi**), das mittlere Volumen einzeln separierbarer Mitochondrien verringerte sich deutlich stärker von etwa 0,9 fl auf 0,3 fl (**vii**).

Um den Einfluss der mitochondrialen Fission auf die Mitochondrien-Lokalisation zu analysieren (**Abb. 28 b**), wurde eine Messung des Anteils an Plasmamembran (PM) mit sehr nahen Mitochondrien durchgeführt (**b ii**) und der prozentuale Anteil von allen Mitochondrien bestimmt, die sich in der unmittelbaren Nähe der PM befanden (**b iii**). Jurkat-Kontrollzellen mit mito-mCherry- und mem-EGFP-Transfektion und Jurkat-Zellen mit jeweils einer zusätzlichen Fissionsprotein-Transfektion wurden lebend als Z-Stapel aufgenommen und die Nähe der Mitochondrien zur PM verglichen. Dazu wurden die mittleren 5 µm aller Zellen zu einer XY-Maximal-Intensitäts-Projektion („Schnitt-MIP“) zusammengelegt und die PM mithilfe der Membranfärbung als Messbereich eingezeichnet (**b i rote Linie**). Ein zweiter Messbereich wurde etwa 400 nm innerhalb der PM hinzugefügt, um PM-nahe Bereiche einzugrenzen (**b i gelbe Linie**). Sowohl der Anteil an PM mit Mitochondrien näher als 400 nm (**b ii**), als auch der Anteil aller Mitochondrien, die sich zwischen den beiden Messbereichen befanden (< 400 nm an der PM) (**b iii**) war bei beiden Fissionsprotein-Überexpressionen signifikant erhöht.

Zusammenfassung. In allen nicht-mitotischen T-Zellen waren Mitochondrien am Zentrosom angehäuft (**Abb. 26**), im Gegensatz zu HeLa-Zellen, in denen zumeist der gesamte Zellkern dicht von Mitochondrien umgeben war (**Abb. 25**). Weitere Akkumulationen traten gehäuft in stark formveränderten T-Zellen auf, in stimulierten primären CD8⁺ T-Zellen waren die Mitochondrien häufig in allen Zellformen gleichmäßig über das Tubulin-Zytoskelett verteilt (**Abb. 26 c**, **Abb. 27**). Die artifizielle Fission von Mitochondrien in unstimulierten Jurkat CD4⁺ T-Zellen führte zu einer erhöhten räumlichen Assoziation von Mitochondrien mit der Plasmamembran (**Abb. 28 b**), nachdem kompakte Mitochondrien-Bündel zu kleineren Einzel-Mitochondrien zerfielen (**Abb. 28 a**).

Ergebnisse

a fixierte Zellen - Analyse der Mitochondrien-Fission



b lebende Zellen - Analyse der mitochondrialen Membran-Abdeckung

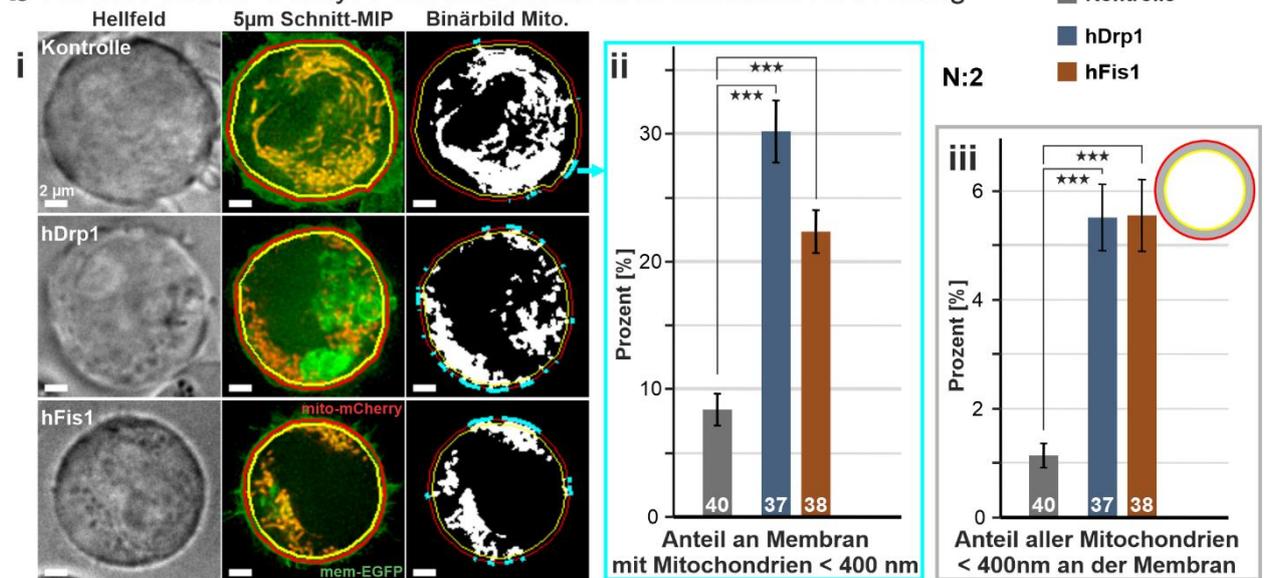


Abb. 28: Mitochondrien-Morphologie und -Lokalisation nach Überexpression mitochondrialer Fissionsproteine in Jurkat CD4⁺ T-Zellen

Abb. 28: Mitochondrien-Morphologie und -Lokalisation nach Überexpression mitochondrialer Fissionsproteine in Jurkat CD4⁺ T-Zellen.

a Mitochondriale Morphologie nach Überexpression mitochondrialer Fissionsproteine in fixierten Jurkat CD4⁺ T-Zellen.

Die Zellen wurden nur mit Fluoreszenzprotein-Plasmiden (Kontrolle) oder zusätzlich mit für hDrp1- bzw. hFis1-kodierenden Plasmiden transfiziert, mit 2 % PFA fixiert und in Fixiermedium (in i mit DAPI) eingebettet. i Überexpression von mito-mCherry (Mitochondrien, rot) und mem-EGFP (Membran, grün) und Färbung mit DAPI (dDNS, blau). Z-Stapel-Aufnahme (0,25 µm Z-Abstand) durch iterativ dekonvolvierte Epi-Fluoreszenz. Dargestellt ist jeweils ein XY-Schnitt und die 3D-Maximal-Intensitäts-Projektion (MIP). ii Überexpression von mito-mTFP1 (Mitochondrien, weiß). Z-Stapel-Aufnahme (0,2-µm Z-Abstand) durch iterativ dekonvolvierte Laser-Scanning-Mikroskopie (D-LSM) mit gleichzeitiger Erzeugung von „Hellfeld“-Bildern durch die Messung der Laser-Refraktion („LR“). Dargestellt sind Schnitte und 3D-MIPs repräsentativer Beispielzellen. iii-vi Analyse der in 3D rekonstruierten Bilder aus ii. Anzahl einzeln separierbarer Mitochondrien (iii), „Rundheit“ (% Kugelform, iv), Gesamt-Fluoreszenz (v), gesamtes Mitochondrien-Volumen pro Zelle (vi) und mittleres Volumen einzeln separierbarer Mitochondrien (vii) sind für Kontrolle, hDrp1 und hFis1 zusammengetragen. n: 90, N: 2 **Maßstabsbalken: 2 µm**

b Mitochondriale Lokalisation relativ zur Plasmamembran bei Fissionsprotein-Überexpression in lebenden Jurkat CD4⁺ T-Zellen.

i Hellfeld- und Fluoreszenz-Z-Stapel-Aufnahmen (0,25 µm Z-Abstand) der Überexpression von mito-mCherry (Mitochondrien, rot) und mem-EGFP (Plasmamembran, grün) in einer Beispiel-Kontrollzelle (n: 40), sowie zwei zusätzlich mit hDrp1 (n: 37) bzw. hFis1 (n: 38) transfizierten repräsentativen Beispielzellen. Die zentralen 5 µm Z-Ebenen aller Zellen wurden als XY-Maximal-Intensitäts-Projektion (Schnitt-MIP) visualisiert und die Plasmamembran als äußere Begrenzung des Messbereichs eingezeichnet (rote Linie). Mit etwa 400 nm Abstand zur roten Linie wurde eine weitere Linie (gelb) innerhalb jeder Zelle eingezeichnet, um den Messbereich einzugrenzen. Nach normierter Erzeugung des mitochondrialen Binärbilds wurde dieses genutzt, um den Anteil an Plasmamembran auszumessen, an dem Mitochondrien nahe anzufinden waren (hellblau). ii Prozentualer Anteil an Plasmamembran mit Mitochondrien näher als 400 nm (Verhältnis der Längen aller hellblauen Linien zum rotem Kreisumfang). iii Prozentualer Anteil aller im Binärbild erfassten mitochondrialen Signale im eingezeichneten Messbereich mit < 400 nm Abstand zur PM (Differenz des roten und gelben Messbereichs). N: 2 **Maßstabsbalken: 2 µm**
Fehlerbalken stellen S.E.M. dar. Die Signifikanz wurde mittels ungepaartem Standard t-Test überprüft. * p<0,05, ** p<0,01, *** p<0,005.

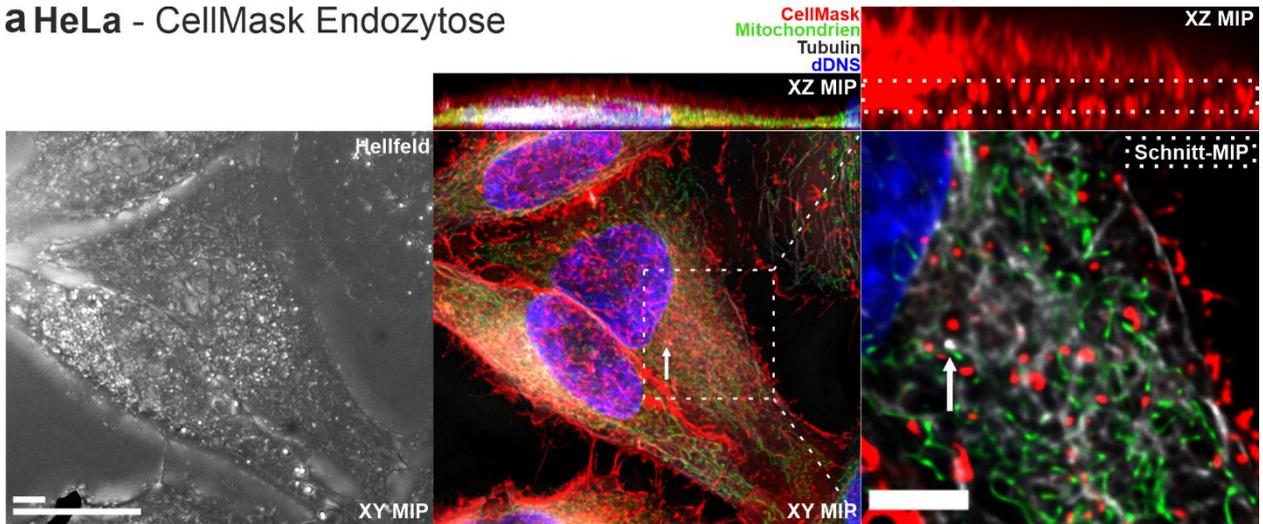
3.1.2.6 Verteilung endozytierter Vesikel in HeLa- und T- Zellen und Vesikel-Geschwindigkeiten in stimulierten CD8⁺ T-Zellen

Endozytierte Vesikel. Aufgrund der Endozytose des Plasmamembran-Farbstoffs „CellMask deep red“ konnten Lokalisationsanalysen von endozytierten Vesikeln in allen zuvor eingeführten Zelltypen (s. 3.1.1) durchgeführt werden. In der Zelllinie HeLa zeigten sich diese Vesikel gleichmäßig über das gesamte Zytosol verteilt (**Abb. 29 a**). Im vergrößerten Bereich der gezeigten Beispielzelle sind viele gleichmäßig verteilte endozytierte Vesikel im Zellinneren zu erkennen. An dem mit einem weißen Pfeil markierten Zentrosom war in keiner untersuchten Zelle eine Akkumulation dieser Vesikel vorhanden (n: 87, N: 4).

Durch die Inkubation lebender T-Zellen mit anti-CD3-Antikörpern werden diese von der T-Zelle internalisiert und es bildet sich eine Antikörper-markierte Vesikel-Population, die spezifisch für den „CD3-Recycling-Pathway“ ist (*Geisler 2004*) (s. Abb. 8). Diese Vesikel-Population wird in dieser Arbeit abkürzend als „endoCD3“ bezeichnet. Die Inkubation von Jurkat CD4⁺ T-Zellen mit anti-CD3-Alexa⁶⁴⁷-Antikörpern und die zusätzliche Inkubation mit dem Plasmamembran-Farbstoff „CellMask orange“ zeigte eine starke Übereinstimmung beider Signale in der Vesikelpopulation (**Abb. 29 b**), sowohl in der Interphase (n: 236, N: 4) als auch in der Mitose der Zellen (n: 8, N: 4). Zwei Beispielzellen in der Interphase (**Abb. 29 b i, ii**) und zwei Beispielzellen in der Ana- bzw. Telophase (**Abb. 29 b iii**) sind gezeigt.

Die in Kapitel 3.1.1 aufgezeigte Akkumulation von durch den PM-Farbstoff gefärbten Vesikeln wurde bei allen nicht-mitotischen T-Zellen in direkter Nähe zum Zentrosom detektiert. Ein Anteil dieser Zellen wies zusätzlich zu dieser zentrosomalen Vesikel-Akkumulation (Beispiel in **Abb. 29 b i**) noch weitere Akkumulationen oder eine gleichmäßige Verteilung endozytierter Vesikel in der gesamten Zelle auf (Beispiel in **Abb. 29 b ii**). Die jeweiligen Anteile wurden für alle untersuchten T-Zellen der in Abb. 14 definierten Populationen „rund“, „halbrund“, „flach“ und „gestreckt“ in **Abb. 29 c** zusammengetragen. Im Vergleich zu runden Zellen nahm bei formveränderten T-Zellen mit Ausnahme von „gestreckten“ SEA-stimulierten CD8⁺ T-Zellen der Anteil von T-Zellen mit zusätzlichen Vesikel-Verteilungen zu.

a HeLa - CellMask Endozytose



b Jurkat -- endosomale CD3 Vesikel

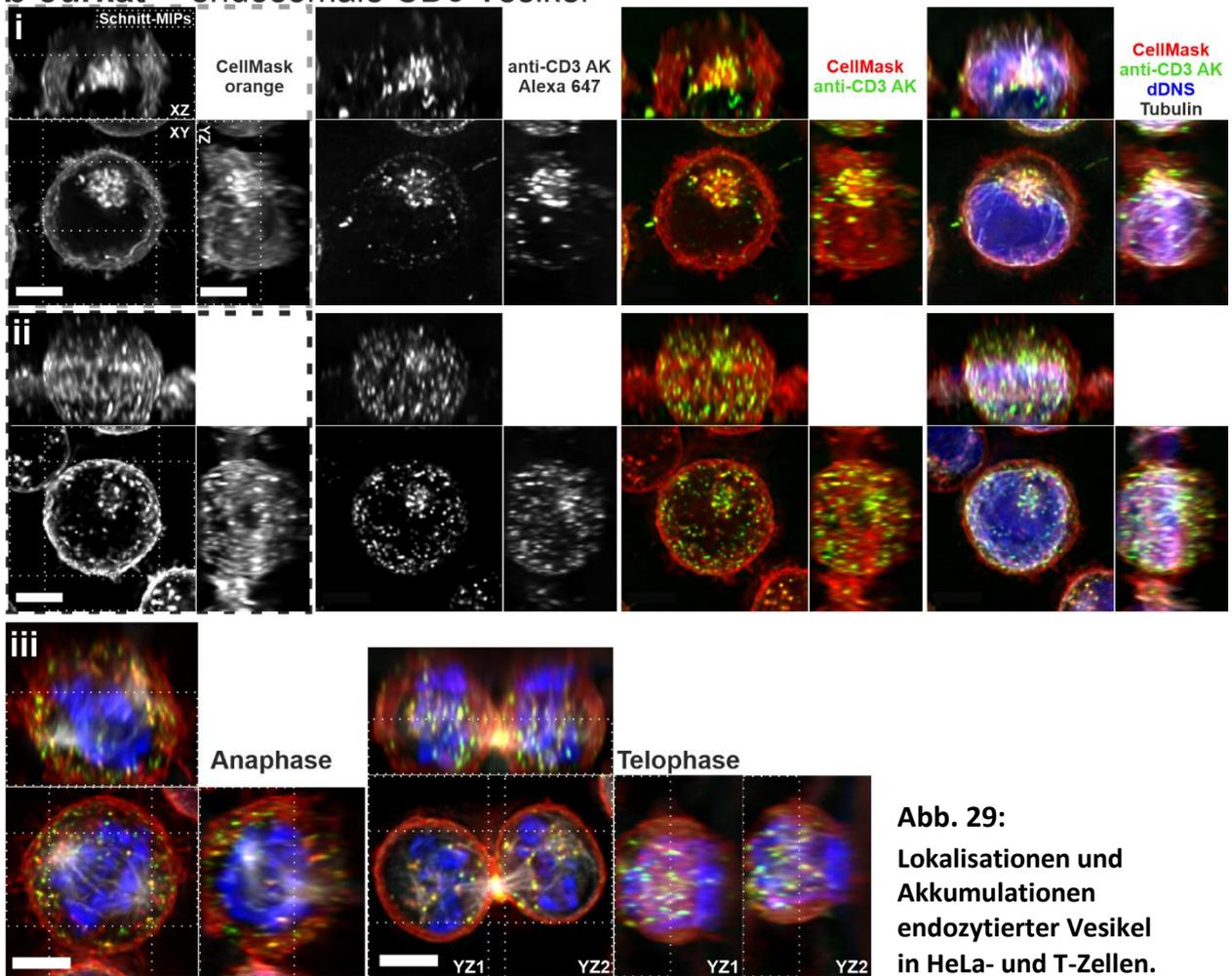


Abb. 29:
Lokalisationen und
Akkumulationen
endozytierter Vesikel
in HeLa- und T-Zellen.

c T-Zellen -- endosomale Vesikel - Akkumulationen

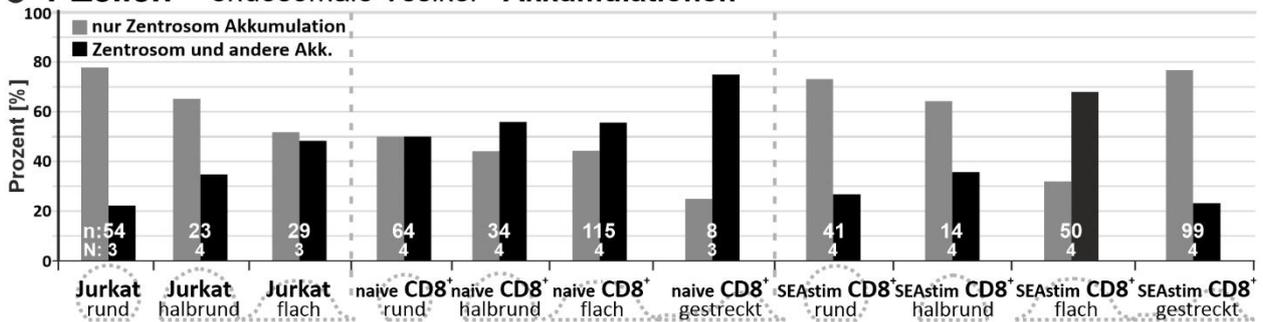


Abb. 29: Lokalisationen und Akkumulationen endozytierter Vesikel in HeLa- und T-Zellen.

a Visualisierung endozytierter Vesikel nach Plasmamembran-Färbung in HeLa-Zellen. Färbung der Zellen mit CellMask deep red (Plasmamembran, rot), MitoTracker red (Mitochondrien, grün), TubulinTracker green (Mikrotubuli, weiß) und Hoechst 33342 (dDNS, blau). Aufnahme in Ringer-Lösung bei 37°C als Z-Stapel (0,25 µm Z-Abstand), iterativ dekonvoluiert. Ein Teil des Centrosoms ist durch einen weißen Pfeil markiert. Der intrazelluläre Centrosom-Bereich ist zusätzlich als XZ-MIP (nur CellMask) und XY-Schnitt-MIP vergrößert dargestellt.

b Jurkat CD4⁺ T-Zellen. Visualisierung endozytierter Vesikel nach Plasmamembran-Färbung mit CellMask orange und Lebend-Inkubation mit Fluoreszenz-markierten anti-CD3-Antikörpern (Alexa647). Aufnahme als Z-Stapel mit 0,25 µm Z-Abstand, iterativ dekonvoluiert. Gezeigt sind zwei ruhende Beispielzellen mit reiner Centrosom-Akkumulation (**b i**) bzw. zusätzlicher Vesikel-Verteilung (**b ii**) und zwei mitotische Jurkat-Zellen (Anaphase und Telophase, **b iii**).

c Vesikel-Endozytose und Akkumulation endozytierter Vesikel in T-Zellen. Auswertung aller im Rahmen dieser Arbeit mit CellMask deep red gefärbten T-Zellen in den Zellformen „rund“, „halbrund“, „flach“ und „gestreckt“ (s. **Abb. 14**). Alle diese Zellen wiesen centrosomale Vesikel-Akkumulationen auf. Der Anteil aller untersuchten T-Zellen ohne weitere Akkumulationen endozytierter Vesikel (grau), sowie der Anteil an Zellen mit einer centrosomalen Akkumulation und weiteren Akkumulationen bzw. einer gleichmäßigen Verteilung dieser Vesikel (schwarz), ist zusammengetragen.

Maßstabsbalken: 5 bzw. 20 µm

Perforin- und endoCD3-Vesikel. Stimulierte CD8⁺ T-Zellen enthalten neben den zuvor behandelten endozytierten Vesikeln sogenannte „Lytische Granula“ (LG) (s. **Abb. 8**), die in dieser Arbeit durch die Transfektion des Plasmids „Perforin-mCherry“ visualisiert wurden (**Abb. 30**). Zur Nachverfolgung einzelner Vesikel wurden Z-Stapel-Zeitrafferaufnahmen mit möglichst hoher Zeitauflösung bei 25°C mit „Bead“-stimulierten CD8⁺ T-Zellen angefertigt, die zuvor mit Perforin-mCherry transfiziert und mit anti-CD3-Alexa⁴⁸⁸-Antikörpern inkubiert wurden (**Abb. 30 a, Film 5**). Wie in **Abbildung 29** bei endoCD3-Vesikeln konnte auch bei Perforin-Vesikeln in allen Zellen eine Akkumulation detektiert werden, deren Lokalisation mit der Lokalisation der größten endoCD3-Vesikel Akkumulation übereinstimmte (n: 42, N: 6). Im Zentrum der Vesikel-Akkumulation befand sich laut der Analyse der endosomalen Vesikel-Akkumulation (s. **Abb. 29 c**) das Centrosom (weißer Pfeil und Kreise). Der große Leerraum im Zellinneren wurde durch den Zellkern verursacht (weiße Punkte). Diese Aufnahmen zeigten sehr schnelle Bewegungen einzelner kleiner Vesikel durch die gesamte Zelle. Manche Vesikel erschienen als „Paare“ von LG und endoCD3-Vesikeln (*Qu et al. 2011*) und bewegten sich zusammen durch die Zellen. Das mit gelben Pfeilen hervorgehobene Beispiel-Paar bewegte sich vor allem in der Z-Richtung.

Um die Vesikel automatisch nachverfolgen zu können, wurden die Zellen mit einer gerade noch für die Analyse ausreichenden Auflösung mittels einer „Electron Multiplier“ (EM)CCD-Kamera bei 25°C als Fluoreszenz-Z-Stapel aufgenommen und die Aufnahmen so schnell wie möglich wiederholt. Die Z-Stapel wurden daraufhin durch iterative Dekonvolution stark in der Auflösung und im Kontrast verbessert. Anschließend wurden mithilfe des Programms „IMARIS“ (Modul: „advanced particle tracking“) automatisch dreidimensionale Nachverfolgungen („XYZ-Tracks“) aller Vesikel in beiden Kanälen angelegt und manuell gefiltert. Insgesamt wurden so Tracks von 706 Perforin- und 502 endoCD3-Vesikeln aus 9 Zellen angelegt. Die so angefertigten Tracks der Beispielzelle aus **Abb. 30 a** sind mit dem ersten Zeitpunkt der Zeitrafferaufnahme in **Abb. 30 b i** als 3D-Rekonstruktion („Rendering“) dargestellt. Aufnahmen von 6 Zellen mit einer zeitlichen Auflösung von 3-3,2 Sekunden und 3 Zellen mit einer zeitlichen Auflösung von 5,8 Sekunden wurden auf diese Weise analysiert. Zum Ausgleich der Eigenbewegung der Zellen wurde die Mitte der Perforin-Vesikel-Akkumulation jeder Zelle manuell in allen drei Raumdimensionen nachverfolgt, diese Tracks in der Z-Richtung interpoliert und die Koordinaten aller Vesikel-Tracks mit den Koordinaten dieser Tracks normiert, bevor Geschwindigkeiten berechnet wurden.

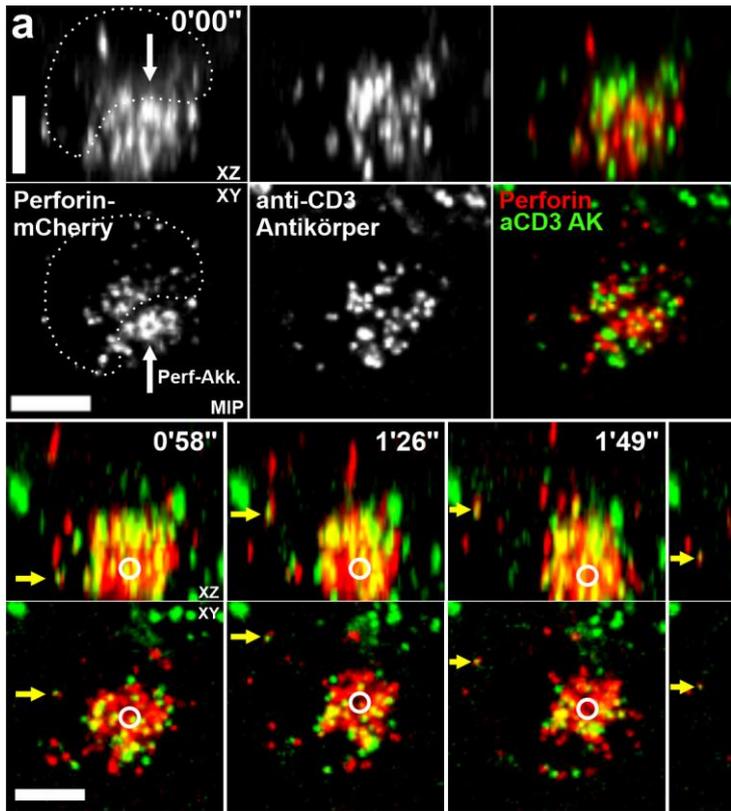


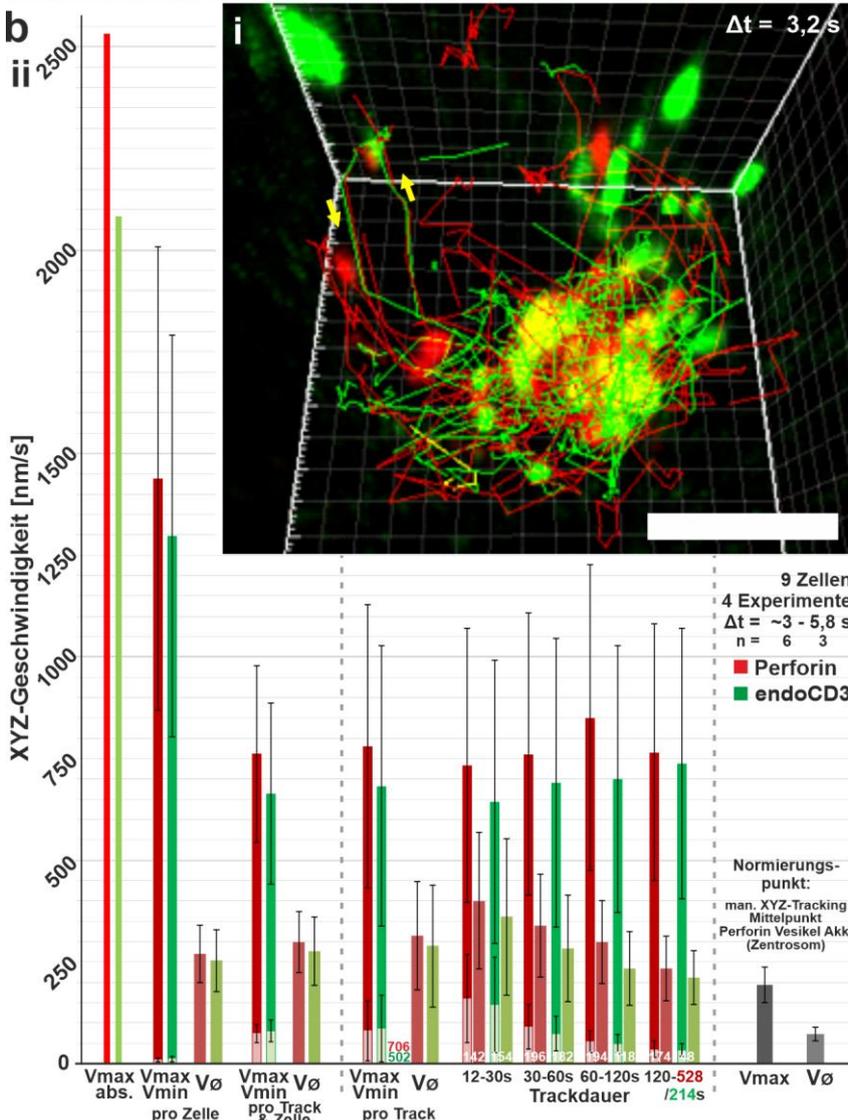
Abb. 30: Endosomale CD3- und Perforin-enthaltende Vesikel in „Bead“-stimulierten CD8⁺ T-Zellen und semi-automatische Nachverfolgung.

a XY- und XZ-Maximal-Intensitäts-Projektionen (MIP) einer mit Perforin-mCherry transfizierten und mit anti-CD3-Alexa488-Antikörpern inkubierten Bead-stimulierten CD8⁺ T-Zelle zu ausgewählten Zeitpunkten der dekonvolvierten Fluoreszenz-Zeitrafferaufnahme (0,5 µm Z-Abstand, 3,2 s Zeitauflösung) in Kulturmedium bei 25°C. Der Zellkern ist durch weiße Punkte bei 0'00'' angedeutet. Die zur Normierung genutzte Perforin-Akkumulation (weiß) und ein Perforin-endoCD3 Vesikel-„Paar“ (gelb) sind mit Pfeilen gekennzeichnet. Gesamte Aufnahme siehe **Film 5**: [dropbox.com/s/8iq4n8pnmdylcix/Film5.AVI?dl=0](https://www.dropbox.com/s/8iq4n8pnmdylcix/Film5.AVI?dl=0)

Maßstabsbalken: 5 µm



Film 5



b Semi-automatische XYZ-Nachverfolgung („Tracking“) von Vesikeln.

i Zur Generierung automatischer Tracks wurden 9 Zellen aus 4 Experimenten mit einem Z-Abstand von 500 nm und der höchstmöglichen Zeitauflösung (6x ~3 s, 3x 5,8 s) bei 25°C aufgenommen. Nach der Dekonvolution wurden mit „IMARIS advanced particle tracking“ Tracks erzeugt, gefiltert und Artefakt-arme Tracks ausgewählt. Die so ausgewählten Tracks der Beispielzelle aus a sind zusammen mit dem ersten Zeitpunkt der Zeitrafferaufnahme dreidimensional rekonstruiert. Die Bewegungsrichtung eines Vesikel-Paars ist mit gelben Pfeilen gekennzeichnet.

ii Geschwindigkeitsberechnungen aus den ausgewählten Tracks. Der absolut höchste berechnete Wert aus allen Zellen (Vmax abs.), die durchschnittliche Maximal- (Vmax) und Minimal- (Vmin) Geschwindigkeit und der Durchschnitt pro einzelner Zelle (VØ), sowie diese Geschwindigkeiten für jeden einzelnen Track pro einzelner Zelle sind für Perforin-Vesikel (rot) und endozytierte CD3-Vesikel (grün) im Graph dargestellt. Ebenso sind diese Geschwindigkeiten für jeden einzelnen Track, ohne Aufteilung auf einzelne Zellen, gezeigt (pro Track). Weiterhin wurden diese Geschwindigkeiten für verschiedene Trackdauern bestimmt. Abschließend sind die durchschnittlichen Geschwindigkeiten des zur Normierung genutzten Zentrums der Perforin-Vesikel Akkumulation, dessen Track zum Ausgleich der Zell-Eigenbewegung benutzt wurde, gezeigt (grau). Die dafür genutzten XYZ-Tracks wurden manuell erstellt und in der Z-Richtung interpoliert. Alle Geschwindigkeiten sind in Nanometer pro Sekunde (nm/s).

Fehlerbalken sind Standardabweichung.

Die durchschnittlichen Maximal- (V_{\max}), Minimal- (V_{\min}) und Durchschnitts- (V_{\emptyset}) Geschwindigkeiten, berechnet „pro Zelle“, „pro Track und pro Zelle“ und für alle Tracks unabhängig von der Zelle („Pro Track“), sind mit Spitzenwerten (V_{\max} absolut) zusammengetragen (**Abb. 30 b ii**). Weiterhin wurden alle Tracks nach der Trackdauer aufgeteilt und für diese Gruppen jeweils V_{\max} , V_{\min} und V_{\emptyset} berechnet. Die durchschnittlich pro Zelle berechneten Geschwindigkeiten des Normierungspunkts sind ebenfalls dargestellt (V_{\max} : 194 nm/s, V_{\emptyset} : 72 nm/s). Die höchste gemessene Geschwindigkeit betrug 2533 nm/s für Perforin-Vesikel und 2083 nm/s für endoCD3-Vesikel. Die V_{\max} pro Zelle lag bei 1438 nm/s (Perforin) und 1297 nm/s (endoCD3). Im Schnitt aller Tracks lag die V_{\max} bei 781 nm/s bzw. 683 nm/s. V_{\emptyset} betrug je nach Berechnung zwischen 253 nm/s und 315 nm/s, wobei Perforin-Vesikel immer eine etwa 20 nm/s höhere V_{\emptyset} aufwiesen als endoCD3-Vesikel. Aufgeteilt auf die Trackdauer wiesen kürzere Tracks eine höhere V_{\min} auf als längere Tracks. Dies zeigt die höhere Wahrscheinlichkeit für bewegungslose Momente bei längerer Wegverfolgung einzelner Vesikel. Diese Ruhemomente erklären die vor allem bei längerer Trackdauer relativ geringen Werte für V_{\emptyset} .

Zusammenfassung. Beide untersuchten Vesikel-Populationen akkumulierten in allen analysierten T-Zellen am Zentrosom, während bei HeLa-Zellen keine Akkumulation von endozytierten Vesikeln festgestellt werden konnte (**Abb. 29**). Bei formveränderten T-Zellen nahmen zusätzliche Verteilungen endozytierter Vesikel zu (**Abb. 29 c**). Einzelne Vesikel bewegten sich in ruhenden T-Zellen bei 25°C verhältnismäßig schnell durch die Zellen, mit Maximalgeschwindigkeiten von durchschnittlich etwa 1,4 $\mu\text{m/s}$ (Perforin-Vesikel) bzw. 1,3 $\mu\text{m/s}$ (endoCD3-Vesikel) (**Abb. 30**).

3.1.3 Zell-, Zellkern- und Mitochondrien-Volumen von HeLa- und T-Zellen

In Kapitel 3.1.1 wurde der Durchmesser von kugelförmigen HeLa-Zellen in der Metaphase der Mitose und kugelförmigen T-Zellen bestimmt. Mit diesen Werten wurde das Kugelvolumen für diese annähernd runden Zellen berechnet (**Tabelle 15**, „Hellfeld 2D-Messung“).

Zur genaueren Volumenmessung, der zusätzlichen Auswertung formveränderter Zellen und der Anteilsbestimmung von Zellkern (bzw. Chromosomen) und Mitochondrien wurden die Membran-, dDNS- und Mitochondrien-Fluoreszenzaufnahmen dieser Zellen (s. Abb. 25-27) dreidimensional vermessen. Dazu wurden die dekonvoluierten Aufnahmen normiert, in Z-Stapel-Binärbilder umgewandelt, dreidimensional rekonstruiert („gerendert“) und das Render-Volumen bestimmt. Die Plasmamembran-Binärbilder wurden zuvor manuell im Zellinneren ausgefüllt. Beispiele der 3D-Renderings von Gesamtzellen (**i** grau), Zellkernen bzw. Chromosomen (**ii** blau) und Mitochondrien (**iii** rot) sind in **Abb. 31 a** mit repräsentativen Durchschnittszellen und der kleinsten und größten gemessenen Zelle (nur in **i**) zusammengestellt.

Die Ergebnisse dieser Volumenmessungen (**i**) sind für HeLa, HeLa in der Metaphase der Mitose, Jurkat CD4⁺ T-Zellen, deren Metaphase, primäre naive CD8⁺ Zellen, SEA-stimulierte primäre CD8⁺ Zellen, deren Mitose, sowie „gestreckte“ SEA-stimulierte CD8⁺ Zellen mit dem durchschnittlichen individuellen Anteil von Zellkern- und Mitochondrien-Volumina am Gesamtvolumen der Zellen (**ii**) in **Tabelle 15** („Epi 3D-Rendering“ und „Anteile“) in Femtolitern (fl) aufgelistet und in **Abb. 31 b** graphisch visualisiert.

Ergebnisse

Die Auflösung der dekonvolvierten Epi-Fluoreszenz-Aufnahmen von Mitochondrien wurde durch FWHM-Messungen bestimmt (s. Abb. 11). Unmittelbar am Deckglas betrug die durchschnittliche Auflösung 150 nm in XY- und 534 nm in Z-Richtung, bei 5 µm Z-Abstand zum Deckglas 189 nm in XY- und 630 nm in Z-Richtung. Die Auflösung war demnach in Z-Richtung 3,5x bzw. 3,3x geringer als in XY-Richtung. Während die erreichte Auflösung in der XY-Richtung ausreichte, um auch sehr dünne Mitochondrien in lebenden Zellen aufzulösen, ist das gemessene Mitochondrien-Volumen durch die Elongation in der Z-Richtung als etwa um den Faktor 2 überhöht anzusehen.

Mit dieser Methode wurden 36 adhärente HeLa-Zellen ausgemessen. Das durchschnittliche (\emptyset) Volumen dieser Zellen betrug 3977 fl, ihr Zellkern hatte ein \emptyset -Volumen von 1242 fl (32 % Zellvolumen), das \emptyset -Mitochondrien-Volumen betrug 147 fl (3,8 % Zellvolumen). Die 7 metaphasischen HeLa-Zellen hatten ein \emptyset -Volumen von 5201 fl (2D-Messung: 4914 fl, 1,06x), ein \emptyset -Chromosomen-Volumen von 386 fl (7,5 %) und ein \emptyset -Mitochondrien-Volumen von 111 fl (2,1 %). Das Gesamtvolumen dieser Zellen nahm demnach bei Mitose etwa um den Faktor 1,3 zu. Der Vergleich zwischen dem Zellkern-Volumen nicht-mitotischer HeLa-Zellen und dem Volumen der Chromosomen in der Metaphase dieser Zellen zeigte einen Rückgang des Chromosomen-Volumens auf 31 % des Zellkern-Volumens.

29 „runde“ und „halbrunde“ (s. Abb. 14) nicht-mitotische Jurkat CD4⁺ T-Zellen wurden ebenso ausgemessen. Ihr \emptyset -Gesamtvolumen betrug 808 fl (2D-Messung: 703 fl, 1,15x), ihr Zellkern-Volumen 468 fl (59 %), ihr \emptyset -Mitochondrien-Volumen 29 fl (3,6 %). 10 metaphasische Jurkat-Zellen hatten ein \emptyset -Gesamtvolumen von 1055 fl (2D-Messung: 1224 fl, 0,86x), ein \emptyset -Chromosomenvolumen von 248 fl (24 %) und ein \emptyset -Mitochondrien-Volumen von 27,6 fl (2,6 %). Hier betrug das Volumen der Chromosomen mitotischer Jurkat-Zellen 53 % des Zellkern-Volumens nicht-mitotischer Jurkat-Zellen.

Tabelle 15: Volumen-Messungen und Organell-Anteile am Gesamt-Zellvolumen.

Zelltyp/-form	HeLa	HeLa Metaphase	Jurkat	Jurkat Metaphase	naive CD8 ⁺	naive CD8 ⁺ Mitose	SEA-stim. CD8 ⁺	SEA-stim. CD8 ⁺ Mitose	SEA-stim. CD8 ⁺ gestreckt
Hellfeld 2D-Messung		Abb. 12		Abb. 13 A			Abb. 13 B		
Anzahl Experimente (N)		2	5	3	4	2	4	4	
Anzahl Zellen (n)		7	241	14	289	3	266	21	
Durchmesser (µm)		21,1	11	13,3	7	11,2	10,6	13,4	
theor. Kugelvolumen (fl)		4914	703	1224	179	734	624	1271	
Epi 3D-Rendering (i)									
									Abb. 31 b i
Anzahl Experimente (N)	3	2	2	2	4		2	4	3
Anzahl Zellen (n)	36	7	29	10	24		34	15	15
Gesamt-Zellvolumen (fl)	3977	5201	808	1055	229	Auflösung	748	1215	657
Kern/Chromosomen (fl)	1242	386	468	248	137	xy z [nm]	386	329	289
Mitochondrien (fl)	147	111	29	30	8	170 583	24	44	21
LSM 3D-Rendering									
Anzahl Experimente (N)			3 / 2			Auflösung			
Anzahl Zellen (n)			15 / 30			xy z [nm]			
ER-Volumen (fl)			108	Abb. 20 b			114 412		
Mitochondrien-Vol. (fl)			24	Abb. 28 a			113 374		
Anteile (%) (ii)									
									Abb. 31 b ii
Kern/Chromosomen an Gesamtvolumen	32 %	8 %	59 %	24 %	61 %		52 %	28 %	44 %
Mitochondrien an Gesamtvolumen	3,8%	2,1 %	3,6 %	2,9 %	3,7 %		3,2 %	3,6 %	3,3 %
ER an Gesamtvolumen			26 %	<i>Abb. 20 b</i>					

Ergebnisse

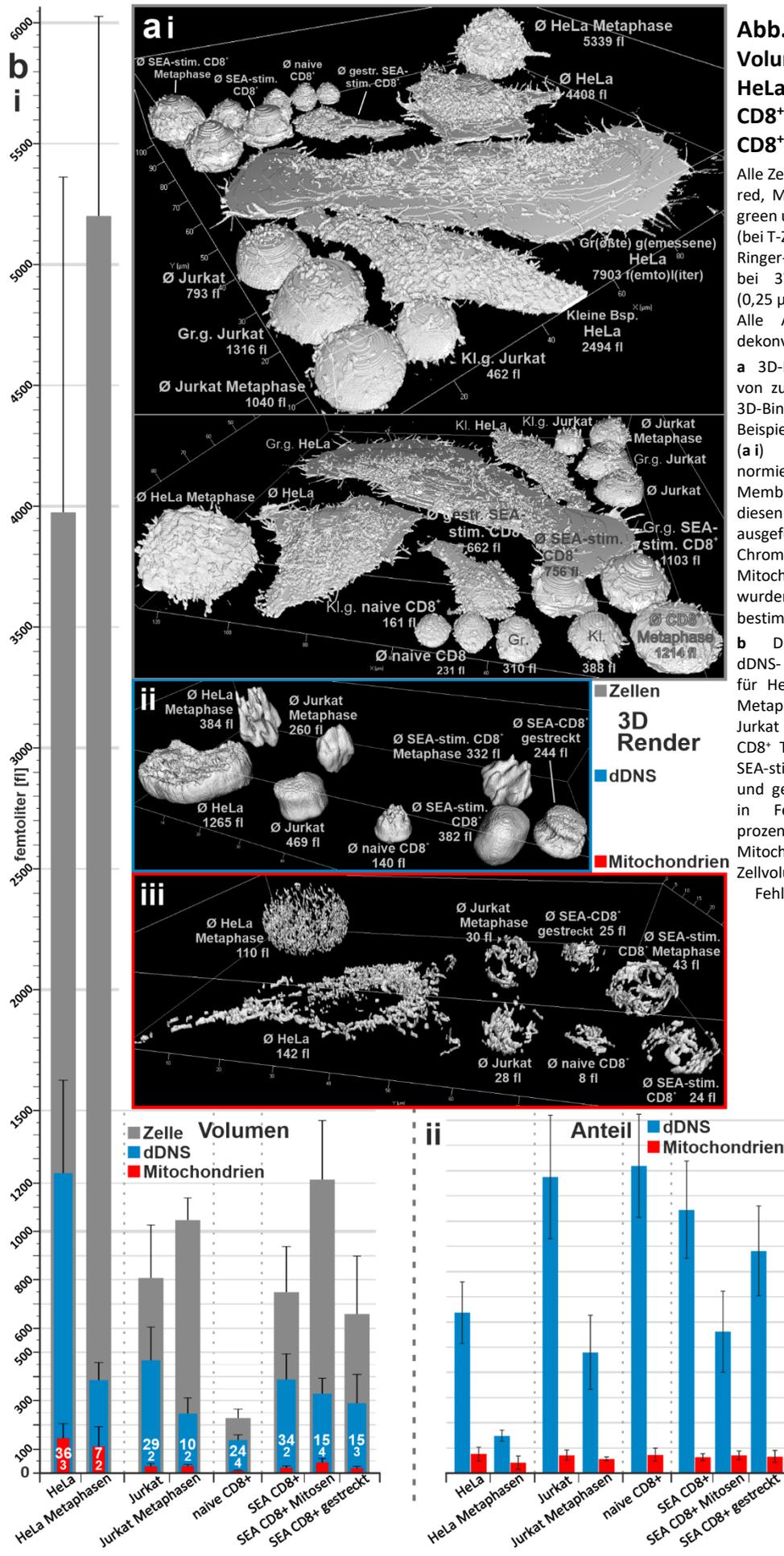


Abb. 31:
Volumenmessungen von HeLa, Jurkat CD4+, naiven CD8+ und SEA-stimulierten CD8+ T-Zellen.

Alle Zellen wurden mit CellMask deep red, MitoTracker red, TubulinTracker green und Hoechst 333342 gefärbt und (bei T-Zellen 5-30 min nach Zugabe) in Ringer-Lösung auf Glas-Deckgläsern bei 37°C als Fluoreszenz-Z-Stapel (0,25 µm Z-Abstand) aufgenommen. Alle Aufnahmen wurden iterativ dekonvolviert.

a 3D-Rekonstruktionen (Renderings) von zur Volumenmessung erstellten 3D-Binärbildern repräsentativer Beispielzellen. Das Gesamtvolumen (a i) wurde bestimmt, indem normierte Binärbilder der Membranfärbung erstellt und in diesen das Zellinnere manuell ausgefüllt wurde. Zellkern- bzw. Chromosomen-Volumen (a ii) und Mitochondrien-Volumen (a iii) wurden durch normierte Binärbilder bestimmt.

b Durchschnittliches Gesamtzell-, dDNS- und Mitochondrien-Volumen für HeLa-Zellen, HeLa-Zellen in der Metaphase, Jurkat CD4+ T-Zellen, Jurkat CD4+ in der Metaphase, naive CD8+ T-Zellen, SEA-stimulierte CD8+, SEA-stimulierte CD8+ in der Mitose und gestreckte SEA-stimulierte CD8+ in Femtolitern (fl) (b i) und prozentuale Anteile von dDNS- und Mitochondrien-Volumen am Gesamtzellvolumen (b ii).

Fehlerbalken: Standardabweichung

24 naive „runde“ und „halbrunde“ primäre CD8⁺ T-Zellen wiesen ein Ø-Volumen von 229 fl (2D-Messung: 179 fl, 1,28x), ein Ø-Zellkern-Volumen von 137 fl (61 %) und ein Ø-Mitochondrien-Volumen von 8,3 fl (3,7 %) auf. Das mittels 2D-Messung berechnete Ø-Volumen von 3 mitotischen naiven CD8⁺ Zellen betrug 734 fl, das 4,1-fache der nicht-mitotischen Zellen.

34 mit SEA stimulierte „runde“ und „halbrunde“ primäre CD8⁺ T-Zellen hatten ein Ø-Volumen von 748 fl (2D-Messung: 624 fl, 1,2x), ein Ø-Zellkern-Volumen von 386 fl (52 %) und ein Ø-Mitochondrien-Volumen von 23,7 fl (3,2 %). Damit betrug das Zellvolumen das 3,3-fache der naiven CD8⁺ Zellen, das Zellkern- und Mitochondrien-Volumen das 2,8-fache. 15 dieser Zellen in der „gestreckten“ Migrationsform (s. Abb. 14) wiesen ein Ø-Volumen von 657 fl, ein Ø-Zellkern-Volumen von 289 fl (44 %) und ein Ø-Mitochondrien-Volumen von 21,3 fl (3,3 %) auf. Bei SEA-stimulierten CD8⁺ Zellen wurden neben 5 Zellen in der Metaphase weitere 10 Zellen in der Prometaphase oder Anaphase ausgewertet, die vergleichbare Ergebnisse zu den Metaphase-Zellen lieferten (Zellvolumen 1215 fl (2D 1271 fl), Chromosomen 329 fl (28 %), Mitochondrien 43,8 fl (3,6 %)). Die Zellen vergrößerten ihr Volumen bei der Mitose damit etwa um das 1,6-fache. Das gemessene Chromosomen-Volumen betrug aufgrund des Anteils an Zellen in Prometaphase und Anaphase 85 % des Zellkern-Volumens nicht-mitotischer Zellen.

In den Kapiteln 3.1.2.3 (s. **Abb. 20 b**) und 3.1.2.5 (s. **Abb. 28 a vi**) durchgeführte Volumenmessungen von ER und Mitochondrien in fixierten Jurkat CD4⁺ T-Zellen sind in **Tabelle 15** (s. „LSM 3D-Rendering“) ebenfalls enthalten. Aufgrund der Auflösungs-Limitierung sind die im Rahmen dieser Arbeit ermittelten Volumen-Werte des ER bis zu 19-fach überhöht (s. Abb. 11). Das mittels LSM 3D-Volumenmessung bestimmte Mitochondrien-Volumen von fixierten Jurkat-Zellen lag trotz deutlich besserer Auflösung (s. Abb. 11) mit 24 fl nur leicht unter dem Wert der Epi-Fluoreszenz 3D-Volumenmessung (29 fl).

Zusammenfassung. Das gemessene Gesamtvolumen von T-Zellen war etwa fünfmal geringer als das von HeLa-Zellen. T-Zellen wiesen mit 44 bis 59 % ein deutlich höheres relatives Zellkern-Volumen auf als HeLa-Zellen (**Abb. 31 b ii**). Sie vergrößerten sich für die Zellteilung etwa um ein Drittel (**Abb. 31 b i**). Das relative Mitochondrien-Volumen betrug in nicht-mitotischen HeLa- und T-Zellen 3,2-3,8 % (**Abb. 31 b ii**). Primäre naive T-Zellen vergrößerten sich nach SEA-Stimulation um das 3,3-fache (**Abb. 31 b i**).

3.1.4 Zusammenfassung von Kapitel 3.1

Der detaillierte Vergleich der weithin genutzten Zelllinie HeLa mit diversen T-Zelltypen zeigt deutliche Unterschiede in der Dynamik der Zellform und der Organellverteilung. HeLa-Zellen flachten sich bei der Kultur auf Glas-Deckgläsern stark ab und veränderten ihre Form nur sehr langsam (**Abb. 12**). Der Großteil untersuchter T-Zellen verblieb auf dieser Oberfläche in der Kugelform oder bildete Lamellopodien in das Kulturmedium aus (**Abb. 13, 15**). Die restlichen T-Zellen breiteten sich ähnlich wie HeLa-Zellen über das Deckglas aus oder nahmen im Fall von primären T-Zellen auf dem Deckglas oder in das Medium gestreckt die Migrationsform an (**Abb. 14**). Alle Formveränderungen der T-Zellen wurden durch lokale Akkumulationen und nachfolgende Umstrukturierungen des Aktin-Zytoskeletts vollzogen (**Abb. 16 b c, 18**). Der Zellkern hatte bei den etwa fünfmal größeren HeLa-Zellen einen geringeren Anteil am

Gesamtvolumen. Der Anteil von Mitochondrien war in allen untersuchten nicht-mitotischen Zellen relativ ähnlich (**Abb. 31**). Während bei HeLa-Zellen Mitochondrien und endozytierte Vesikel relativ gleichmäßig in der gesamten Zelle verteilt waren (**Abb. 25, 29 a**), konnten in fast allen nicht-mitotischen T-Zellen Akkumulationen dieser Organellen am Zentrosom detektiert werden, neben zusätzlichen Akkumulationen in einigen runden und vermehrt in formveränderten T-Zellen (**Abb. 26, 27, 29 c**). In den meisten primären stimulierten T-Zellen waren Mitochondrien am gesamten Tubulin-Zytoskelett anzufinden (**Abb. 26**), das sich in allen runden T-Zellen vom Zentrosom ausgehend hauptsächlich um den Zellkern legte (**Abb. 22**). Bei erhöhter mitochondrialer Fission in T-Zellen kam es zu verstärkter Annäherung von kleinen Mitochondrien an die Plasmamembran (**Abb. 28**). Das Zentrosom war in stark formveränderten T-Zellen meistens nahe der Adhäsionsfläche mit dem Deckglas oder präferiert an Zell-Zell-Kontaktflächen anzufinden (**Abb. 23**). Dreidimensionale Nachverfolgungen einzelner Vesikel in stimulierten T-Zellen zeigten im Vergleich mit Zellformänderungen oder Zentrosombewegungen relativ schnelle Bewegungen durch die gesamte Zelle, sowohl zum Zentrosom hin als auch davon weg (**Abb. 30**).

Alle in diesem Kapitel untersuchten Lokalisationen von Organellen und Membranstrukturen sind für HeLa-Zellen sowie runde und formveränderte T-Zellen, mit Ergänzung der ER-Lokalisation während der Migrationsform aus *Campello et al. (2006)*, in **Abb. 43** (s. Diskussion) zusammengetragen.

3.2 T-Zellform-, Zytoskelett- und Organell-Dynamik bei Ausbildung Immunologischer Synapsen (IS)

Die Ausbildung einer Immunologischen Synapse (IS) zwischen T-Zellen und stimulierenden Zielzellen führt zu ausgeprägten strukturellen Veränderungen der T-Zellen in Form von Zellformänderungen und Umverteilungen von Organellen und Effektorproteinen wie Orai1. Im folgenden Kapitel werden die Dynamik der T-Zell-Formänderungen und die Bewegungen und Verteilungen von T-Zell Organell- und Protein-Akkumulationen bei der IS-Ausbildung mit Raji B-Zellen charakterisiert und diverse Abstände und Geschwindigkeiten quantifiziert.

3.2.1 IS-Ausbildung durch SEA-stimulierte CD8⁺ T-Zellen

Bei den in dieser Arbeit genutzten SEA-stimulierten CD8⁺ T-Zellen handelte es sich um eine Subpopulation von humanen CD8⁺ T-Zellen mit einem T-Zell-Rezeptor (TCR), der von Staphylococcus Enterotoxin A (SEA) gebunden werden kann. Durch die Inkubation von Raji-Zellen mit SEA kam es nach dem Kontakt mit SEA-stimulierten CD8⁺ T-Zellen trotz der Bindung des TCR an MHC-II (statt MHC-I) zu einer starken Aktivierung der T-Zellen über ihren TCR (s. *Dohlsten et al. 1990; Knorck et al. 2018*).

Im Widerspruch zu der etablierten These der rein Zentrosomal-vermittelten Anhäufung Lytischer Granula (LG) an der IS (*Stinchcombe et al. 2006; Frazer et al. 2021*) zeigten viele Studien Zentrosom-unabhängige Mechanismen dieses Vorgangs (*Qu et al. 2011; Kurowska et al. 2012; Wang et al. 2022*). Aus diesem Grund wurden T-Zell-Formänderungen sowie Zentrosom- und Organell-Bewegungen und das Auftreten apoptotischer „Blebs“ (s. **Abb. 3**) bei Zielzellen während der IS-Ausbildung im Detail untersucht.

3.2.1.1 T-Zell Formänderung und Zentrosom-Dynamik bei Abtötung von B-Zellen

Mit „ γ -Tubulin-EGFP“ transfizierte SEA-stimulierte CD8⁺ T-Zellen wurden auf Poly-L-Ornithin-beschichtete Deckgläser mit Kulturmedium aufgebracht, bevor mit SEA beladene Raji B-Zellen hinzugegeben wurden. Anschließend wurden möglichst viele T-Zellen mit B-Zell-Kontakten als Z-Stapel im Hellfeld und in der EGFP-Fluoreszenz über einen Zeitraum von 38 bis 45 Minuten alle 157 Sekunden aufgenommen (**Abb. 32 A, Filme 6a, 6b, 6c**). Alle Analysen sind in **Abb. 32 B** zusammengefasst.

Bei diesen Experimenten kam es zu unterschiedlichen Abläufen bei der Ausbildung von Immunologischen Synapsen (IS) in Form von nahen, „direkten“ (**Abb. 32 i**) und fernen, „gestreckten“ (**ii, iii**) Kontakten zwischen T- und B-Zellen, da alle Zellen stark haftende Kontaktflächen mit Poly-L-Ornithin-beschichteten Deckgläsern ausbildeten. Bei direkten Kontakten breitete sich zunächst die Membran der T-Zelle über die Membran der B-Zelle aus und zog sich anschließend ringförmig zusammen, während sich die T-Zelle „drehte“ (**Abb. 32 A i** Zellkern, weiße Punkte) (s. *Maccari et al. 2016*). Ferne Kontakte kamen erst nach der „Streckung“ in die Migrationsform zustande (s. Abb. 14), bei welcher der Uropod meist sehr fest mit dem Deckglas verbunden blieb und der Zellkern zunächst zu der Kontaktfläche mit der Zielzelle (IS) bewegt wurde. Ohne Behinderung durch andere Zellen (s. **Abb. 32 A iii**), nahmen alle T-Zellen während der Kontraktion der Membran wieder eine runde Form an (**A i, A ii** weiße Pfeile). Dabei wurde die Zellkern-Einbuchtung (s. Abb. 19) zur IS orientiert, während Uropod und IS zusammengebracht wurden.

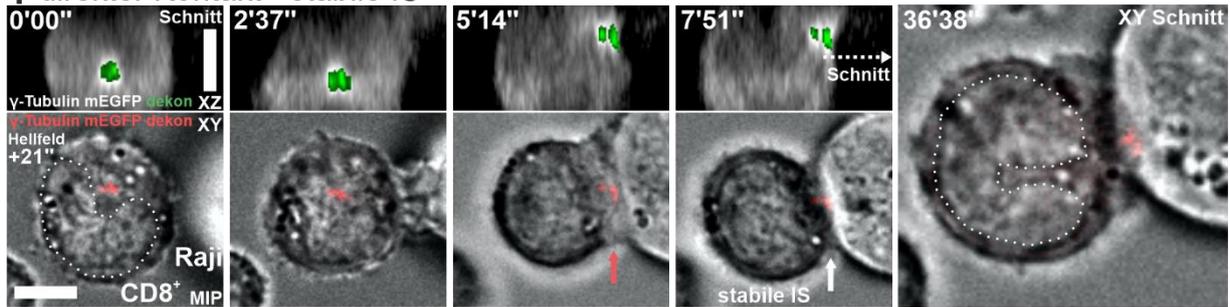
Diese stabile, runde Zellform nach längerem Kontakt wird im gesamten Rest dieser Arbeit als „stabile IS“ bezeichnet. „Gestreckte“ Kontakte, bei denen diese runde Zellform im Verlauf der Experimente nicht vollständig von den T-Zellen eingenommen werden konnte, werden als „unvollständige IS“ bezeichnet.

Das Zentrosom war in allen Beispielzellen nach etwa 5 Minuten an der IS lokalisiert (**Abb. 32 A** rote Pfeile), bei „stabiler IS“-Zellform sehr nah und unbeweglich (**i, ii**). Bei „gestreckten“ Zellen befand sich das Zentrosom zunächst am Uropod und bewegte sich nach Kontakt am Zellkern vorbei zur IS.

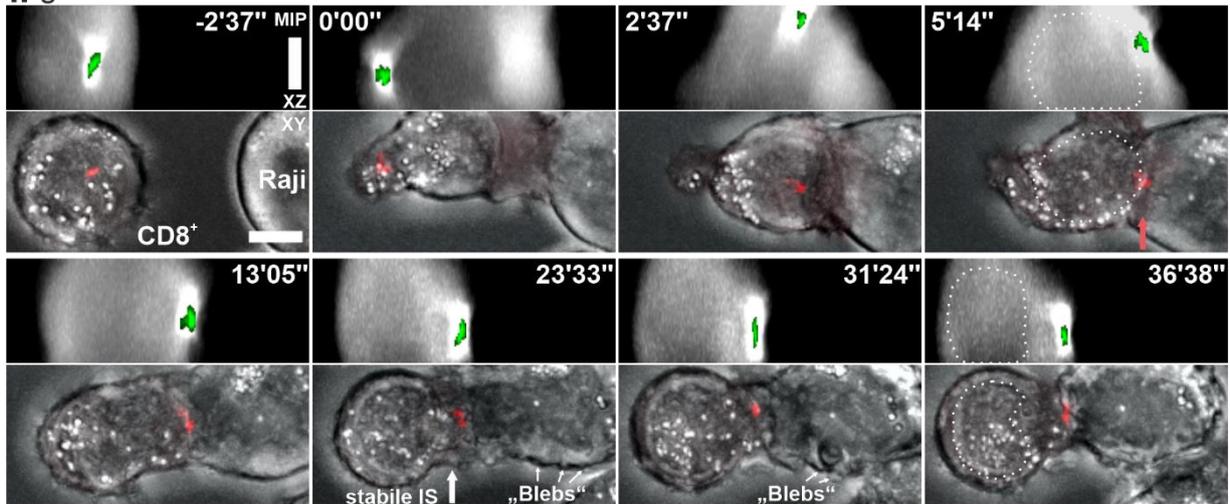
Die meisten in diesen Experimenten von T-Zellen kontaktierten Raji B-Zellen bildeten im Verlauf der Experimente apoptotische Membranbläschen („Blebs“) aus (s. Abb. 3, **Abb. 32 B e**). Beispiele für diese „Blebs“ sind bei den B-Zellen in **Abb. 32 A ii** und **A iii** und außerdem in **Abb. 33 a, 35 b** und **36** gezeigt.

Zur Visualisierung der Zellformänderungen und zur Abstandsberechnung wurden die Mittelpunkte von T-Zelle und B-Zelle (schwarze Kreuze bzw. Kreise), Kontaktstelle (IS, orange Raute), Zellkern (blaue Rechtecke), Uropod (graue Kreise) und Zentrosom (grüne Dreiecke) mithilfe der XY-Maximal-Intensitäts-Projektionen (MIP) manuell nachverfolgt (**Abb. 32 B**, XY-Tracking). Auf den IS-Track normierte Tracks der Beispielzellen aus **Abb. 32 A** sind in **Abb. 32 B a** für direkten Kontakt (**Abb. 32 i**), gestreckten Kontakt mit stabiler IS (**ii**) und gestreckten Kontakt mit unvollständiger IS (**iii**) als XY-Plot dargestellt, die XY-Abstände zur IS über die Zeit und die bis zur stabilen IS-Zellform vergangene Zeit in **Abb. 32 B b** als Graph. Bei allen Beispielzellen näherte sich das Zentrosom (grün) innerhalb von 5 Minuten bis auf etwa 1 μm an die IS an. Der Zellkern (blau) näherte sich bis etwa Minute 8 der IS an und bewegte sich bei allen Zellen anschließend von ihr weg. Der Uropod (grau) näherte sich bei Bildung einer stabilen IS bis auf etwa 4 μm der IS an, im Beispiel mit unvollständiger IS bis auf etwa 8 μm .

i direkter Kontakt - stabile IS



ii gestreckter Kontakt - stabile IS



iii gestreckter Kontakt - unvollständige IS

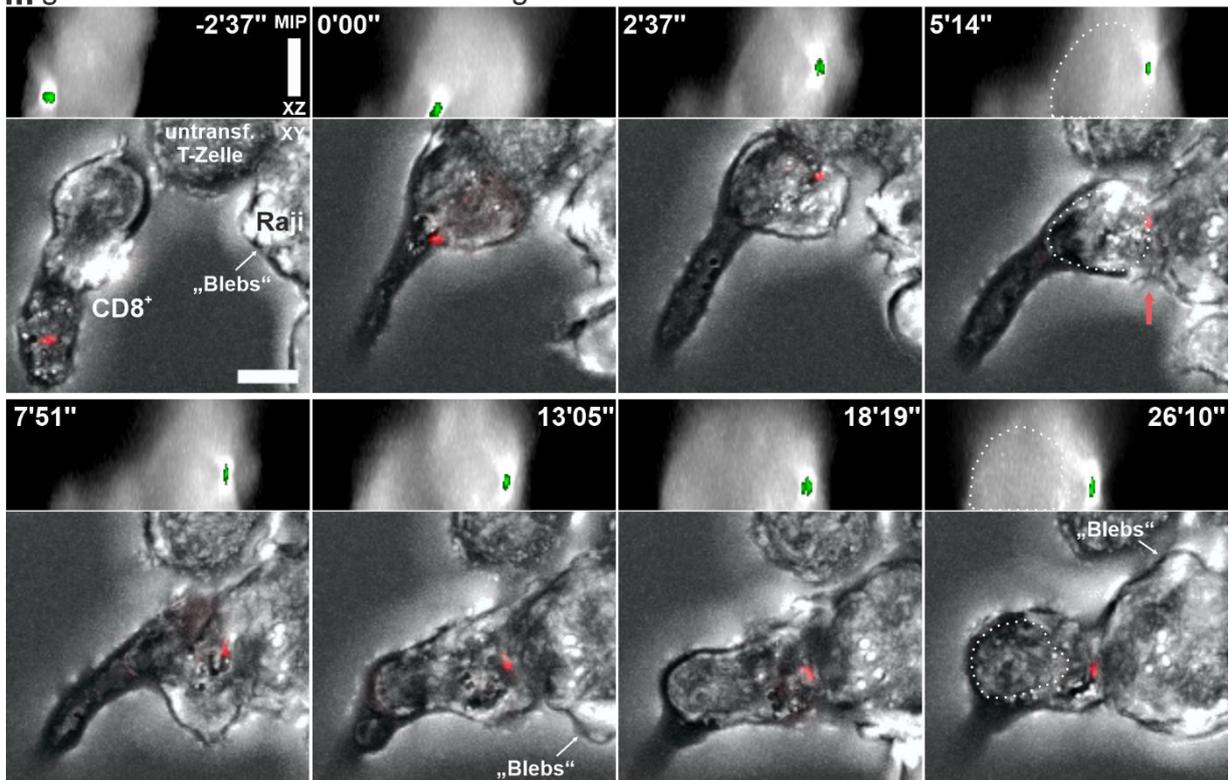
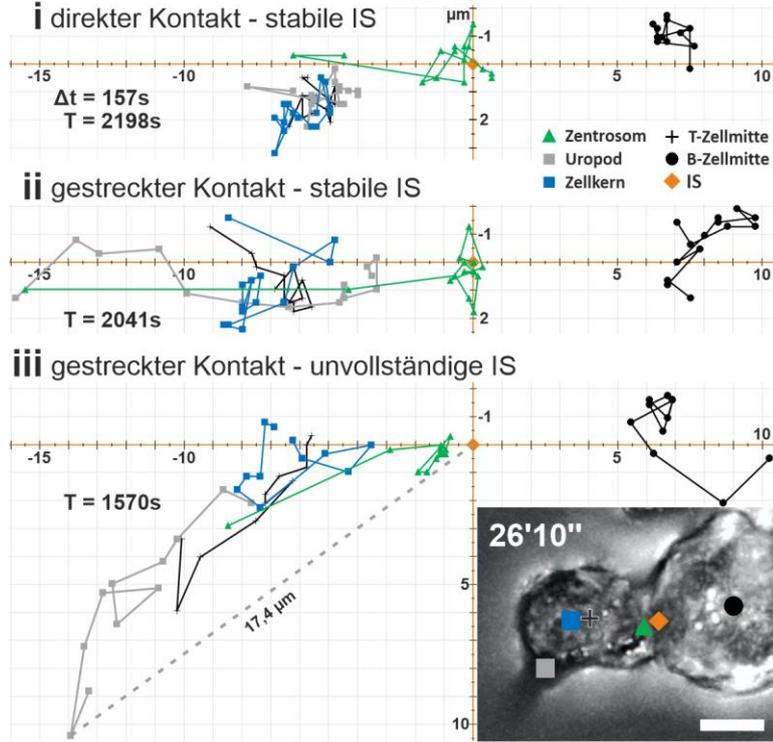


Abb. 32 A: T-Zell Formänderung und Zentrosom-Dynamik bei CD8⁺-Raji-Kontakten -- Beispiele.

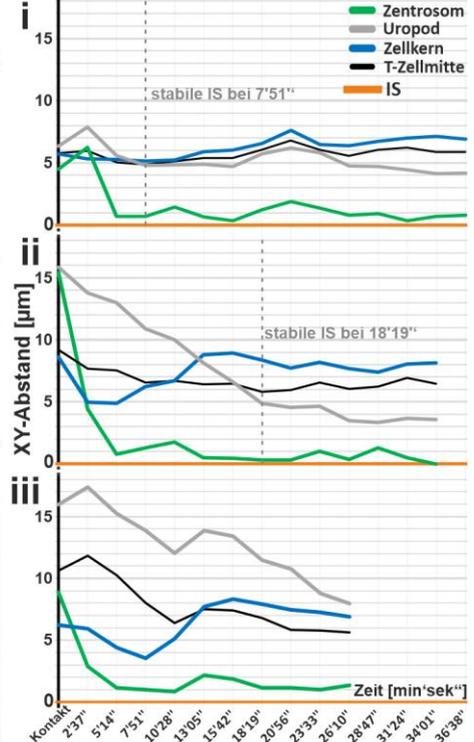
Beispiele für direkten (i) bzw. fernen („gestreckten“) (ii) Kontakt mit vollständiger Ausbildung einer Immunologischen Synapse (stabile IS) zwischen γ -Tubulin-EGFP-transfizierten SEA-stimulierten CD8⁺ T-Zellen mit SEA-beladenen Raji B-Zellen in Kulturmedium bei 37°C. Ein Beispiel für eine stark gestreckte T-Zelle mit unvollständiger IS-Ausbildung ist in iii gezeigt. Hellfeld- und Fluoreszenz-Z-Stapel-Aufnahmen (0,3 μ m Z-Abstand) wurden alle 157 Sekunden angefertigt und die Fluoreszenzaufnahmen iterativ dekonvolviert. Angezeigt sind ein XY-Schnitt (i, 36'38“) bzw. die XY-Maximal-Intensitäts-Projektionen (MIP) der Hellfeldaufnahmen mit der Zentrosom-Fluoreszenz (rot) und XZ-Schnitte bzw. XZ-MIPs der EGFP-Fluoreszenz (weiß) mit Zentrosom (grün). Der Zellkern ist durch weiße Punkte hervorgehoben. Beispiele für apoptotische Membranbläschen („Blebs“) (s. Abb. 3) bei den Raji B-Zellen sind in ii und iii gezeigt. **Maßstabsk balken: 5 μ m**

Ergebnisse

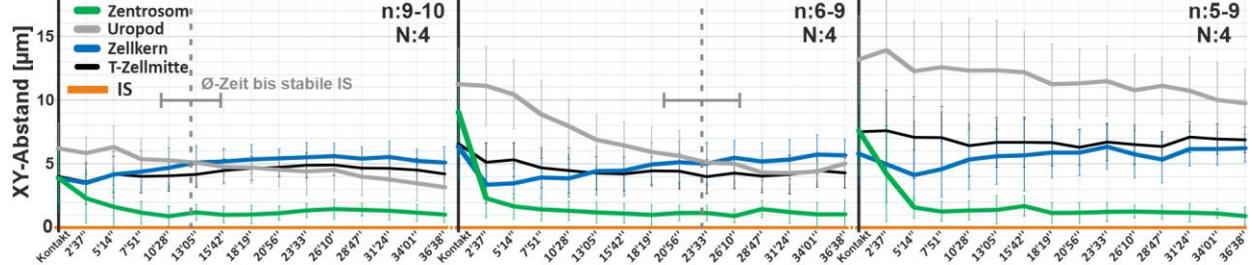
a manuelles XY-Tracking - normiert auf IS



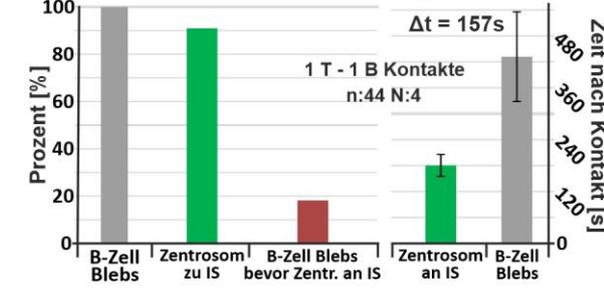
b Abstand zur IS



c i direkter Kontakt - stabile IS ii gestr. Kontakt - stabile IS iii gestr. Kontakt - unvollst. IS



d Zentrosom und B-Zell-„Blebs“



e B-Zell-„Blebs“ Histogramm

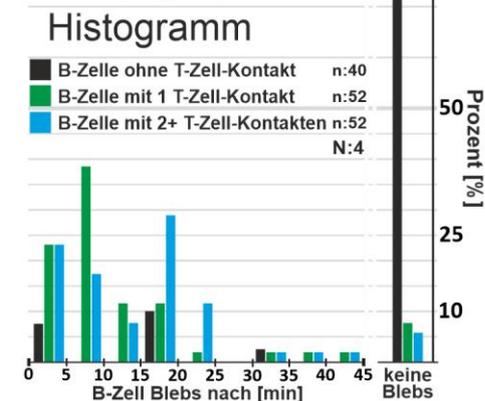


Abb. 32 B: T-Zellform, Zentrosom-Dynamik und B-Zell-Apoptose bei CD8⁺-Raji Kontakten -- Analysen.

Zur Analyse der Experimente von Abb. 32 A wurden manuelle XY-Tracks der Mittelpunkte von Zentrosom (grüne Dreiecke), T-Zellmitte (schwarze Kreuze), B-Zellmitte (schwarze Kreise), Uropod (graue Kreise), Zellkern (blaue Vierecke) und T-B-Kontaktstelle (IS, orange Rauten) angefertigt. Die auf die IS normierten Tracks (a) und XY-Abstände zur IS über die Zeit sowie der Zeitpunkt mit stabiler IS-Zellform nach Kontakt (b) sind für die Beispielfellen mit direktem Kontakt (i), gestrecktem Kontakt (ii) und unvollständiger IS (iii) dargestellt. Der letzte Zeitpunkt von iii ist als MIP mit Beispiel-Mittelpunkten gezeigt.

Film 6a: [dropbox.com/s/shgeigvf53fz7av/Film6a.AVI?dl=0](https://www.dropbox.com/s/shgeigvf53fz7av/Film6a.AVI?dl=0) Film 6b: [dropbox.com/s/0qmcsmakszdn6b/Film6b.AVI?dl=0](https://www.dropbox.com/s/0qmcsmakszdn6b/Film6b.AVI?dl=0)

Film 6c: [dropbox.com/s/9583rrx7azakpb3/Film6c.AVI?dl=0](https://www.dropbox.com/s/9583rrx7azakpb3/Film6c.AVI?dl=0)

Maßstabsbalken: 5 μm

Film 6c

c Durchschnittlicher Abstand zur IS über die Zeit und die ϕ -Zeit bis zur stabilen IS-Zellform für 10 (i), bzw. 9 (ii & iii) Zellen aus 4 Experimenten. d Bei 44 Kontakten zwischen einzelnen T-Zellen und B-Zellen mit apoptotischen „Blebs“ wurde die Zentrosom-Translokation mit dem Auftreten der „Blebs“ abgeglichen und die benötigten Zeiträume gemittelt. e Bei 144 Raji B-Zellen wurde das Auftreten von „Blebs“ bei kontaktslosen B-Zellen (schwarz) bzw. nach Kontakt mit einer (grün) oder mehreren (blau) CD8⁺ T-Zellen bestimmt und der Zeitpunkt der Auftretung nach Experimentbeginn bzw. Kontakt als Histogramm in 5 min Zeit-Schritten aufgetragen. Fehlerbalken sind Standardabweichung.

Insgesamt wurden auf diese Weise 28 Zellen aus 4 Experimenten analysiert. Die durchschnittlichen (\emptyset) XY-Abstände zur IS über die Zeit und die \emptyset -Zeit bis zur „stabilen IS“-Zellform (für **i** und **ii**) wurden in **Abb. 32 B c** graphisch dargestellt. Zellen mit direktem Kontakt benötigten im Schnitt knapp 13 Minuten, „gestreckte“ Zellen 23 Minuten bis zur runden Zellform einer stabilen IS. Der \emptyset -Abstand zwischen Zentrosom und IS (grün) betrug bei allen Zellen nach etwa 5 Minuten unter $2\ \mu\text{m}$ und unterschritt fast nie $1\ \mu\text{m}$. Der \emptyset -Abstand zwischen Zellkern-Mittelpunkt und IS (blau) verringerte sich zunächst bei allen „gestreckten“ Zellen auf etwa $3\text{-}4\ \mu\text{m}$, bevor er bei allen Zellen auf etwa $5\ \mu\text{m}$ anstieg. Der \emptyset -Abstand zwischen Uropod-Mittelpunkt und IS (grau) verkleinerte sich bei stabiler IS-Bildung auf $3\ \mu\text{m}$ (**i**) bzw. $4\text{-}5\ \mu\text{m}$ (**ii**). Bei unvollständiger IS nahm der Uropod-IS-Abstand im Schnitt von 13 auf $10\ \mu\text{m}$ ab.

Zur Analyse der Abhängigkeit des Abtötungsvorgangs von der Lokalisation des Zentrosoms an der IS wurden 44 CD8^+ /B-Zell-Einzelkontakte ausgewertet, bei denen B-Zell-„Blebs“ detektiert werden konnten (**Abb. 32 B d**). Die „Blebs“ konnten im Schnitt etwa 7 Minuten nach Kontakt festgestellt werden. In 91 % der untersuchten T-Zellen bewegte sich das Zentrosom im Schnitt innerhalb von 3 Minuten zur IS. Bei 18 % der B-Zell-Kontakte konnten „Blebs“ detektiert werden, bevor das T-Zell-Zentrosom die IS erreichte. Zur Kontrolle der Zytotoxizitätseffizienz der eingesetzten SEA-stimulierten CD8^+ T-Zellen wurde das Auftreten apoptotischer „Blebs“ bei 144 Raji B-Zellen untersucht und der Zeitpunkt des Auftretens nach Experimentbeginn bei kontaktlosen Zellen bzw. nach Kontakt mit T-Zellen bestimmt (**Abb. 32 B e**). Kontaktlose B-Zellen zeigten in 20 % der Fälle „Blebs“, bei Kontakt mit einer T-Zelle waren es 92,3 %, bei Kontakt mit mehreren T-Zellen 94,2 %. Die „Blebs“ traten bei 90 % der apoptotischen B-Zellen innerhalb von 25 Minuten nach Erstkontakt auf, bei mehr als der Hälfte innerhalb von 10 Minuten.

Zusammenfassung. T-Zellen breiteten sich nach Kontakt mit stimulierenden B-Zellen zunächst über die Oberfläche der B-Zelle aus, um anschließend eine runde Zellform mit verkleinerter Kontaktfläche und spezifischer Zellkern-Ausrichtung einzunehmen, bei der der ehemalige Uropod möglichst nahe zur IS gebracht wurde (**Abb. 32 i ii**). Die feste Verbindung des Uropods mit dem Deckglas und der Einfluss anderer T-Zellen verhinderte in einigen Fällen den Abschluss dieses Prozesses (**Abb. 32 iii**). Das Zentrosom wanderte unabhängig von der Zellformänderung in fast allen untersuchten T-Zellen innerhalb von wenigen Minuten zur IS. Im zeitlichen Durchschnitt erreichte das Zentrosom die IS, bevor apoptotische „Blebs“ bei den B-Zellen nachgewiesen werden konnten. Allerdings konnten einige Kontakte detektiert werden in welchen bei B-Zellen „Blebs“ auftraten, bevor das Zentrosom die IS erreichte (**Abb. 32 B d**).

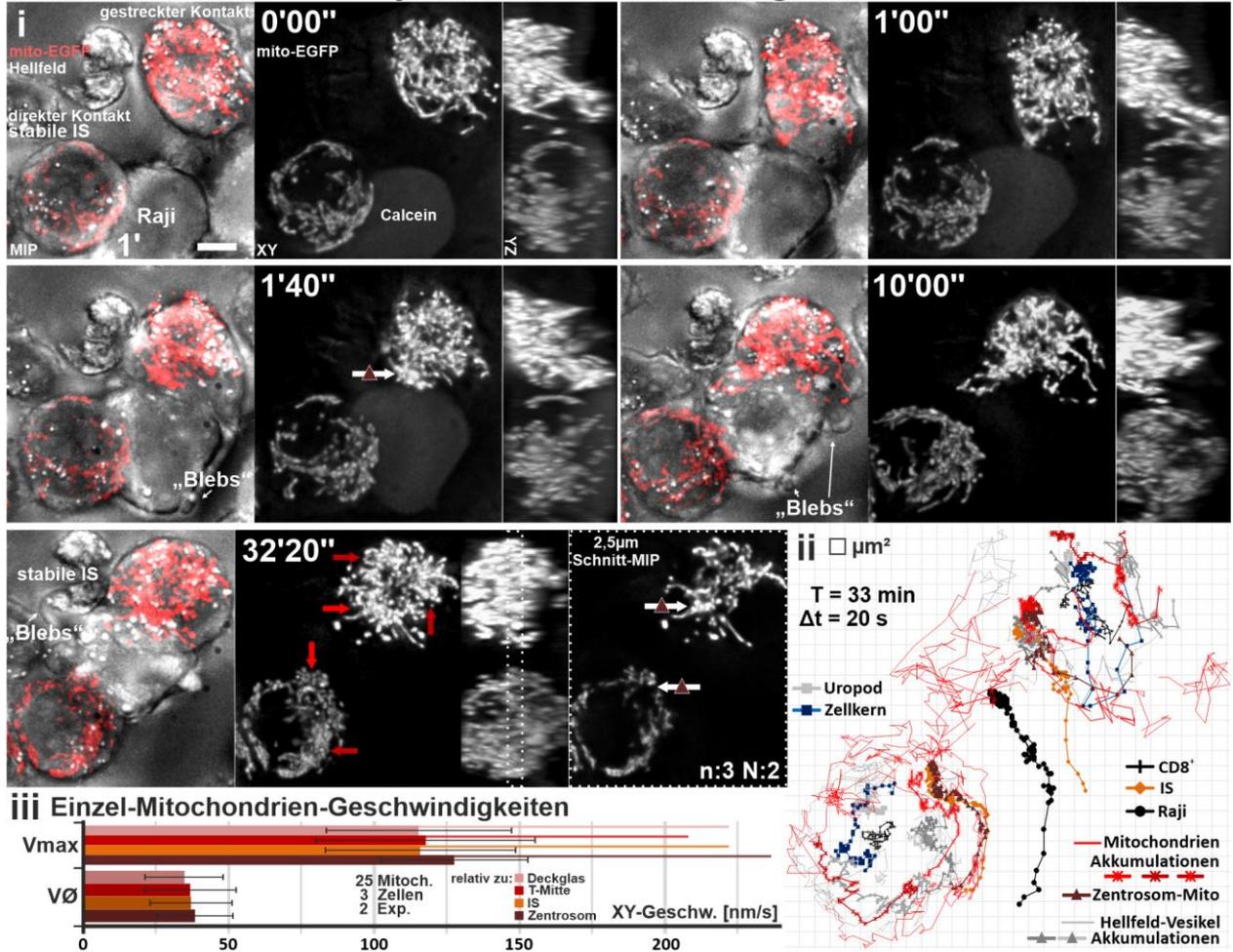
3.2.1.2 T-Zellform- und Mitochondrien-Dynamik bei Abtötung von B-Zellen

Kontaktlose SEA-stimulierte CD8^+ T-Zellen zeigten in Kapitel 3.1.2.5 durchgehend eine zentrosomale Akkumulation von Mitochondrien und überwiegend eine zusätzliche gleichmäßige Verteilung von Mitochondrien oder weitere Akkumulationen in mehreren Zellteilen (s. Abb. 26 c). In diesem Unterkapitel werden einzelne Mitochondrien bei der Ausbildung einer Immunologischen Synapse (IS) (**Abb. 33 a**) und die Dynamik von zentrosomalen und „sekundären“ Mitochondrien-Akkumulationen bei stabiler und unvollständiger IS-Ausbildung (s. Abb. 32, **Abb. 33 b**) in SEA-stimulierten CD8^+ T-Zellen untersucht.

Einzel-Mitochondrien. Zur detaillierten Analyse der Mitochondrien-Verteilung und der Geschwindigkeit einzelner Mitochondrien bei der IS-Ausbildung wurden SEA-stimulierte CD8⁺ T-Zellen mit dem Plasmid „mito-EGFP“ transfiziert und auf Poly-L-Ornithin-beschichtete Deckgläser aufgebracht. Anschließend wurden SEA-beladene und „Calcein“-gefärbte Raji B-Zellen hinzugegeben. Für eine hohe räumliche und zeitliche Auflösung wurden die Zellen mit einer „Electron-Multiplier“ (EM)CCD-Kamera und einem 100x Objektiv aufgenommen (Beispielzellen in **Abb. 33 a, Film 7a**). Alle transfizierten Zellen wiesen eine hohe Anzahl an Mitochondrien auf, die in der gesamten Zelle verteilt waren (s. **Abb. 33 a i**). Das Zentrosom konnte durch Muster, die von an Mikrotubuli gebundenen Mitochondrien gebildet wurden, lokalisiert werden (tiefrote Dreiecke) (s. Abb. 26, 27). In der Nähe des Zentrosoms befand sich in allen Zellen eine Akkumulation von Mitochondrien (primäre Akkumulation, rote Pfeile). Weitere Akkumulationen befanden sich am Uropod und gegenüber dem Zellkern (dunkelrote Pfeile). Mithilfe der XY-Maximal-Intensitäts-Projektionen (MIP) wurden die Mittelpunkte von B-Zelle (schwarze Kreise), T-Zelle (schwarze Kreuze), Kontaktstelle (IS, orange Rauten), Uropod (graue Rechtecke), Zellkern (blaue Rechtecke), im Hellfeld erkennbaren Vesikeln (graue Linien) und deren Akkumulationen (graue Dreiecke), Zentrosom (tiefrote Dreiecke), Mitochondrien-Akkumulationen (rote und dunkelrote Kreuze) und einzelnen Mitochondrien (rote Linien) für 3 T-Zellen manuell nachverfolgt. Die so erzeugten „Tracks“ der Beispielaufnahme wurden als XY-Plot relativ zum Deckglas dargestellt (**a ii**).

Die untere Beispielzelle in **Abb. 33 a** kontaktierte die B-Zelle „direkt“ (s. Abb. 32 i) kurz vor Beginn der Aufnahme, das Zentrosom (tiefrote Dreiecke) befand sich bereits an der Kontaktstelle. Im Verlauf der Aufnahme drehte sich die T-Zelle mit der Kontaktstelle, weil die B-Zelle von der oberen Beispielzelle herangezogen wurde. Eine Mitochondrien-Akkumulation war während der gesamten Aufnahme in der Nähe des Zentrosoms lokalisiert (roter Pfeil). Eine sekundäre Mitochondrien-Akkumulation wurde im Experimentverlauf näher zur IS gebracht (dunkelroter Pfeil). Die obere Beispielzelle in **Abb. 33 a** streckte sich zunächst mit dem Zellkern voran zur Kontaktbildung aus (0'00“-1'00“), um im Experimentverlauf durch Heranziehen der B-Zelle in Richtung des T-Zell-Uropods die runde Zellform einer „stabilen IS“ einzunehmen (s. Abb. 32 ii). Zentrosomale Mitochondrien erreichten 1'40“ nach Kontakt die IS (tiefrote Dreiecke). Eine Mitochondrien-Akkumulation nahe des Zentrosoms bewegte sich hinter dem Zentrosom zur IS und verblieb im Experimentverlauf dort. Zwei weitere Mitochondrien-Akkumulationen befanden sich im Verlauf des Experiments dauerhaft in der Nähe des Uropods und gegenüber dem Zellkern (dunkelrote Pfeile und Linien). Vor Kontakt erschienen die meisten Mitochondrien unbeweglich. Etwa 5-6 Minuten nach Kontakt begannen einzelne Mitochondrien, sich schnell durch die Zellen zu bewegen. Dabei wurden vor allem in der „gestreckten“ Beispielzelle viele einzelne Mitochondrien zu den äußeren Bereichen der Kontaktfläche mit der B-Zelle bewegt und verblieben dort wenige Minuten, um danach wieder ins Zellinnere transportiert zu werden. Mithilfe der angelegten Tracks wurden die mittleren XY-Maximal- (V_{max}) und Durchschnitts- (V_{\emptyset}) Geschwindigkeiten von 25 Mitochondrien aus 3 Zellen relativ zu Deckglas, T-Zellmitte, IS und Zentrosom berechnet (**Abb. 33 a iii**). Die V_{max} betrug etwa 120 nm/s, mit Spitzenwerten von 200-240 nm/s. Aufgrund längerer Verweildauern ohne Bewegung betrug die V_{\emptyset} über die gesamten Experimente hinweg nur etwa 30 nm/s.

a Einzel-Mitochondrien-Dynamik und -Geschwindigkeiten



b T-Zell Formänderung und Mitochondrien-Dynamik relativ zur IS

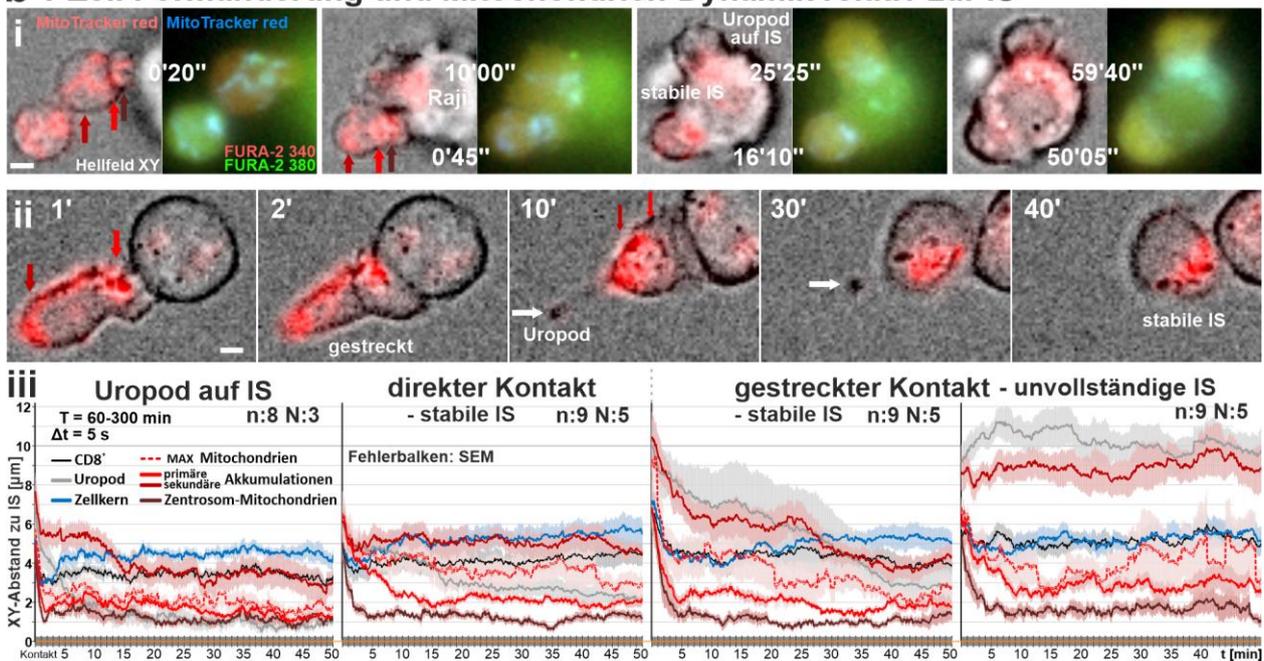


Abb. 33: T-Zell Mitochondrien-Dynamik und -Geschwindigkeiten bei CD8⁺-Raji Kontakten

Abb. 33: T-Zell Mitochondrien-Dynamik und -Geschwindigkeiten bei CD8⁺-Raji Kontakten.

a i Direkter und gestreckter Kontakt und vollständige Ausbildung Immunologischer Synapsen (IS) von mito-EGFP-transfizierten SEA-stimulierten CD8⁺ T-Zellen mit einer Calcein-gefärbten und SEA-beladenen Raji B-Zelle in Kulturmedium bei 37°C. Hellfeld- und Fluoreszenz-Z-Stapel-Aufnahmen (0,25 µm Z-Abstand) wurden alle 20 Sekunden mit einem 100x Objektiv und einer EMCCD-Kamera angefertigt und die Fluoreszenzaufnahmen iterativ dekonvolviert. Die XY-Maximal-Intensitäts-Projektionen (MIP) der zusammengelegten Hellfeld- und Fluoreszenz- (rot) Aufnahmen und die XY- und YZ-MIPs der Fluoreszenzaufnahmen (weiß) sind zu ausgewählten Zeitpunkten dargestellt, beginnend mit dem Kontakt der gestreckten T-Zelle. Eine 2,5 µm Schnitt-MIP durch zentrosomale Mitochondrien beider T-Zellen (tiefrote Dreiecke) ist zusätzlich für den letzten Zeitpunkt der Aufnahme dargestellt. n: 3, N: 2 **Film 7a:** dropbox.com/s/mqg9tadf8gena1x/Film7a.AVI?dl=0 **Maßstabsbalken: 5 µm**



Film 7a

a ii Zur Visualisierung der Dynamik wurden die Mittelpunkte von B-Zelle (schwarze Kreise), T-Zellen (schwarze Kreuze), Kontaktstellen (IS, orange Rauten), Uropoden (graue Rechtecke), Zellkernen (blaue Rechtecke), im Hellfeld erkennbaren Vesikeln (hellgraue Linien) und deren Akkumulationen (graue Dreiecke), Einzel-Mitochondrien (rote Linien), zentrosomalen Mitochondrien (tiefrote Dreiecke) und primären (rote Kreuze) und sekundären (dunkelrote Kreuze) Mitochondrien-Akkumulationen manuell in der XY-Richtung nachverfolgt (getrackt) und die Tracks als XY-Plot relativ zum Deckglas dargestellt. **iii** Die durchschnittliche Maximalgeschwindigkeit mit Spitzenwerten (V_{max}) und die mittlere Durchschnittsgeschwindigkeit ($V_{\bar{}}$) von 25 getrackten Mitochondrien aus 3 Zellen wurden relativ zu Deckglas, T-Zellmitte, IS und Zentrosom berechnet und sind mit der Standardabweichung in Nanometern pro Sekunde (nm/s) dargestellt.

b Mit MitoTracker red (rot bzw. blau) und FURA-2 (340 nm Anregung rot, 380 nm Anregung grün) gefärbte SEA-stimulierte CD8⁺ T-Zellen im Kontakt mit FURA-2-gefärbten und SEA-beladenen Raji B-Zellen. Einzelne Hellfeld- und Fluoreszenz-Z-Ebenen wurden alle 5 Sekunden über einen Zeitraum von 60-300 Minuten mit einem 40x Objektiv und einer EMCCD-Kamera aufgenommen. Gezeigt sind ausgewählte Zeitpunkte von Beispielzellen, deren Uropod vollständig vom Deckglas zur IS wanderte („Uropod auf IS“, **i**) bzw. eine „stabile IS“ (s. **Abb. 32**) nach direktem (**i**) bzw. gestrecktem (**ii**) Kontakt ausbildeten. Uropod (**ii** weiß) und primäre (rot) bzw. sekundäre (dunkelrot) Mitochondrien-Akkumulationen sind mit Pfeilen markiert.



Film 7b

b iii Mittels manueller Nachverfolgung berechnete Abstände zur IS (orange) ab Kontakt mit Raji-Zellen über 50 Minuten von T-Zellmitte (schwarz), Uropod (grau), Zellkern (blau), zentrosomalen Mitochondrien (tiefrot), primären (rot) bzw. sekundären (dunkelrot) Mitochondrien-Akkumulationen und der maximalen Mitochondrien-Fluoreszenz (rote Striche) für „Uropod auf IS“ (n: 8, N: 3), direkten Kontakt mit „stabiler IS“, gestreckten Kontakt mit „stabiler IS“ und gestreckten Kontakt mit „unvollständiger IS“ (jeweils n: 9, N: 5).

Film 7b: dropbox.com/s/xbc8n5hyppg0w20v/Film7b.AVI?dl=0

Film 7c: dropbox.com/s/Ofkvsuxgutyl1su/Film7c.AVI?dl=0

Fehlerbalken stellen S.E.M. dar. **Maßstabsbalken: 5 µm**



Film 7c

Mitochondrien-Akkumulationen. Um die Mitochondrien-Dynamik und die Veränderung der zytosolischen Kalziumkonzentration in SEA-stimulierten CD8⁺ T-Zellen bei möglichst vielen CD8⁺-Raji-Kontakten über einen möglichst langen Zeitraum zu analysieren, wurden SEA-stimulierte CD8⁺ T-Zellen mit „MitoTracker red“ und „FURA-2“ gefärbt und auf Poly-L-Ornithin-beschichtete Deckgläser aufgebracht. Anschließend wurden die T-Zellen mit FURA-2-gefärbten und SEA-beladenen Raji B-Zellen in Kontakt gebracht. Einzelne Z-Ebenen wurden alle 5 Sekunden im Hellfeldkanal und den Fluoreszenzkanälen über einen Zeitraum von 60-300 Minuten mit einem 40x Objektiv und einer EMCCD-Kamera aufgenommen (**Abb. 33 b, Filme 7b und 7c**). Durch die Verwendung einer speziellen Lichtquelle (Sutter „DG-4“) konnten die Kalzium-gebundene Form (340 nm Anregung) und die Kalzium-ungebundene Form (380 nm Anregung) von FURA-2 separat aufgenommen werden.

In diesen Experimenten kam es wie zuvor (s. Abb. 32) zu ausgeprägten Zellformänderungen der T-Zellen nach Kontakt mit stimulierenden B-Zellen, deren Verlauf vom Abstand zwischen der Kontaktstelle mit dem Deckglas und der B-Zelle, der Beweglichkeit der B-Zelle, sowie der Fähigkeit der T-Zelle, sich vom Deckglas abzulösen, abhingen. Es wurden jeweils 9 Zellen, die während einem Zeitraum von 50 Minuten nach direktem (**b i**) bzw. gestrecktem (**b ii**) Kontakt eine „stabile IS“ ausbilden konnten, 9 Zellen mit „unvollständiger IS“, sowie 8 Zellen, die innerhalb von 50 Minuten nach Kontakt ihr Uropod vom Deckglas lösen konnten („Uropod auf IS“, **b i**), analysiert. Die Mittelpunkte von T-Zelle (schwarz), Uropod (grau), Zellkern (blau), zentrosomalen Mitochondrien (tiefrot, siehe **a**), primären (rot) und sekundären (dunkelrot) Mitochondrien-Akkumulationen, sowie die maximale Mitochondrien-Fluoreszenz (rote Striche) wurden über 50 Minuten ab B-Zell-Kontakt manuell nachverfolgt und die XY-Abstände zur IS berechnet (**b iii**). Wie in Abb. 32 kam es in allen Zellen mit Ausbildung einer „stabilen IS“ zur Annäherung des Uropods an

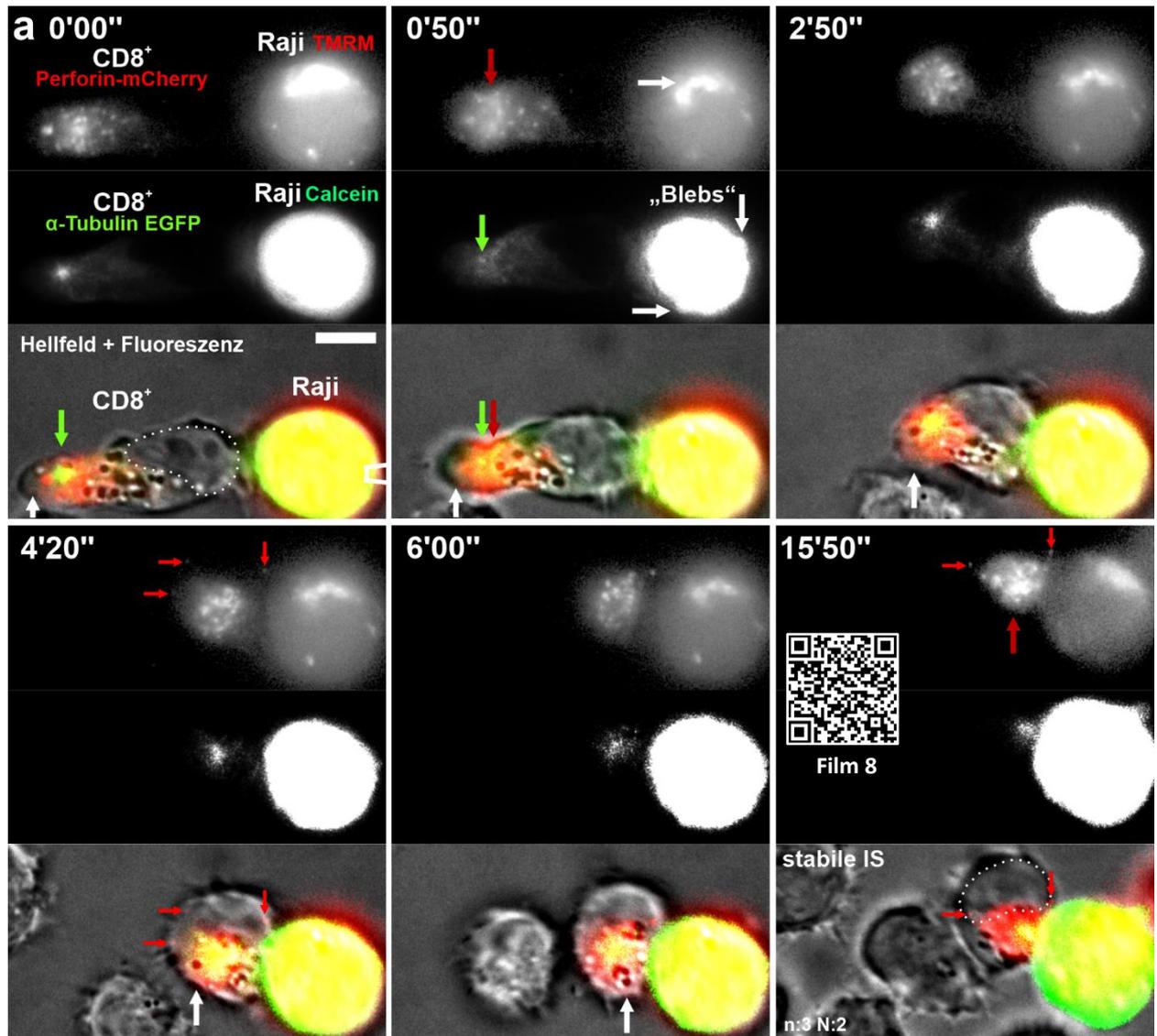
die IS. Der Zellkern bewegte sich in allen T-Zellen zunächst zur IS und anschließend von ihr weg. In allen T-Zellen, die eine stabile IS ausbildeten, erreichten zentrosomale Mitochondrien die IS innerhalb von 2-5 Minuten und verblieben dort mit einem Abstand zur IS von etwa 0,5-1,5 μm . Bei unvollständiger IS war diese Annäherung verzögert, mit größerem Endabstand zur IS von über 1,4 μm . Primäre Mitochondrien-Akkumulationen bewegten sich vor allem in Zellen, die ihr Uropod vom Deckglas lösen konnten, sehr nahe an die IS. Bei direktem Kontakt und bei unvollständiger IS war diese Bewegung im Vergleich mit zentrosomalen Mitochondrien verzögert. Sekundäre Mitochondrien-Akkumulationen assoziierten bei „gestreckten“ Zellen häufig mit dem Uropod und näherten sich bei Ausbildung einer stabilen IS bis zu etwa 3 μm (Uropod auf IS) bis 4 μm der IS an. Bei unvollständiger IS betrug der Abstand zwischen 8 und 10 μm . Die stärkste Mitochondrien-Fluoreszenz (MAX) konnte bei „Uropod auf IS“, aber auch zu späteren Zeitpunkten bei direktem und gestrecktem Kontakt, innerhalb der primären Akkumulation detektiert werden, während einer Zellstreckung wiederholt auch bei sekundären Akkumulationen.

Zusammenfassung. Bei allen untersuchten CD8⁺-Raji-Kontakten konnten in den T-Zellen über den gesamten Experimentverlauf Mitochondrien an der IS detektiert werden (s. **Abb. 33**). Mitochondrien-Akkumulationen näherten sich der IS verstärkt bei Ausbildung einer „stabilen IS“ an, während weitere Akkumulationen vor allem am Zellkern oder, bei in die Migrationsform „gestreckten“ T-Zellen, am Uropod verblieben (**b**). Einzelne Mitochondrien bewegten sich deutlich schneller als ihre Akkumulationen über weite Teile der T-Zellen, auch zum IS-Zentrum und zu den Rändern der IS (**a**).

3.2.1.3 T-Zellform-, Zytoskelett- und Organell-Dynamik bei Abtötung von B-Zellen

In diesem Unterkapitel werden 9 Experiment-Reihen mit 16 Zeitrafferaufnahmen einzelner SEA-stimulierter CD8⁺ T-Zellen auf Poly-L-Ornithin-beschichteten Deckgläsern im Kontakt mit einer oder mehreren SEA-beladenen Raji B-Zellen ausgewertet. Die Aufnahme einzelner Zellen ermöglichte eine hohe räumliche Auflösung bei Zeitabständen von 10-30 Sekunden und Mehrfach-Fluoreszenzfärbungen. Auch in diesen Experimenten waren die T-Zellen zumeist stark mit dem Deckglas verbunden.

Deckglas-Ablösung und Perforin-Vesikel. In zwei dieser Experimentreihen konnten durch die Anhaftung der B-Zellen an einer beweglichen Mikropipette 3 Kontakte mit T-Zellen eingeleitet werden, bei denen sich der Uropod der T-Zellen vom Deckglas löste (Beispiel in **Abb. 34**). Gleichzeitig mit der Bewegung des Zentrosoms zur IS bildeten diese Zellen innerhalb von etwa 4-8 min ihren Uropod zurück und nahmen die Zellform einer „stabilen IS“ ein (s. **Abb. 32**), mit dem Uropod an der IS (s. **Abb. 33 b**). Eine mit „ α -Tubulin-EGFP“ und „Perforin-mCherry“ transfizierte SEA-stimulierte CD8⁺ T-Zelle, die nach der Uropod-Ablösung die Zellform einer stabilen IS einnahm, ist in **Abb. 34 a** und **Film 8** gezeigt. Eine an einer Mikropipette befestigte Raji B-Zelle wurde zuvor zur Nekrose- und Apoptosedetektion mit „Calcein“ (Zytosol, grün) und „TMRM“ (mitochondriales Membranpotential, rot) gefärbt und mit SEA beladen. Durch manuelle Nachverfolgung wurden alle identifizierten Organell- und Membranobjekte getrackt. Diese Tracks sind in **Abb. 34 b i** als XY-Plot relativ zum Deckglas dargestellt. Die XY-Abstände über die Zeit zur IS (**b i** orange Rauten) bzw. für Vesikel zum Zentrosom sind in **Abb. 34 b ii** zusammengetragen.



b manuelles XY-Tracking

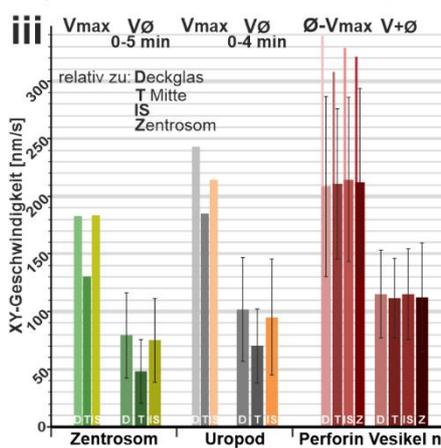
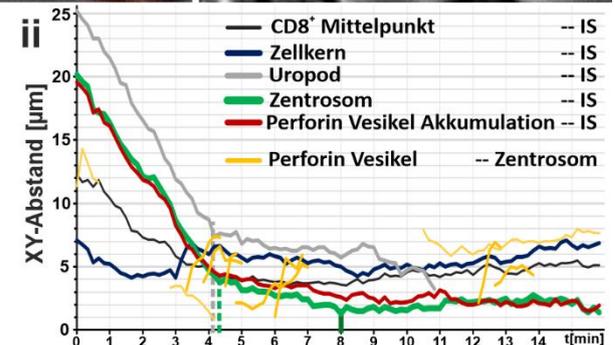
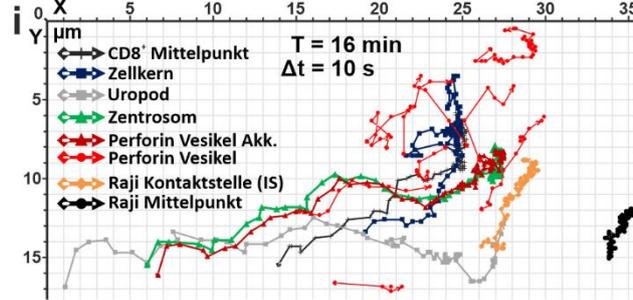


Abb. 34: T-Zellform-, Zentrosom- und Perforin-Dynamik bei Deckglas-Ablösung während CD8⁺-Raji Kontakt.

Einzel-Z-Ebenen-Aufnahme in Kulturmedium bei 37°C alle 10 Sekunden in Fluoreszenz und Hellfeld (a). Die Fluoreszenzkanäle sind einzeln und als Zusammenlegung aller Kanäle gezeigt. Die Fokusebene wurde zweimal angepasst. Eine an einer Mikropipette angeheftete SEA-beladene Raji B-Zelle ist mit Calcein (grün) und TMRM (rot) gefärbt. Eine α-Tubulin-EGFP- (grün, grüne Pfeile) und Perforin-mCherry- (rot, rote Pfeile) transfizierte SEA-stimulierte CD8⁺ T-Zelle kontaktiert die B-Zelle (Zellkern: weiße Punkte). Ein starker Abfall der TMRM-Fluoreszenz und Membran-„Blebs“ der B-Zelle sind durch weiße Pfeile gekennzeichnet (0'50''). Der „Uropod“ der T-Zelle ist mit weißen Pfeilen markiert. Die Mittelpunkte verschiedener Zellbestandteile wurden manuell in XY-Richtung nachverfolgt (b i) und damit Abstände über Zeit (ii) und Geschwindigkeiten (iii) berechnet. Die Maximal- (V_{max}) und Durchschnitts- (V_Ø) Geschwindigkeit bis zum Erreichen der IS für Zentrosom und Uropod, relativ zu Deckglas, T-Zellmitte und IS, sowie Ø-V_{max} mit Spitzenwerten und V_Ø bei Plus-End-Bewegung von 8 nachverfolgten Perforin-Vesikeln, zusätzlich relativ zum Zentrosom berechnet, sind graphisch dargestellt. Fehlerbalken sind Standardabweichung. Film 8: [dropbox.com/s/ldvkmjh89ztvid8/Film8.AVI?dl=0](https://www.dropbox.com/s/ldvkmjh89ztvid8/Film8.AVI?dl=0) Maßstabsbalken: 5 μm

Das Zentrosom der Beispiellelle (grüne Pfeile und Dreiecke) bewegte sich direkt nach dem Kontakt zur IS, mitsamt dem daran befestigten Mikrotubuli-Apparat und der intrazellulären Perforin-Vesikel-Akkumulation (dunkelrote Pfeile und Dreiecke). Nach etwas mehr als 4 Minuten verlangsamte sich die Annäherung des Zentrosoms an die IS bei einem Abstand von etwa 4 μm und nach 8 Minuten wurde mit 1 μm die größte Annäherung erreicht (**b ii** grüne Linie). Der Zellkern (**a** weiße Punkte, **b** blaue Rechtecke und Linie) berührte bei Kontaktbeginn die IS. Nach der Annahme der Zellform einer stabilen IS war der Zellkern von der IS entfernt und die Zellkern-Einbuchtung war zur IS ausgerichtet (**a** 15'50''). Während des gesamten Experimentverlaufs konnten Perforin-Vesikel in der gesamten Zelle in schneller, gerichteter Bewegung, sowohl zum Zentrosom hin als auch weg (Minus-End- bzw. Plus-End-Bewegung), nachgewiesen werden (**a**, **b i** rote Pfeile und Kreise, **b ii** gelbe Linien). Die Akkumulation von Perforin-Vesikeln verblieb mit dem Zentrosom an der IS (**b ii** dunkelrote Linie). Der Uropod der T-Zelle löste sich nach etwa 50 Sekunden vom Deckglas und bildete sich innerhalb von 4 Minuten zurück (**a** weiße Pfeile, **b** graue Rechtecke und Linien). Während der ersten Minute nach Kontakt konnten bei der Raji-Zelle sowohl apoptotische „Blebs“ als auch ein starker Einbruch des TMRM-Signals festgestellt werden (**a** Pfeile Raji). Für Zentrosom und Uropod wurde die Maximalgeschwindigkeit (V_{max}) und die Durchschnittsgeschwindigkeit ($V_{\text{Ø}}$) ab Kontaktzeitpunkt bis zum Erreichen der IS, relativ zu Deckglas, T-Zellmitte und IS, berechnet (Zentrosom: V_{max} 125-180 nm/s, $V_{\text{Ø}}$ 50-75 nm/s; Uropod: V_{max} 180-245 nm/s, $V_{\text{Ø}}$ 60-100 nm/s) (**Abb. 34 b iii**). Durch die Ablösung des Uropods wies dieser, wie das Zentrosom, die höchsten Werte bei der Berechnung relativ zum Deckglas auf. Die Ø - V_{max} von 8 verfolgten Perforin-Vesikeln und deren mittlere $V_{\text{Ø}}$ bei Plus-End-Bewegung wurden ebenfalls berechnet, zusätzlich relativ zum Zentrosom (Ø - V_{max} 205-210 nm/s, absolut 300-330 nm/s, $V_{+\text{Ø}}$ 105-110 nm/s).

Stabile und unvollständige IS. Aufgrund der starken Anhaftung an das Deckglas nahmen im Verlauf der Experimente dieses Unterkapitels nur die zuvor in **Abb. 34** gezeigten, sich vom Deckglas ablösenden T-Zellen und kugelförmige T-Zellen mit „direktem“ B-Zell-Kontakt die runde Zellform einer „stabilen IS“ (s. **Abb. 32**) an. Auf dem Deckglas „gestreckte“ oder abgeflachte T-Zellen (s. **Abb. 14**) bildeten kleinere Kontaktflächen mit den B-Zellen aus und veränderten ihre Zellform kaum. Als Beispiele sind eine γ -Tubulin-EGFP (weiß) exprimierende runde T-Zelle mit direktem Kontakt (**Abb. 35 a, Film 9a**) und eine γ -Tubulin-EGFP und Lifeact-mRFP_{ruby} (rot) exprimierende „gestreckte“ T-Zelle (**Abb. 35 b, Film 9b**) gezeigt. Zusätzlich wurden die Zellen wie in **Abb. 29** mit anti-CD3-Alexa⁶⁴⁷-Antikörpern inkubiert (grün). Zur besseren Visualisierung der Kontaktstelle wurden die B-Zellen mit „FURA-2“ gefärbt (blau). Die UV-Anregung des FURA-Farbstoffes ermöglichte die Visualisierung von Mitochondrien durch NADH-Autofluoreszenz (blau) (s. **Abb. 19, Schaefer et al. 2019**). Wie zuvor wurden manuelle XY-Tracks angefertigt und XY-Abstände bestimmt (**Abb. 35 ii**). Für **b** wurden XY-Geschwindigkeiten berechnet (**Abb. 35 b iii**) und die angelegten Tracks als XY-Plot relativ zum Deckglas dargestellt (**Abb. 35 b iv**).

Neben dem stärksten γ -Tubulin-EGFP-Signal am Zentrosom waren in der runden Beispiellelle mit direktem Kontakt (**Abb. 35 a**) noch zwei weitere punktförmige EGFP-Signale in der Zelle detektierbar (weiße Pfeile), eines davon am Uropod. Das Zentrosom (weiße bzw. schwarze Dreiecke) befand sich in

dieser T-Zelle innerhalb von zwei Minuten nach Kontaktbildung sehr nah (etwa 0,7 μm) und bewegungslos am Mittelpunkt der Kontaktfläche (IS, orange Rauten). In der auf dem Deckglas in die Migrationsform „gestreckten“ Beispielzelle (**Abb. 35 b**) erreichte das Zentrosom nach 8 Minuten die größte Annäherung zur IS mit etwas unter 2 μm . Die CD3-Färbung zeigte in allen Zellen, neben endozytierten Vesikeln, die am Zentrosom akkumulierten und mit diesem näher zur IS gebracht wurden (grüne Dreiecke), eine Akkumulation von Plasmamembran-lokalisiertem CD3 an der Kontaktstelle (CD3 IS, gelbe Rechtecke und Linien). Im ersten Beispiel (**a**) war eine zusätzliche membranständige CD3-Akkumulation am Uropod detektierbar (grüner Doppelpfeil, grüne Rechtecke), die nach 3 Minuten mit der membranständigen CD3-Akkumulation der IS zusammengebracht wurde (**a ii** grüne Kreise). Die „gestreckte“ Beispielzelle (**b**) wies eine zweite endoCD3-Vesikel-Akkumulation gegenüber dem Zellkern auf (dunkelgrüne Dreiecke und Linien). Der Zellkern (weiße Punkte) drehte sich bei allen T-Zellen mit direktem Kontakt mit der Zellkern-Einbuchtung zur IS, bei anhaltend „gestrecktem“ Kontakt, ohne Abrundung der T-Zelle, wurde diese Drehung nur teilweise durchgeführt. Die Entfernung des Zellkern-Mittelpunkts (blaue Rechtecke) nahm bei allen Zellen zunächst ab und dann zu (**ii** dunkelblaue Linien). Die NADH-Autofluoreszenz zeigte in allen T-Zellen mindestens eine Akkumulation von Mitochondrien am Zentrosom, in der „gestreckten“ Beispielzelle (**b**) waren zusätzlich zwei weitere Akkumulationen erkennbar, eine gegenüber dem Zellkern und eine weitere am Uropod, die dort verblieben (**b iv** blaue Pfeile und Kreuze). Die zentrosomalen Mitochondrien-Akkumulationen aller T-Zellen wurden zusammen mit dem Zentrosom bewegt (**ii** hellblaue Linien). Direkt nach Kontakt mit der B-Zelle am Front-Lamellopodium der „gestreckten“ Beispielzelle (**b**) breitete sich an der Kontaktstelle, von einer punktförmigen Aktin-Akkumulation ausgehend, ein „Aktin-Ring“ aus, durch den sich die T-Zelle zum Teil über die B-Zelle ausbreitete (**b i** roter Doppelpfeil, **b iv** rote Linien). Dieser Ring erreichte seine größte Ausdehnung nach etwa 2-3 Minuten (**b ii** rote Linie). Danach erschienen die Ränder des Aktin-Rings zunehmend unregelmäßig und es fand keine Kontraktion und Stabilisierung des Rings statt, wie es bei einer „stabilen IS“ zu beobachten war (s. Abb. 36, 38 a, 39). Knapp 10 Minuten nach Kontakt bildeten sich am Uropod der am Deckglas haftenden „gestreckten“ T-Zelle (**b**) Aktin-„Wellen“, die in Richtung IS wanderten (14'30'', roter Doppelpfeil). Der Uropod wurde zur Darstellung dieser Wellen vergrößert dargestellt (17'00''-18'30''). Die höchste detektierbare Aktin-Fluoreszenz befand sich zunächst am Uropod und ab Minute 1 am Aktin-Ring der IS (**b iv** hellrote Linie). Die im Beispiel von **Abb. 35 b** kontaktierte B-Zelle zeigte bereits 1 Minute nach Kontakt apoptotische „Blebs“, zum Zeitpunkt 19'30'' deutlich ausgeprägter (**b i** Hellfeld, weiße Pfeile).

Die auf Deckglas, T-Zellmitte, IS bzw. Zentrosom normierten XY-Geschwindigkeiten des Zentrosoms und 5 verfolgbare endoCD3-Vesikel der „gestreckten“ Beispielzelle (**b**) sind in **Abb. 36 b iii** graphisch dargestellt. Die Maximalgeschwindigkeit (V_{max}) des Zentrosoms betrug zwischen 85 nm/s und 108 nm/s, die Durchschnittsgeschwindigkeit ($V_{\text{Ø}}$) ab Kontakt bis IS-Nähe (0'-8') zwischen 20 nm/s und 30 nm/s. Die Beeinträchtigung der T-Zell-Formänderung führte zu einem Heranziehen der B-Zelle und somit zu den höchsten Zentrosom-Geschwindigkeiten bei der Berechnung relativ zur IS. Die $\text{Ø-}V_{\text{max}}$ der 5 nachverfolgten endoCD3-Vesikel betrug etwa 140 nm/s, mit Spitzenwerten zwischen 230 nm/s und 240 nm/s, ihre mittlere $V_{\text{Ø}}$ betrug aufgrund längerer Verweildauern zwischen 30 nm/s und 40 nm/s.

Ergebnisse

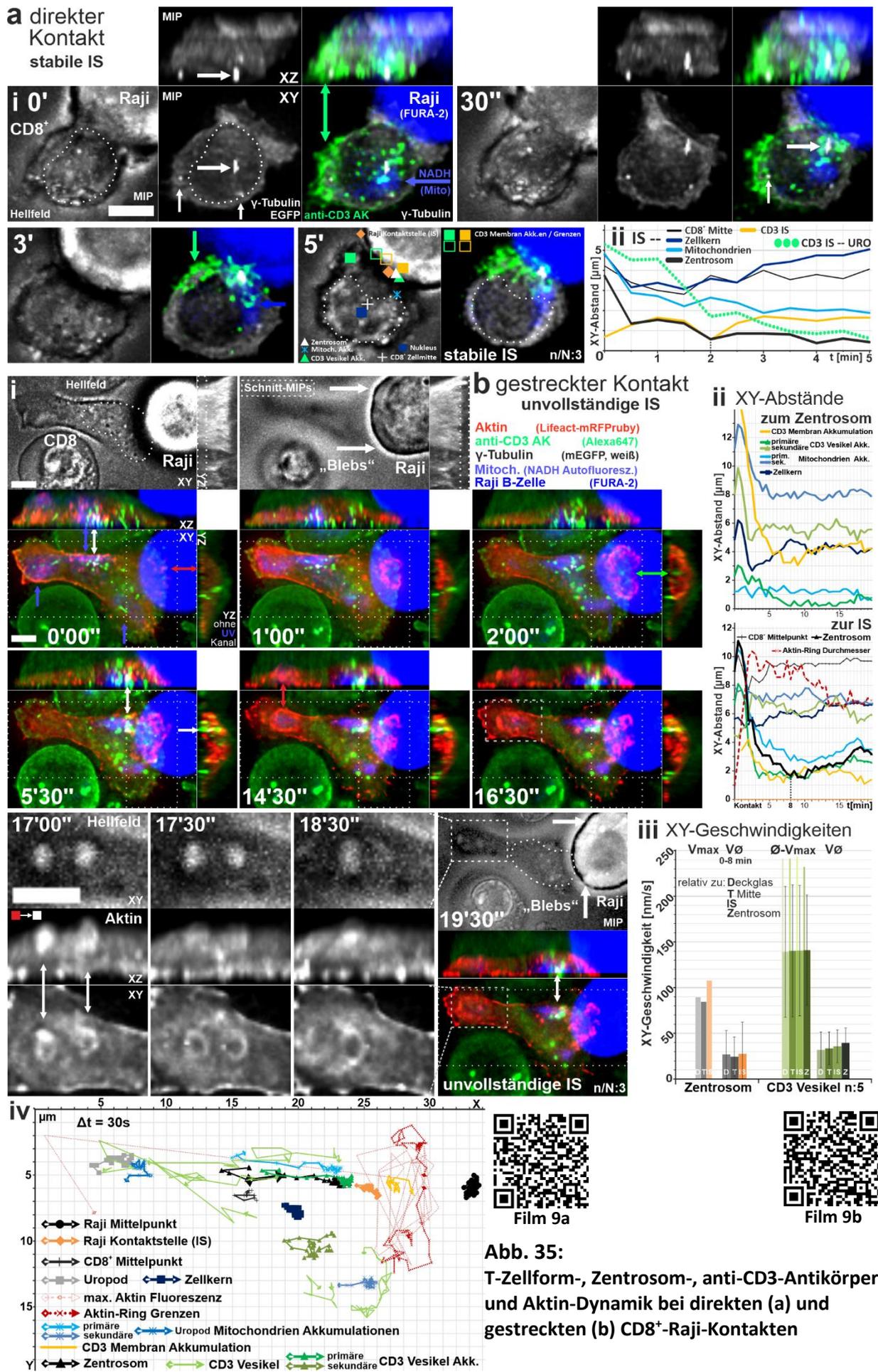


Abb. 35: T-Zellform-, Zentrosom-, anti-CD3-Antikörper- und Aktin-Dynamik bei direkten und gestreckten CD8⁺-Raji-Kontakten.

3D-Maximal-Intensitäts-Projektionen (MIP) und Schnitt-MIPs ausgewählter Zeitpunkte der Hellfeld- und Fluoreszenz-Z-Stapel-Aufnahmen (0,25 µm Z-Abstand) von mit anti-CD3-Alexa647-Antikörpern (grün) inkubierten und mit γ -Tubulin-EGFP (weiß) transfizierten SEA-stimulierten CD8⁺ T-Zellen im direkten (a) und gestreckten (b) Kontakt mit je einer FURA-2-gefärbten und SEA-beladenen Raji B-Zelle (blau) in Kulturmedium bei 37°C mit 30 Sekunden Zeitauflösung (i). Alle Fluoreszenzaufnahmen wurden iterativ dekonvoluiert. Mitochondriales NADH wurde durch die UV-Anregung detektierbar (blau). Die Zellkerne sind mit weißen Punkten hervorgehoben. **Maßstabsbalken: 5 µm**

a Direkter Kontakt - stabile IS i Drei punktförmige Signale im EGFP-Kanal sind durch weiße Pfeile markiert. Beispiel-Mittelpunkte bzw. -Grenzen aller identifizierten Zellbestandteile, die manuell in der XY-Richtung nachverfolgt (getrackt) wurden, sind im Hellfeld-Bild bei 5 Minuten gezeigt. Mit diesen Tracks berechnete XY-Abstände zur Kontaktstelle (IS, orange Raute) bzw. zwischen membranständigen CD3-Akkumulationen (grüne Punkte) sind in a ii dargestellt. **Film 9a:** dropbox.com/s/zp2xphaxlxdgvo/Film9a.AVI?dl=0

b Gestreckter Kontakt - unvollständige IS i Die Beispielzelle exprimierte zusätzlich Lifeact-mRFP (rot). Das Zentrosom ist mit weißen Pfeilen markiert. Der Ursprungspunkt des Aktin-Rings und spätere Aktin-Akkumulationen am Uropod sind mit roten Pfeilen markiert, membranständige CD3-Akkumulation an der Kontaktstelle mit grünen, durch UV-Anregung sichtbare Mitochondrien-Akkumulationen mit blauen und apoptotische Membran-„Blebs“ der Raji-Zelle im Hellfeld mit weißen. Der Uropod der T-Zelle ist zwischen Minute 17 und 19 im Hellfeld als XY-MIPs und in der Aktin-Fluoreszenz (weiß) als XZ- und XY-MIPs vergrößert dargestellt. Zwei sich vom Uropod in die Richtung der IS bewegendes Aktin-„Wellen“ sind durch weiße Doppelpfeile markiert. **Film 9b:** dropbox.com/s/q1oa0t62fcgn01/Film9b.AVI?dl=0

ii XY-Abstände zum Zentrosom bzw. zur IS und Durchmesser des Aktin-Rings über die Zeit. iii Die maximal berechnete XY-Geschwindigkeit (V_{max}) des Zentrosoms bzw. die Durchschnittsgeschwindigkeit (V_{\emptyset}) ab Kontakt bis zum Erreichen der IS (0-8 min) sowie \emptyset - V_{max} mit Spitzenwerten und mittlere V_{\emptyset} von 5 verfolgten endozytierten CD3 Vesikeln, relativ zu Deckglas, T-Zellmitte, IS und Zentrosom, sind in Nanometer pro Sekunde (nm/s) dargestellt. Fehlerbalken sind Standardabweichung. iv XY-Plot aller Tracks von b relativ zum Deckglas.

Mehrfachkontakte. In allen in dieser Arbeit durchgeführten Experimenten mit T-Zellen und SEA- bzw. SEE-beladenen Raji B-Zellen bildeten einzelne T-Zellen mehrere Kontakte mit den meisten B-Zellen aus, die von der T-Zelle gleichzeitig berührt werden konnten (n: 500+, N: 30+) (s. **Abb. 36, 39**). In **Abb. 36** und **Film 10** ist ein Beispiel von 6 wie in **Abb. 35 b** gefärbten SEA-stimulierten CD8⁺ T-Zellen gezeigt (N: 4), die mit zwei SEA-beladenen Raji B-Zellen gleichzeitig zwei Immunologische Synapsen (IS) ausbildeten. Wie zuvor durchgeführte manuelle XY-Nachverfolgungen (Tracks) aller detektierten Organell- und Membranstrukturen wurden in **Abb. 36 b i** als XY-Plot relativ zum Deckglas dargestellt. Ausgewählte XY-Abstände wurden graphisch über die Zeit visualisiert (**b ii**). Die relativ zu Deckglas, T-Zellmitte und IS 1 bzw. IS 2 berechneten Maximalgeschwindigkeiten (V_{max}) von Zentrosom, Uropod-„Dot“ und primärer CD3-IS-Akkumulation sind angegeben (**b iii**) (45-63 nm/s, 54-77 nm/s bzw. 46-85 nm/s).

Eine Minute nach dem ersten Kontakt am Front-Lamellopodium, mit dem Zellkern (weiße Punkte) an der ersten IS (orange Rauten), kam es zum gezeigten Zeitpunkt 0‘00“ am Uropod zum Kontakt mit einer zweiten B-Zelle. Die zweite B-Zelle wurde nach Kontakt (braune Rauten) zur ersten B-Zelle bewegt, sodass sich bei 2‘30“ beide B-Zellen berührten. Zum selben Zeitpunkt zeigte die zweite B-Zelle apoptotische „Blebs“. Die Zellkern-Einbuchtung war nach etwa 6 Minuten zur ersten IS ausgerichtet, der Zellkern-Mittelpunkt bewegte sich von den Kontaktstellen weg (dunkelblaue Rechtecke). Nach etwa 9 Minuten wurde die runde Zellform einer „stabilen IS“ erreicht. An beiden Kontaktstellen bildete die T-Zelle einen „Aktin-Ring“ aus, der sich im Verlauf des Experiments stabilisierte und kontrahierte (**a** rote Pfeile, **b** rote Linien). Das Zentrosom (**a** 0‘ weißer Pfeil, **b** schwarze Dreiecke und Linien) befand sich zum Zeitpunkt 0‘00“ zusammen mit Akkumulationen von endoCD3-Vesikeln (**a** grüner Pfeil, **b** grüne Dreiecke) und Mitochondrien (**b i** hellblaue Kreuze) nahe der ersten Kontaktstelle. Im gesamten Experimentverlauf verblieb das Zentrosom mit den Organell-Akkumulationen an dieser Position. Wie in **Abb. 35 a** konnte im EGFP-Kanal ein zweites punktförmiges Signal am Uropod detektiert werden (Uropod-„Dot“, weißer Doppelpfeil). In dem hier gezeigten Experiment war dasselbe punktförmige Signal auch im UV-Kanal vorhanden. Dieser „Dot“ bewegte sich zwischen 3‘30“ und 9‘00“ zur zweiten IS (**a** weiße Pfeile, **b i** blaue

und grüne Linien und Kreise). Eine sekundäre uropodiale Mitochondrien-Akkumulation (a blauer Doppelpfeil, b i blaue Kreuze) bewegte sich zunächst mit dem Uropod-„Dot“ (b blaue Linie) zur zweiten IS, verblieb jedoch am Rand der Kontaktstelle, zusammen mit einer membranständigen CD3-Färbung (a ockerfarbene Doppelpfeile), die sich der zweiten IS bis auf 1 µm annäherte (b sekundäre CD3 Membran-Akk. -- IS 2). Eine solche CD3-Akkumulation war zu Beginn auch an der ersten Kontaktstelle vorhanden (a goldene Pfeile). Zum Zeitpunkt 3'30'' bewegte sich diese erste IS-CD3-Akkumulation von der ersten Kontaktstelle ausgehend in den Raum zwischen beide B-Zellen, mit einem Abstand von 3-4 µm zu beiden Kontaktstellen (b primäre CD3 Membran-Akk. -- IS 1 & IS 2).

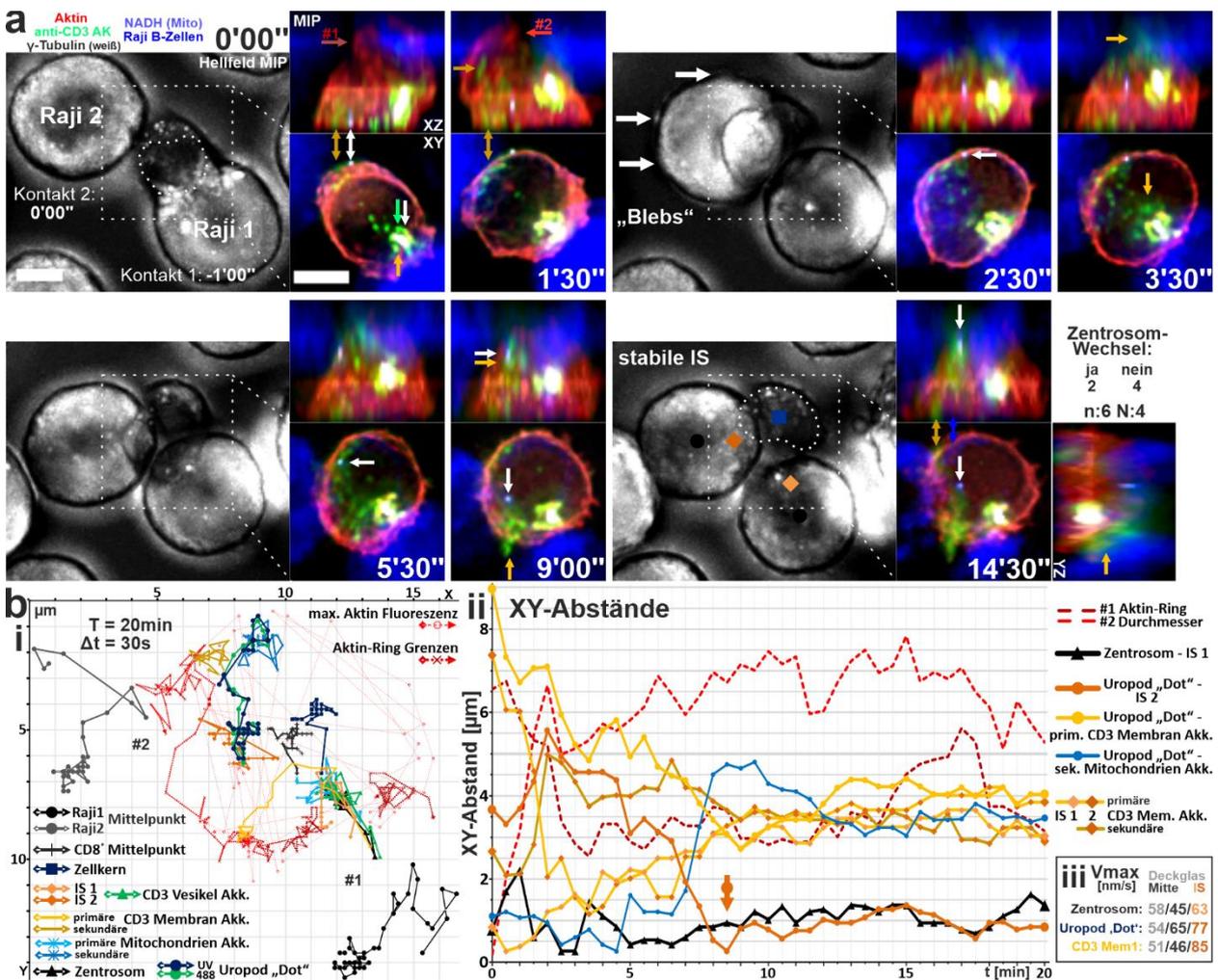


Abb. 36: Doppelkontakt mehrfach-gefärbter SEA-stimulierter CD8⁺ T-Zellen mit SEA-beladenen Raji B-Zellen.

a Hellfeld XY-Maximal-Intensitäts-Projektionen (MIP) und vergrößerte 3D-MIPs der Z-Stapel-Zeitrafferaufnahme (0,25 µm Z-Abstand, 30 s Zeitauflösung) einer mit Lifeact-mRFPPruby (Aktin, rot) und γ -Tubulin-EGFP (Zentrosom, weiß) transfizierten und mit anti-CD3-Alexa647-Antikörpern (grün) inkubierten SEA-stimulierten CD8⁺ T-Zelle im Kontakt mit zwei FURA-2-gefärbten und SEA-beladenen Raji B-Zellen (blau) in Kulturmedium bei 37°C. Durch die UV-Anregung wurden Mitochondrien-Akkumulationen in der T-Zelle sichtbar (NADH, blau). Alle Fluoreszenzkanäle wurden iterativ dekonvoluiert. Im Hellfeld sind der Zellkern mit weißen Punkten und apoptotische Membran-„Blebs“ der B-Zelle durch weiße Pfeile markiert. Beispiel-Mittelpunkte manueller XY-Tracks für B-Zellen (schwarze Kreise), Kontaktstellen (orange/ockerfarbene Rauten) und Zellkern (blaue Rechtecke) sind bei 14'30'' gezeigt. In der Fluoreszenz sind das Zentrosom (0' weißer Pfeil), beide Aktin-Ringe (rote Pfeile), zwei CD3-Akkumulationen (gelbe/ockerfarbene Pfeile) und ein in der UV- und EGFP-Anregung sichtbarer „Dot“ am Uropod der T-Zelle (weiße Pfeile) markiert. Insgesamt wurden 6 Zellen aus 4 Experimenten mit Doppelkontakt untersucht. Bei 2 dieser Zellen wurde das Zentrosom vom Erst- zum Zweitkontakt bewegt. **Film 10:** dropbox.com/s/q7pskm9vw6rvj1e/Film10.AVI?dl=0 **Maßstabsbalken: 5 µm**



Film 10

b XY-Plot manueller XY-Tracks aller identifizierten Organell- und Membran-Akkumulationen über den 20-minütigen Experimentverlauf von a relativ zum Deckglas (b i), mit einer Auswahl daraus berechneter XY-Abstände und dem jeweiligen Durchmesser beider Aktin-Ringe über die Zeit (b ii). Die Maximalgeschwindigkeiten (Vmax) von Zentrosom, Uropod-„Dot“ und primärer CD3-Membran-Akkumulation, relativ zu Deckglas, T-Zellmitte und IS, sind in Nanometer pro Sekunde (nm/s) aufgelistet (b iii).

Zentrosom und B-Zell Apoptose. Bei 10 Zellen mit Einzelkontakt und 6 Zellen mit gleichzeitigem Mehrfachkontakt wurde untersucht, ob und in welchem Zeitraum das Zentrosom zum ersten bzw. zweiten Kontakt wanderte (**Abb. 37 a**). Das Zentrosom bewegte sich bei 15 von 16 Erst- bzw. Einzelkontakten innerhalb von durchschnittlich 2 Minuten nach Kontakt zur ersten bzw. einzigen IS. Bei den 6 Zellen mit Mehrfachkontakten bewegte sich das Zentrosom nur in 2 Zellen von der ersten zur zweiten Kontaktstelle. In einem dieser Fälle war der zweite B-Zell-Kontakt direkt benachbart zum ersten mit einer Zentrosom-Wechselzeit von 30 Sekunden nach Zweitkontakt. Im zweiten dieser Fälle wurde die zweite B-Zelle durch den T-Zell-Uropod kontaktiert und das Zentrosom benötigte 1050 Sekunden nach dem Zweitkontakt, um die zweite IS zu erreichen. Von den kontaktierten B-Zellen wiesen alle 16 Primär- und alle 6 Sekundärkontakte apoptotische „Blebs“ auf, die Primärkontakte nach durchschnittlich 2 Minuten und 20 Sekunden, die Sekundärkontakte nach durchschnittlich 3 Minuten und 10 Sekunden. Die Hälfte der Primärkontakte und alle Sekundärkontakte zeigten „Blebs“, bevor das Zentrosom die jeweilige IS erreichte.

Geschwindigkeiten. Wie in den vorherigen Beispielen von Einzelzell-Experimenten gezeigt, wurden in all diesen Experimenten manuelle XY-Nachverfolgungen (Tracks) für das Zentrosom und einzelne verfolgbare Vesikel angelegt und deren Geschwindigkeiten berechnet (**Abb. 37 b**). Das XY-Tracking von Vesikeln wurde in diesen Experimenten erheblich durch die nicht dafür optimierte Bildaufnahme, das Bleichen des Farbstoffes und die für Vesikel-Geschwindigkeiten relativ niedrige zeitliche Auflösung von 10 bzw. 30 Sekunden erschwert. Daher konnten nur vergleichsweise langsame Vesikel für kurze Zeiträume getrackt werden. Die so erhaltenen Werte können demnach nicht direkt mit den Werten aus **Abbildung 30** verglichen werden und zeigen nur „Stichproben“-Werte für mögliche Vesikel-Geschwindigkeiten.

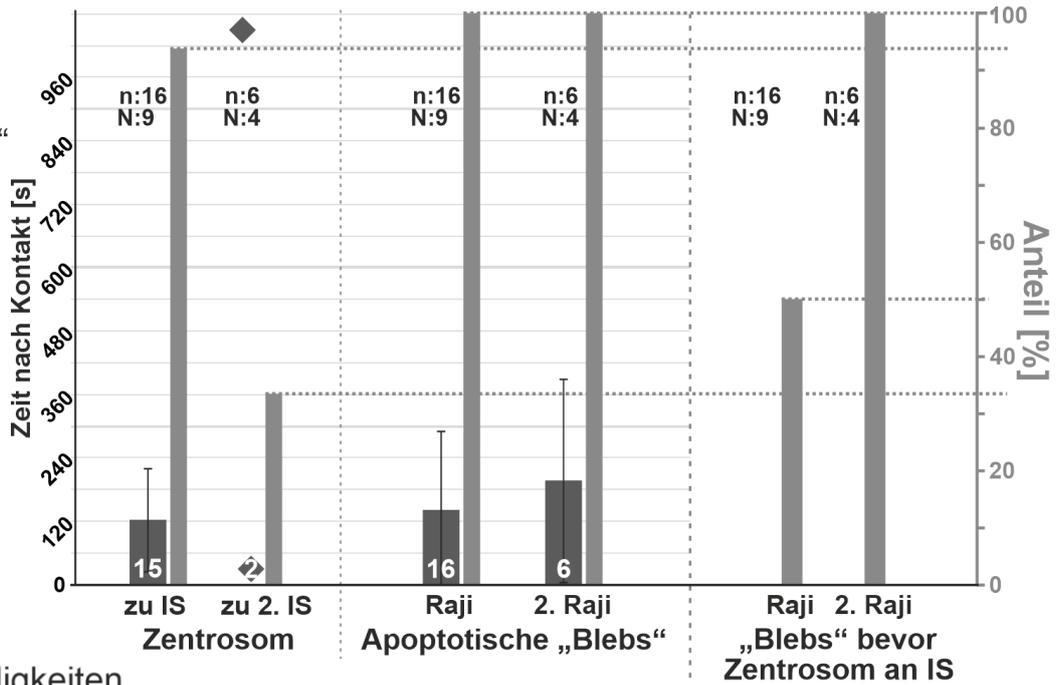
Die durchschnittliche Maximalgeschwindigkeit (V_{max}) betrug für verfolgbare Perforin-Vesikel zwischen 236 nm/s und 243 nm/s, mit Spitzenwerten von 432-459 nm/s, für verfolgbare endoCD3-Vesikel etwa 113 nm/s, mit Spitzenwerten von 257-263 nm/s (**b i**). Ebenso wurden für die Zentrosome von 13 T-Zellen die V_{max} mit Spitzenwerten, sowie für 10 T-Zellen die mittlere Durchschnittsgeschwindigkeit (V_{\emptyset}) des Zentrosoms nach Kontakt bis zum Erreichen der ersten IS, jeweils relativ zu Deckglas, T-Zellmitte und IS, berechnet (**b ii**). Die V_{max} der Zentrosome betrug zwischen 94 nm/s und 110 nm/s, mit Spitzenwerten zwischen 171 nm/s und 184 nm/s. Die V_{\emptyset} der Zentrosome ab erstem Kontakt bis zum Erreichen der ersten IS betrug zwischen 40 nm/s und 62 nm/s. Die Vesikel zeigten die höchsten Werte bei der Berechnung relativ zum Zentrosom. Die Zentrosome zeigten aufgrund von Zellformänderungen die niedrigsten Werte bei der Berechnung relativ zur T-Zellmitte.

Zusammenfassung. Bei einer Ablösung vom Deckglas bildeten T-Zellen ihren „Uropod“ gleichzeitig mit der Bewegung des Zentrosoms zur IS innerhalb weniger Minuten zurück (**Abb. 34**). Bei starker Beeinträchtigung der Zellformänderung, der Uropod-Rückbildung und der IS-Ausbildung bewegte sich das Zentrosom trotzdem in den meisten Fällen in die Nähe der IS (**Abb. 35 b**). Mit dem Uropod assoziierte Signale wurden nur bei der Bildung einer „stabilen IS“ zur IS bewegt (**Abb. 35 a**). Bei Mehrfachkontakten wurden typische IS-Strukturen, wie Aktin-Ringe und Membran-CD3, mehrfach ausgebildet und durch

Ergebnisse

a
Zentrosom
und
B-Zell „Blebs“

10 Einzel- &
6 Mehrfach-
Kontakte



b Geschwindigkeiten

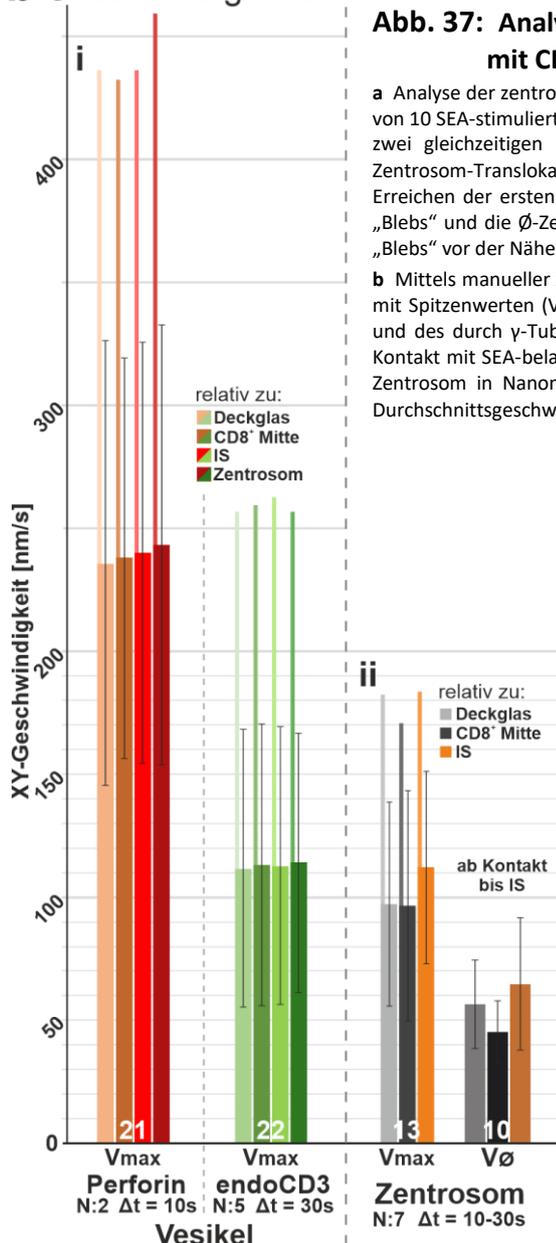


Abb. 37: Analyse aller durchgeführten Einzelzell-Experimente mit CD8⁺-Raji Kontakten.

a Analyse der zentrosomalen Translokation bei Erst- bzw. Zweitkontakt zu den Kontaktstellen (IS) von 10 SEA-stimulierten CD8⁺ T-Zellen mit einem Kontakt und 6 SEA-stimulierten CD8⁺ T-Zellen mit zwei gleichzeitigen Kontakten mit SEA-beladenen Raji B-Zellen. Der Anteil an T-Zellen mit Zentrosom-Translokation von der ersten zur zweiten IS und die ϕ -Zeiten nach Kontakt bis zum Erreichen der ersten bzw. zweiten IS, der Anteil an kontaktierten Raji-Zellen mit apoptotischen „Blebs“ und die ϕ -Zeit nach Kontakt bis zu deren Auftreten, sowie der Anteil an Raji-Zellen, die „Blebs“ vor der Nähe des Zentrosoms zu der jeweiligen IS aufwiesen, sind im Graph dargestellt

b Mittels manueller XY-Nachverfolgung berechnete durchschnittliche Maximalgeschwindigkeiten mit Spitzenwerten (V_{max}) verfolgbarer Perforin-mCherry- (rot) bzw. endoCD3- (grün) Vesikel (i) und des durch γ -Tubulin-EGFP markierten Zentrosoms (ii) in SEA-stimulierten CD8⁺ T-Zellen im Kontakt mit SEA-beladenen Raji B-Zellen, relativ zu Deckglas, T-Zellmitte, IS und (nur für Vesikel) Zentrosom in Nanometer pro Sekunde (nm/s). Zusätzlich wurde für 10 Kontakte die mittlere Durchschnittsgeschwindigkeit (V_Ø) des Zentrosoms ab Kontakt bis zur ersten IS berechnet.

Fehlerbalken sind Standardabweichung.

Zellformänderungen vereint (Abb. 36). Die Hälfte aller zuerst kontaktierten B-Zellen zeigten apoptotische „Blebs“, bevor das Zentrosom die IS erreichte. Alle weiteren gleichzeitig von derselben T-Zelle kontaktierten B-Zellen zeigten „Blebs“, bevor sich das Zentrosom in der Nähe der entsprechenden IS befand (Abb. 37 a). Einzelne Vesikel bewegten sich während des gesamten Kontakts mit vergleichsweise hoher Geschwindigkeit durch die gesamte Zelle, auch vom Zentrosom und der IS weg (Abb. 34, 35 b). In diesen Experimenten nachverfolgbare Perforin-Vesikel wiesen mehr als doppelt so hohe Geschwindigkeiten wie Zentrosome auf (Abb. 37 b), aber deutlich niedrigere Geschwindigkeiten als in Experimenten, die für die alleinige Aufnahme von Vesikeln optimiert wurden (s. Abb. 30).

3.2.2 IS-Ausbildung durch Jurkat CD4⁺ T-Zellen

Die im Vergleich zu Primärzellen relativ hohe Transfektionseffizienz der CD4⁺ T-Helfer Zelllinie Jurkat ermöglichte die Transfektion von „Orai1-mEGFP“ mit weiteren Plasmiden wie „Lifeact-mRFPruby“ oder „STIM1-TagRFP-T“ und somit die Untersuchung der Dynamik des primären T-Zell-Kalziumkanals bei Ausbildung einer Immunologischen Synapse (IS). Jurkat T-Zellen exprimieren einen T-Zell-Rezeptor-Subtyp, der durch Staphylococcus Enterotoxin E (SEE) gebunden werden kann (*Hudson, Robinson und Fraser 1993; Quintana et al. 2011*). Daher konnten mit SEE beladene Raji B-Zellen als Zielzellen genutzt werden. Wie die SEA-stimulierten CD8⁺ T-Zellen in Kapitel 3.2.1 verblieben die Jurkat-Zellen auf Poly-L-Ornithin-beschichteten Deckgläsern an mindestens einer Stelle stark mit dem Deckglas verbunden und wie zuvor kontaktierten häufig mehrere T-Zellen dieselbe B-Zelle. Dadurch kam es auch hier zu einem Anteil von T-Zellen, die ihren Uropod und die IS nicht zusammenführen konnten und nicht die Zellform einer „stabilen IS“ (s. Abb. 32 i) erreichten. Die „gestreckte“ Zellform (s. Abb. 32 ii, iii) zeigten die Jurkat-Zellen fast ausschließlich, falls die T- und B-Zellen nach dem Kontakt auseinandergezogen wurden.

3.2.2.1 T-Zellform-, Aktin-, Organell- und Orai1-Dynamik

Jurkat CD4⁺ T-Zellen wurden mit „Lifeact-mRFPruby“ (rot) und „Orai1-mEGFP“ (grün) transfiziert, mit anti-CD3-Alexa⁶⁴⁷-Antikörpern (magenta) inkubiert und in Kontakt mit „FURA-2“-gefärbten (blau) und SEE-beladenen Raji B-Zellen gebracht. Mitochondrien-Akkumulationen konnten durch die UV-Anregung von NADH detektiert werden (s. 3.2.1.2). Die Transfektion von Orai1-mEGFP ermöglichte, neben der Visualisierung von membranständigen Akkumulationen des Orai1, auch die Lokalisation des Zentrosoms, da in den meisten transfizierten Jurkat-Zellen der Golgi-Apparat durch das überexprimierte Orai1-mEGFP visualisiert wurde und sich dieser in T-Zellen direkt am Zentrosom befindet (*Kupfer, Dennert und Singer 1985; Kupfer et al. 1986; Stinchcombe et al. 2015*).

Direkter und gestreckter Kontakt. Gezeigt sind Beispielzellen für direkten Kontakt mit Ausbildung einer „stabilen IS“ (**Abb. 38 a, Film 11a**), sowie „Streckung“ während des Kontakts und unvollständiger IS (**Abb. 38 b, Film 11b**) mit XY-Plots manueller XY-Nachverfolgungen („Tracks“) dieser Zellen, normiert auf die IS. Mit diesen Tracks berechnete XY-Abstände zur IS über die Zeit sind in **Abb. 38 c** dargestellt.

Die Zellkern-Einbuchtung (s. Abb. 19) wurde von beiden Beispielzellen im Verlauf der Experimente durch Drehung des Zellkerns (weiße Punkte) zur IS orientiert. Der Zellkern-Mittelpunkt (dunkelblaue Rechtecke und Linien) wurde zunächst näher zur IS gebracht und danach davon entfernt. Bei Ausbildung einer „stabilen IS“ (**Abb. 38 a**) befanden sich alle anderen Zellorganellen an der IS, der Zellkern füllte den Rest der Zelle aus. Alle Zellen mit Lifeact-mRFPruby-Expression zeigten nach Kontakt einen sich mit den Membrangrenzen der Kontaktstelle (orange Raute) ausbreitenden „Aktin-Ring“ (rote Pfeile und Linien), der sich im Beispiel mit stabiler IS (**a**) nach 5 Minuten auf fast 10 µm Durchmesser vergrößerte und ab Minute 6 auf etwa 3 µm Durchmesser kontrahierte. Im Beispiel mit unvollständiger IS-Bildung (**b**) betrug der maximale Durchmesser nach 12 Minuten 11 µm, schwankte bis Minute 41 zwischen 8 und 10 µm und erreichte in den letzten Minuten der Aufnahme einen konstanten Durchmesser von 7 µm (**c** rote Linien).

Ergebnisse

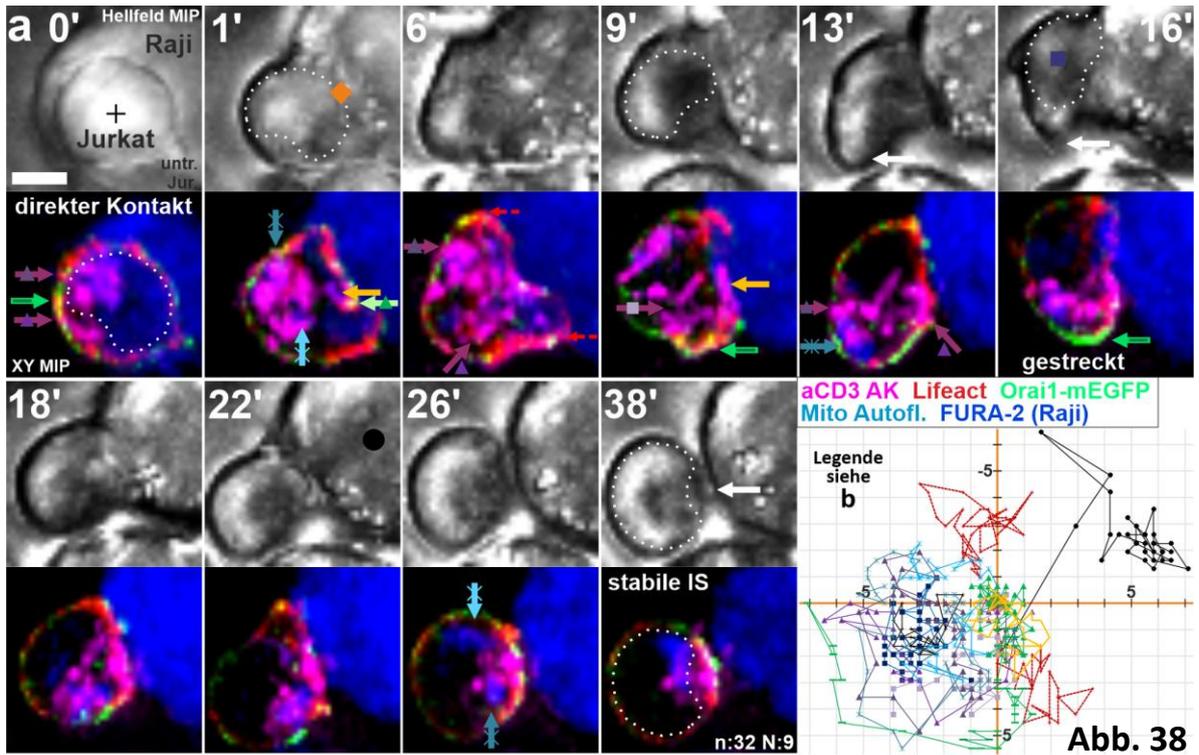


Abb. 38

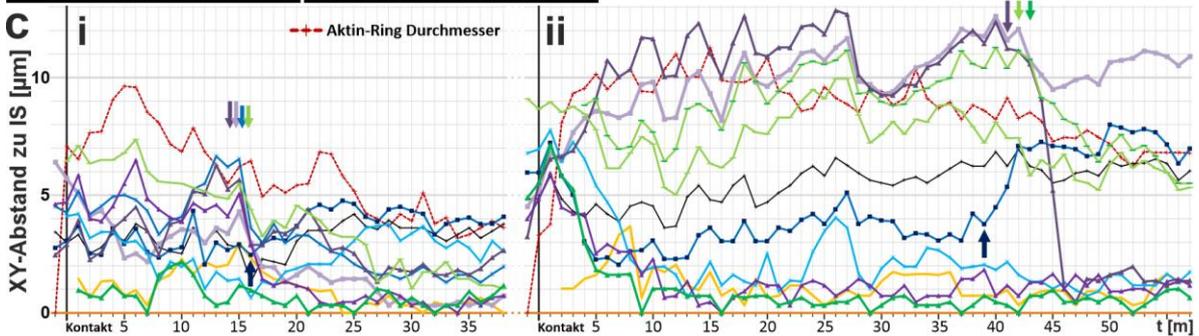
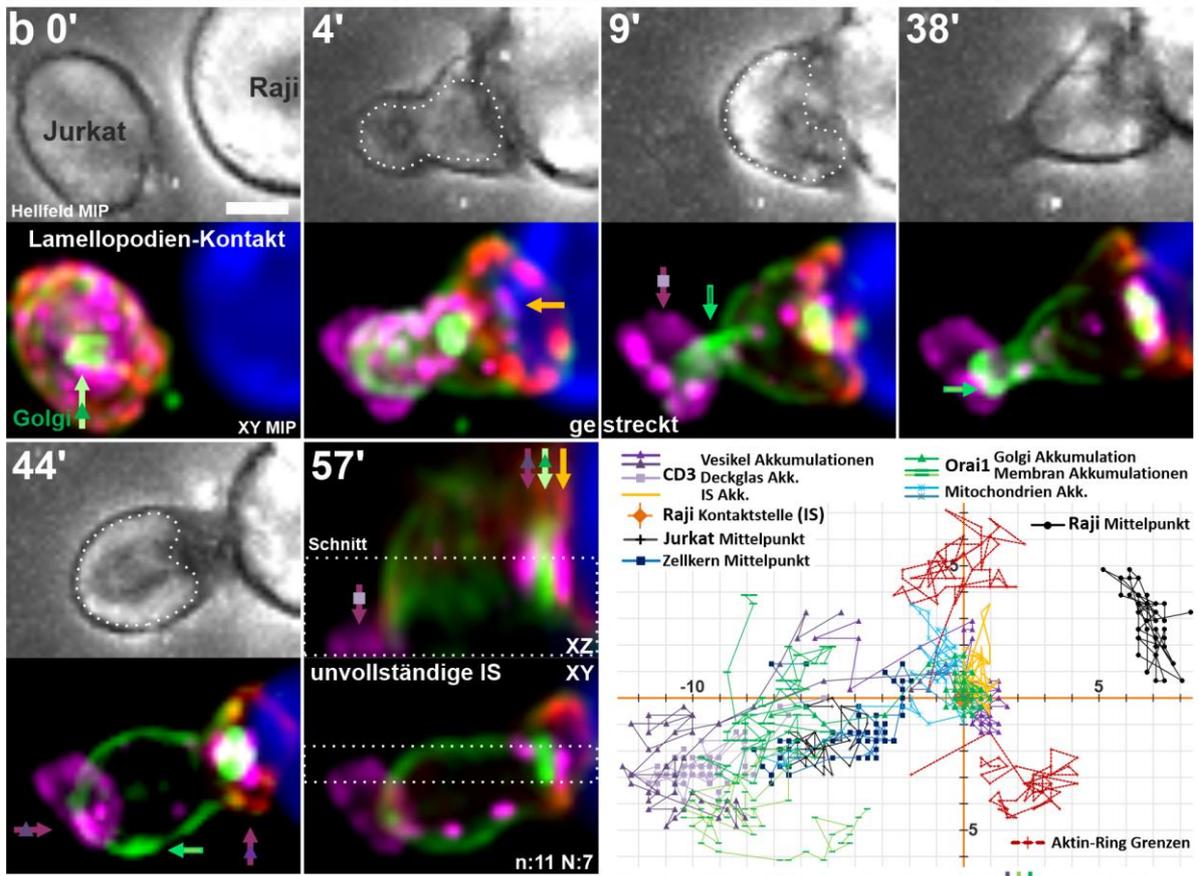


Abb. 38: T-Zellform-, Aktin-, CD3-, Orai1- und Mitochondrien-Dynamik von Jurkat CD4⁺ T-Zellen im direkten und gestreckten Kontakt mit SEE-beladenen Raji B-Zellen.

XY-Maximal-Intensitäts-Projektionen (MIP) der Hellfeld- und Fluoreszenz-Z-Stapel-Zeitrafferaufnahmen (0,5 µm Z-Abstand, 60 s Zeitauflösung) von mit Lifeact-mRFP_{pruby} (Aktin, rot) und Orai1-mEGFP (grün) transfizierten und mit anti-CD3-Alexa647-Antikörpern (magenta) inkubierten Jurkat CD4⁺ T-Zellen im direkten (**a**) bzw. gestreckten (**b**) Kontakt mit FURA-2-gefärbten und SEE-beladenen Raji B-Zellen (blau) in Kulturmedium bei 37°C. Die Fluoreszenzaufnahmen wurden iterativ dekonvoluiert. Durch die UV-Anregung wurden Mitochondrien-Akkumulationen sichtbar (NADH, blau). Zeitpunkt 57' von **b** ist als XY- und XZ-Schnitt-MIPs der Fluoreszenz gezeigt. In **a** ist eine stark im CD3-Kanal überstrahlende T-Zelle ausgeblendet. CD3- (magenta), Orai1- (grün) und Mitochondrien-Akkumulationen (blau) sind mit Pfeilen markiert. Der Zellkern ist mit weißen Punkten hervorgehoben. Beispiele für Mittelpunkte verschiedener Zellbestandteile (siehe **b** XY-Plot) und der Kontaktstelle (IS, orange Raute) sind in den Hellfeld-MIPs angezeigt und deren manuelle XY-Tracks relativ zur IS graphisch dargestellt.

c XY-Abstände zur IS und Aktin-Ring-Durchmesser von direktem (**i**) und gestrecktem (**ii**) Beispielkontakt über die Zeit. Farblegende: siehe **b** XY-Plot. Der Beginn der Bewegung von mit dem Uropod assoziierten Zellbestandteilen in die Richtung der IS (orange) während der Entfernung des Zellkerns von der IS (blau) sind mit Pfeilen (Legende: s. **b** XY-Plot) angezeigt.

Film 11a: dropbox.com/s/mn8hppcm27pe0p6/Film11a.AVI?dl=0
 Film 11b: dropbox.com/s/forrrbqa39nir1k/Film11b.AVI?dl=0

Maßstabsbalken: 5 µm



Film 11a



Film 11b

Die Orai1-mEGFP-Expression zeigte membranständige Akkumulationen (grüne Pfeile und Linien) und intrazelluläre Golgi-Signale (grüne Pfeile und Dreiecke). Im Beispiel mit direktem Kontakt (**Abb. 38 a**) befand sich ein schwaches Golgi-Signal im gesamten Experimentverlauf nahe der IS (0-2 µm). Im Beispiel mit „gestrecktem“ Kontakt (**Abb. 38 b**) bewegte sich ein starkes Golgi-Signal innerhalb von 5 Minuten zur IS und erreichte nach 9 Minuten die größte Annäherung. Alle Zellen mit membranständigen Orai1-Akkumulationen zeigten diese zuerst am Uropod (**a, b**) und bei Erreichen der Zellform einer stabilen IS an der Kontaktstelle (**a, c i**). Bei unvollständiger IS verblieben diese Akkumulationen am Uropod, bis der Zellkern zum Uropod bewegt wurde (**b, c ii**). Innerhalb der ersten Minuten nach Kontakt trat bei allen Zellen eine membranständige CD3-Akkumulation an der Kontaktstelle auf (gelbe Pfeile und Linien). In der Schnitt-MIP von **Abb. 38 b** (57') zeigte sich das CD3-IS-Signal abgegrenzt vom Orai1-Golgi-Signal. Zusätzlich konnte bei einigen Zellen eine membranständige CD3-Akkumulation an der Kontaktfläche mit dem Deckglas, die in „gestreckten“ Zellen den Uropod darstellte, festgestellt werden (violette Pfeile und Rechtecke). Bei Erreichen der stabilen IS-Zellform befand sich die Deckglas-Kontaktfläche (Uropod) nahe an der IS (**a, c i**). Mindestens eine Akkumulation von endozytierten CD3-Vesikeln (endoCD3, violette Pfeile und Dreiecke) konnte in allen Zellen detektiert werden, bei Zellen mit Orai1-Golgi-Signal zumeist in dessen Nähe. In Zellen mit weiteren endoCD3-Akkumulationen verblieben diese zunächst am Uropod und wurden erst im Verlauf der Zellformänderung am Zellkern vorbei zur IS transportiert. Ebenso konnte in allen Zellen mindestens eine Mitochondrien-Akkumulation detektiert werden, die sich ähnlich wie die endoCD3-Akkumulationen verhielten (blaue Pfeile und Kreuze). Im Beispiel von **a** bewegte sich eine primäre Mitochondrien-Akkumulation bis Minute 8 zur IS. Eine sekundäre Mitochondrien-Akkumulation am Uropod bewegte sich ab Minute 16 mit einer sekundären endoCD3-Akkumulation und der Orai1-Membran-Akkumulation am Zellkern vorbei zur IS (**c i**). Die einzige detektierte Mitochondrien-Akkumulation im Beispiel von **b** bewegte sich mit dem Golgi zur IS und verblieb dort (**c ii**).

Mehrfachkontakte. Bei Kontakten mit mehreren B-Zellen verhielten sich die Jurkat CD4⁺ T-Zellen wie die zuvor untersuchten SEA-stimulierten CD8⁺ T-Zellen (s. Abb. 36) und bildeten gleichzeitig mehrere Immunologische Synapsen mit den meisten kontaktierten B-Zellen aus (n: 300+, N: 20+). In den Experimenten mit Lifeact-mRFP_{pruby}- und Orai1-mEGFP-transfizierten und anti-CD3-Alexa⁶⁴⁷-Antikörper-inkubierten Jurkat-Zellen (s. Abb. 38) konnten 16 Mehrfachkontakte ausgewertet werden.

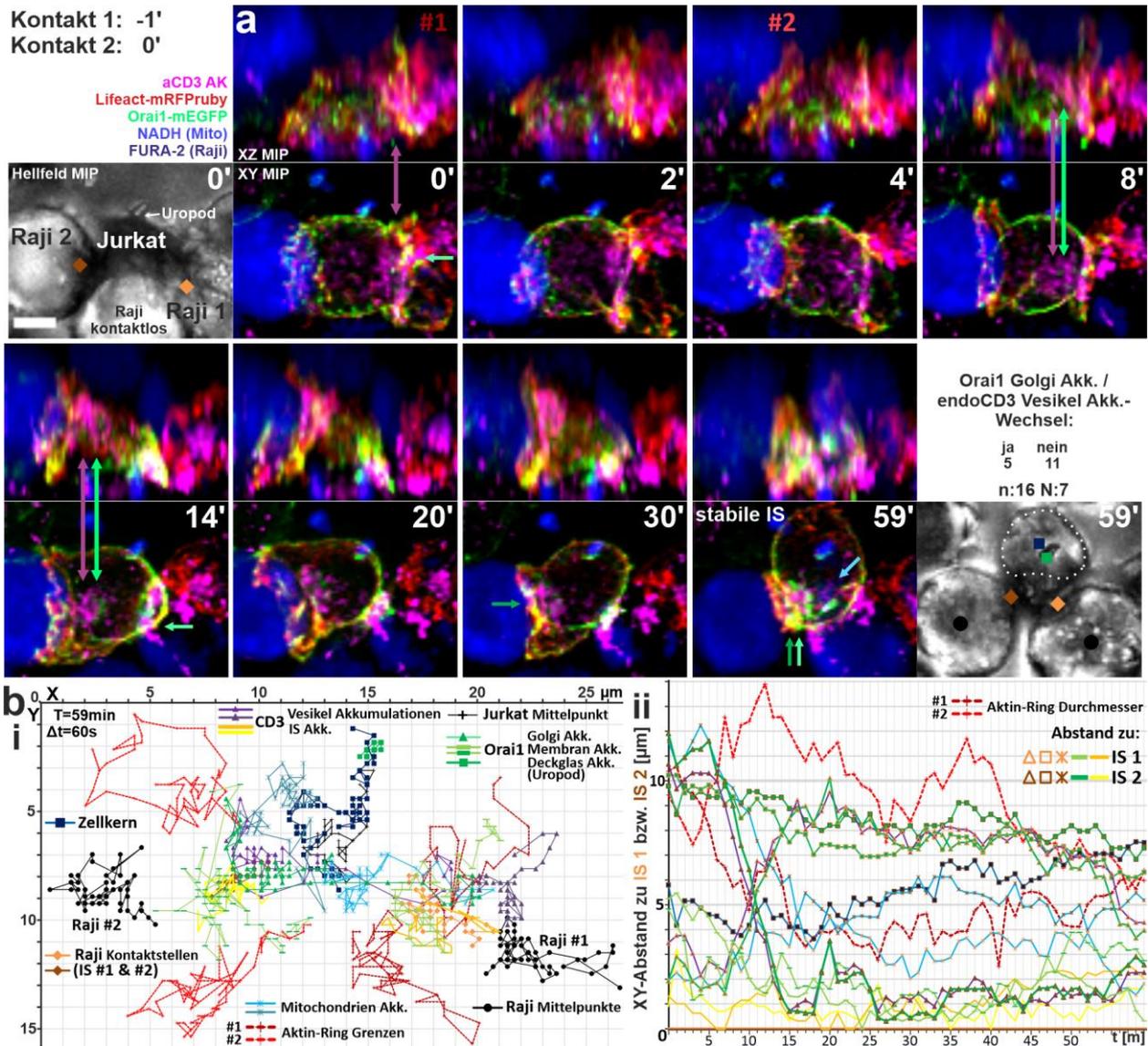


Abb. 39: Doppelkontakt mehrfach-gefärbter Jurkat CD4⁺ T-Zellen mit SEE-beladenen Raji B-Zellen.

a Doppelkontakt zwischen einer mit Lifeact-mRFPPruby (Aktin, rot) und Orai1-mEGFP (grün) transfizierten und mit anti-CD3-Alexa647-Antikörpern (magenta) inkubierten Jurkat CD4⁺ T-Zelle und zwei FURA-2-gefärbten und SEE-beladenen Raji B-Zellen (blau) in Kulturmedium bei 37°C. Hellfeld- und Fluoreszenz-Z-Stapel (0,5 µm Z-Abstand) wurden alle 60 s aufgenommen und die Fluoreszenzaufnahmen iterativ dekonvolviert. Durch die UV-Anregung wurden Mitochondrien-Akkumulationen sichtbar (NADH, blau). Angezeigt sind die XY- und XZ-Maximal-Intensitäts-Projektionen (MIP) ausgewählter Zeitpunkte. CD3- (magenta), Orai1- (grün) und Mitochondrien- (blau) Akkumulationen sind mit Pfeilen markiert. Der Zellkern ist mit weißen Punkten hervorgehoben. Insgesamt wurden 16 Zellen aus 7 Experimenten mit Doppelkontakt untersucht. Bei 5 dieser Zellen bewegten sich die primäre endoCD3-Vesikel- und die Orai1-Golgi-Akkumulation vom Erst- zum Zweitkontakt.

Film 12: [dropbox.com/s/gb3t7tb2iso2i3c/Film12.AVI?dl=0](https://www.dropbox.com/s/gb3t7tb2iso2i3c/Film12.AVI?dl=0)

Maßstabsbalken: 5 µm

b Manuelles XY-Tracking aller identifizierten Objekte und Akkumulationen über den Experimentverlauf von a (b i) und daraus berechnete XY-Abstände zu IS 1 (orange umrahmt) bzw. IS 2 (braun umrahmt) (b ii). Beispiel-Mittelpunkte sind in a in der Hellfeld-MIP bei 59' gezeigt.

Wie im Beispiel der CD8⁺ T-Zelle aus Abb. 36 bildete die Jurkat-Beispielzelle (Abb. 39, Film 12) zwei stabile Kontakte mit FURA-2-gefärbten und SEE-beladenen Raji B-Zellen aus. Wie zuvor wurden manuelle XY-Tracks aller identifizierten Zellbestandteile angefertigt und in Abb. 39 b i als XY-Plot relativ zum Deckglas dargestellt, ausgewählte XY-Abstände zu IS 1 bzw. IS 2 graphisch über die Zeit (b ii).

Im Gegensatz zum Beispiel in Abb. 36 wechselte die Beispielzelle in Abb. 39 ihre Orientierung von der ersten (orange Rauten) zur zweiten (braune Rauten) Kontaktstelle, während das Orai1-Golgi-Signal (grüne Doppelpfeile und Dreiecke) und eine endoCD3-Vesikel-Akkumulation (violette Pfeile und Dreiecke) von der ersten zur zweiten Kontaktstelle wanderten (a 8'-14', b orange bzw. braune Rahmen). Diese Relokalisation der primären intrazellulären Akkumulationen zur zweiten IS geschah in 5 von 16

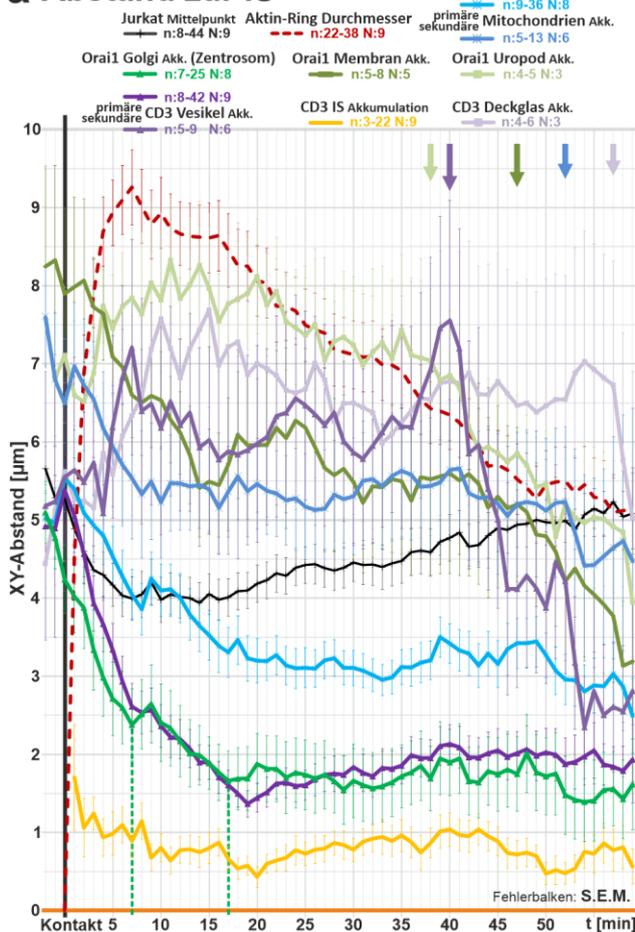
untersuchten Jurkat-Raji-Mehrfachkontakten. Die Beispielzelle breitete sich zunächst durch die Ausbildung eines ersten Aktin-Rings (#1) über die Membran der zuerst kontaktierten B-Zelle aus (**Abb. 39 a** 0'-2', **b** rote Linien), um sich danach durch die Ausbildung eines größeren Aktin-Rings (#2) über längere Zeit ebenso über die zweite B-Zelle auszubreiten (**a** 4'-20', **b** dunkelrote Linien). Während der erste Aktin-Ring zwischen Minute 4 und 14 verkleinert und stabilisiert wurde, geschah dies mit dem zweiten Aktin-Ring von Minute 20 bis Minute 50 (**Film 12**). Eine membranständige Orai1-Akkumulation war eine Minute nach Kontakt an der ersten Kontaktstelle zu erkennen und verblieb ringförmig dort (**Abb. 39 a** grüne Pfeile, **b** hellgrüne Striche und Linien). Diese Akkumulation kolokalisierte ab Minute 9 mit Aktin-Ring #1 und bewegte sich mit der Kontaktstelle zusammen. An der zweiten Kontaktstelle war ab Minute 30 eine Orai1-Akkumulation erkennbar (**a** dunkelgrüne Pfeile, **b** grüne Striche und Linien). An der Kontaktstelle mit dem Deckglas (Uropod) befand sich in diesem Beispiel eine membranständige Orai1-Akkumulation, die sich im Experimentverlauf kaum auf dem Deckglas bewegte (grüne Rechtecke). Die primäre Mitochondrien-Akkumulation (**a** hellblauer Pfeil) bewegte sich zunächst mit dem Orai1-Golgi-Signal zur zweiten Kontaktstelle, verblieb allerdings zwischen beiden Kontakten (**b** hellblaue Kreuze und Linien). Eine sekundäre Mitochondrien-Akkumulation, die sich zunächst am Uropod befand, bewegte sich in den Raum zwischen zweiter Kontaktstelle und Uropod (**b** blaue Kreuze und Linien).

Im Experimentverlauf stabilisierten sich die Akkumulationen an den Kontaktstellen mit der Kontraktion der Aktin-Ringe. Bei Minute 60 erschienen alle intrazellulären Akkumulationen an der Doppel-IS, beide Orai1-Akkumulationen (**a** grüne Pfeile, **b i** grüne Linien) befanden sich zwischen den B-Zellen. Der Zellkern (weiße Punkte, dunkelblaue Rechtecke) füllte den Rest des Zellinnenraums aus, die Zellkern-Einbuchtung war zu den Kontaktstellen orientiert. Der Uropod wurde durch die Bewegungen der Kontaktstellen und die Verschiebung des Zellkerns (weiße Punkte, dunkelblaue Rechtecke und blaue Linien) in die Nähe beider Kontaktstellen gebracht. Diese Zellform entsprach der zuvor schon mehrfach gezeigten runden Zellform einer „stabilen IS“ (s. Abb. 32 i ii, 33, 34, 35 a, 36, 38 a).

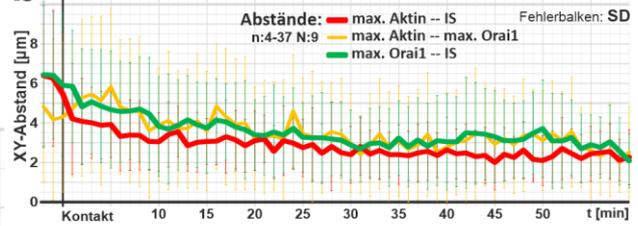
Analyse - Einzelkontakte. Für 44 Jurkat-Zellen mit Einzel-Raji-Kontakt wurden XY-Nachverfolgungen (Tracks) aller identifizierten Organell- und Membran-Akkumulationen angefertigt (**Abb. 40 a-e**). Da die Kontaktbildung der Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten im Experiment stattfand, nimmt die Anzahl der Tracks vor Kontakt und zu späteren Zeitpunkten ab. Ebenso konnten nicht in allen Zellen dieselben Zellbestandteile identifiziert werden, da manche Färbungen in einigen Zellen nicht vorhanden waren, wodurch die Anzahl auswertbarer Zellen eingeschränkt wurde. Daher wurde in dieser Analyse nicht zwischen der Ausbildung einer „stabilen“ oder unvollständigen IS (s. Abb. 38) unterschieden.

Durchschnittliche XY-Abstände verschiedener Zellbestandteile zur im Hellfeld bestimmten IS (orange) und der mittlere Durchmesser der Aktin-Ringe wurden berechnet und sind in **Abb. 40 a** über die Zeit dargestellt. Im Graph sind zwei zeitlich distinkte Annäherungen zu erkennen. Zentrosom-assoziierte Strukturen, wie primäre endoCD3-Akkumulationen (lila) und primäre Mitochondrien-Akkumulationen (hellblau), bewegten sich direkt nach Kontakt näher zur IS. Der Mittelpunkt des Orai1-Golgi-Signals (grün) näherte sich zunächst innerhalb von 7 Minuten bis auf etwa 2,4 μm der IS an und erreichte nach 17 Minuten

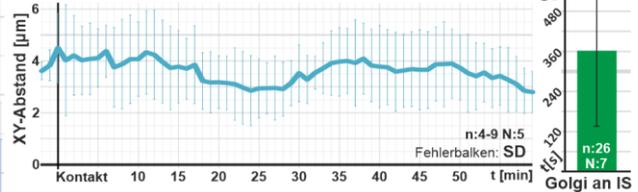
a Abstand zur IS



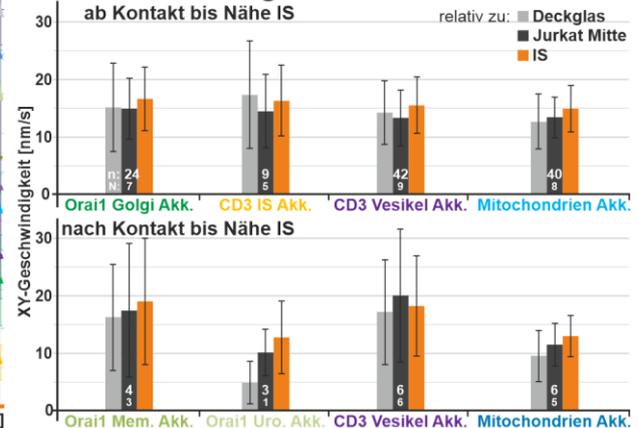
b Aktin + Orai1 - max. Membran Fluo.



c Orai1 Mem. Akk. -- Mito. Akk.



e Ø-Geschwindigkeit bis Erreichen der IS



f Maximal-Geschwindigkeiten

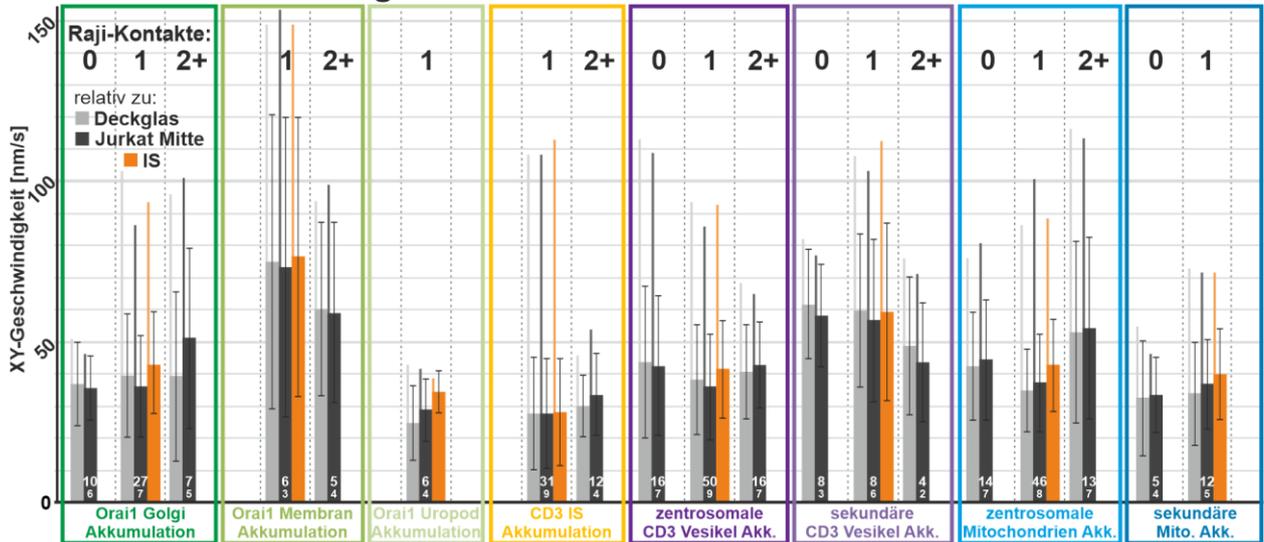


Abb. 40: Analyse aller detektierten Zellbestandteile bei Jurkat-Raji-Kontakten.

a Durchschnittliche (ϕ) XY-Abstände detektierter Organell- und Membran-Akkumulationen bei Jurkat-Raji-Einzelkontakten (s. **Abb. 38**) zur Immunologischen Synapse (IS) über die Zeit, normiert auf den Zeitpunkt des Kontakts zwischen T- und B-Zelle für 3-44 T-Zellen aus 3-9 Experimenten. „Sekundäre Annäherungen“ an die IS sind mit Pfeilen gekennzeichnet. Fehlerbalken: S.E.M.. **b** ϕ -XY-Abstände für maximale membranständige Aktin- und Orai1-Fluoreszenzen über die Zeit für 4-37 Jurkat-Raji-Einzelkontakte aus 3-9 Experimenten. Fehlerbalken: SD. **c** ϕ -XY-Abstand zwischen membranständigen Orai1-Akkumulationen und nahen Mitochondrien-Akkumulationen über die Zeit für 3-8 Jurkat-Raji-Einzelkontakte aus 2-4 Experimenten. Fehlerbalken: SD. **d** ϕ -Zeit in Sekunden nach Kontakt zwischen Jurkat- und Raji-Zelle, die der Golgi-Apparat bis zum Erreichen der IS benötigt. Fehlerbalken: SD. **e** Mittlere Durchschnittsgeschwindigkeiten verschiedener Organell- und Membran-Akkumulationen nach Kontakt bis zum Erreichen der IS bzw. bei Bewegungsstart nach Kontakt („sekundäre Annäherung“) bis zum Erreichen der IS, relativ zu Deckglas (grau), Jurkat-Mitte (schwarz) und IS (orange), in Nanometer pro Sekunde (nm/s). Fehlerbalken: SD. **f** ϕ -Maximalgeschwindigkeiten mit Spitzenwerten verschiedener identifizierter Akkumulationen in Jurkat CD4⁺ T-Zellen ohne Kontakt (Kontrolle) und bei Jurkat-Raji-Einzel- bzw. Mehrfachkontakten, relativ zu Deckglas (grau) und Jurkat-Mitte (schwarz) und für Einzelkontakte zusätzlich relativ zur IS (orange). Alle Geschwindigkeiten sind in Nanometer pro Sekunde (nm/s) angegeben. Fehlerbalken: SD.

einen Abstand von etwa 1,7 μm . Ursprünglich am Uropod lokalisierte Strukturen, wie sekundäre endoCD3-Vesikel-Akkumulationen (violett), Orai1-Membran- und Orai1-Uropod-Akkumulationen (dunkel/hellgrün) und sekundäre Mitochondrien-Akkumulationen (blau), wurden etwa ab Minute 40 nach Kontakt näher zur IS gebracht (a Pfeile). Der mittlere Durchmesser der Aktin-Ringe (rot) erreichte ein Maximum von 9,2 μm nach 7 Minuten und verringerte sich danach bis auf etwa 5 μm . In allen Zellen, die während des Experimentverlaufs die runde Zellform einer „stabilen IS“ annahmen, befanden sich alle Zellbestandteile in dieser Zellform in der Nähe der IS, wie in der Beispielzelle aus Abb. 38 a.

Die höchsten membranständigen Fluoreszenzen von Aktin und Orai1 wurden manuell nachverfolgt und der Abstand zwischen maximalem Aktin und der IS bzw. maximaler membranständiger Orai1-Fluoreszenz, sowie der Abstand zwischen maximalem Membran-Orai1 und der IS über die Zeit bestimmt (Abb. 40 b). Diese Abstände verringerten sich im Lauf der Experimente auf durchschnittlich 2-3 μm .

Bei 9 Zellen, in denen Orai1-Membran- und sekundäre Mitochondrien-Akkumulationen detektiert werden konnten, veränderte sich der Abstand beider Akkumulations-Mittelpunkte trotz Annäherung beider Signale zur IS im Verlauf der Experimente kaum und schwankte zwischen durchschnittlich 3 und 4 μm (Abb. 40 c).

In 26 Zellen mit Orai1-Golgi-Signal wurde die mittlere Zeit nach Kontakt, welche die Außengrenzen des Golgi-Apparates zum Erreichen der IS-Membran benötigten, auf etwa 6 Minuten bestimmt (Abb. 40 d).

Die mittlere Durchschnittsgeschwindigkeit (Abb. 40 e) von Orai1-Golgi-Akkumulationen, CD3-IS-Akkumulationen, endoCD3-Vesikel-Akkumulationen und Mitochondrien-Akkumulationen, die sich direkt nach Kontakt zur IS bewegten, betrug bis zum Erreichen der IS zwischen 12 nm/s und 17 nm/s. Zunächst uropodial auftretende Orai1-Membran-Akkumulationen, punktförmige Orai1-Akkumulationen am Uropod, sekundäre endoCD3-Vesikel-Akkumulationen und sekundäre Mitochondrien-Akkumulationen wurden in einer „sekundären Annäherung“ durchschnittlich etwa 40 Minuten nach Kontakt in die Nähe der IS bewegt (s. Abb. 40 a Pfeile). Diese Strukturen hatten Durchschnittsgeschwindigkeiten zwischen 5 nm/s (Orai1-Uropod-Akkumulationen, relativ zum Deckglas) und 20 nm/s (endoCD3-Vesikel-Akkumulationen, relativ zur T-Zellmitte).

Maximalgeschwindigkeiten. Zur Bestimmung maximaler Geschwindigkeiten aller untersuchten Organell-Akkumulationen und Membranstrukturen wurden zusätzlich zu Einzelkontakten auch bei Mehrfachkontakten und kontaktlosen Jurkat-Zellen wie zuvor XY-Nachverfolgungen (Tracks) angefertigt. Die durchschnittlichen (\emptyset) Maximalgeschwindigkeiten von intrazellulären Orai1-Golgi-Akkumulationen, Orai1-Membran-Akkumulationen, Orai1-Deckglas-Akkumulationen, CD3-IS-Akkumulationen, sowie von zentrosomalen und sekundären endoCD3-Vesikel- und Mitochondrien-Akkumulationen, wurden relativ zum Deckglas (grau) und zur T-Zellmitte (schwarz), bei Einzelkontakten zusätzlich relativ zur IS (orange), berechnet. Die Ergebnisse sind mit den Spitzenwerten und Standardabweichungen in Abb. 40 f dargestellt. Bei kontaktlosen Jurkat-Zellen und Einzelkontakten beliefen sich die \emptyset -Maximalgeschwindigkeiten der zentrosomalen Orai1-Golgi-, endoCD3-Vesikel- und Mitochondrien-Akkumulationen auf ähnliche Werte zwischen 33 nm/s und 43 nm/s. Die \emptyset -Maximalgeschwindigkeit der zentrosomalen Mitochondrien-Akkumulation erreichte bei Mehrfachkontakten die höchsten Werte von 52-53 nm/s. Sekundäre endoCD3-

Vesikel-Akkumulationen zeigten durchgehend höhere \emptyset -Maximalgeschwindigkeiten von knapp 60 nm/s bei Null- und Einzelkontakt sowie 43-49 nm/s bei Mehrfachkontakten. Bei all diesen Akkumulationen, mit Ausnahme der sekundären Mitochondrien-Akkumulation, wurden bei Einzelkontakten Spitzenwerte von 85-113 nm/s erreicht. Bei kontaktlosen Zellen fiel der Spitzenwert der Orai1-Golgi-Akkumulation auf 47-51 nm/s, bei sekundärer endoCD3-Vesikel- und primärer Mitochondrien-Akkumulation auf 76-81 nm/s. Bei Mehrfachkontakten fielen die Spitzenwerte bei endoCD3-Vesikel-Akkumulationen auf 65-75 nm/s, während sie bei primären Mitochondrien-Akkumulationen auf die höchsten Werte intrazellulärer Akkumulationen in Höhe von 113-116 nm/s stiegen. Membranständige Orai1-Akkumulationen wiesen aufgrund der Zellformänderungen und Membranverformungen die insgesamt höchsten Spitzenwerte auf, mit 148-153 nm/s bei Einzelkontakten und 93-99 nm/s bei Mehrfachkontakten.

Zusammenfassung. Wie die zuvor untersuchten primären CD8⁺ T-Zellen (s. 3.2.1) versuchten Jurkat CD4⁺ T-Zellen nach dem Kontakt mit stimulierenden Raji-Zellen die runde Zellform einer „stabilen IS“ anzunehmen (**Abb. 38**). Jurkat-Zellen wurden durch die Anhaftung am Deckglas stärker in der Ausbildung einer stabilen IS beeinträchtigt als primäre CD8⁺ T-Zellen und benötigten für die Annahme dieser Zellform deutlich länger (**Abb. 38 a**). Zentrosomale Organell-Akkumulationen bewegten sich direkt nach Kontakt zur IS, sekundäre Akkumulationen und uropodiale Strukturen wurden erst etwa 40 Minuten nach Kontakt in die Nähe der IS gebracht (**Abb. 40 a**), mit im Vergleich zu primären CD8⁺ T-Zellen relativ langsamen Objekt-Bewegungen (**Abb. 40 e**, s. Abb. 34, 37 b ii). Die höchsten detektierten Aktin- und Orai1-Membran-Fluoreszenzen lokalisierten bei IS-Ausbildung durch die Bildung des Aktin-Rings und eine anschließende Kontraktion der Plasmamembran an der IS (**Abb. 40 b**). Orai1-Membran-Akkumulationen bewegten sich zusammen mit sekundären Mitochondrien-Akkumulationen zur IS (**Abb. 40 c**). Die durchschnittlichen Organell-Maximalgeschwindigkeiten unterschieden sich kaum zwischen kontaktlosen Jurkat-Zellen und Einzel- oder Mehrfachkontakten, allerdings traten bei Kontaktbildung 2-3x höhere Spitzenwerte auf (**Abb. 40 f**). Die höchsten Geschwindigkeiten wurden bei Kontaktbildung für membranständige Orai1-Akkumulationen gemessen. Die in Jurkat-Zellen gemessenen Geschwindigkeiten von Organell-Akkumulationen waren etwa 2-3x niedriger als Zentrosom-Geschwindigkeiten in primären CD8⁺ T-Zellen (s. Abb. 37 b ii). Bei Mehrfachkontakten verhielten sich die Jurkat-Zellen ähnlich wie primäre CD8⁺ T-Zellen (s. Abb. 36), wobei die Zellformänderung zur stabilen IS allerdings eine deutlich längere Zeit in Anspruch nahm. Zentrosomale Strukturen bewegten sich wie bei primären CD8⁺ T-Zellen auch bei Jurkat-Zellen in einem Drittel der Fälle von der ersten zur zweiten Kontaktstelle (**Abb. 39**).

3.2.2.2 Orai1-STIM1 Ko-Expression und Akkumulations-Analyse von Orai1

Durch die gemeinsame Transfektion von „Orai1-mEGFP“ und „STIM1-TagRFP-T“ in Jurkat CD4⁺ T-Zellen wurde die Orai1-STIM1-„Cluster“-Bildung (*Baraniak et al. 2020*) und deren Verteilung während der Ausbildung einer Immunologischen Synapse mit SEE-beladenen Raji B-Zellen untersucht (**Abb. 41**).

In einer Zeitrafferaufnahme von 58 Minuten (**Abb. 41 a, Film 12**) erreichten 4 ko-transfizierte Jurkat-Zellen die runde Zellform einer „stabilen IS“ (s. Abb. 38 a). Drei weitere Zellen erreichten diese Zellform

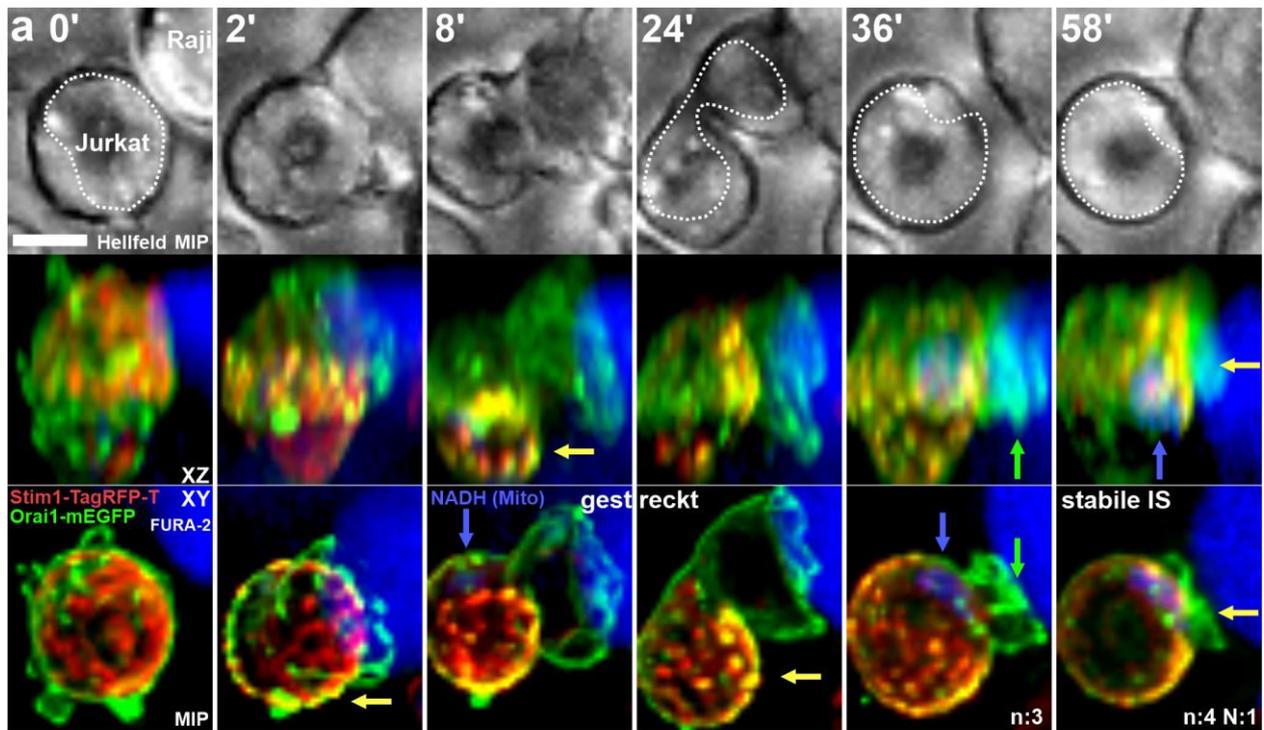
fast vollständig (**a 36'**). Die Beispielzelle in **a** durchlief eine vollständige IS-Ausbildung mit „gestreckter“ Zwischenform nach direktem Kontakt. Vor Kontakt mit einer FURA-2-gefärbten Raji-Zelle (blau) erschien das Orai1-mEGFP-Signal (grün) wie eine unspezifische Plasmamembran-Färbung (s. Abb. 14). Das STIM1-TagRFP-T-Signal (rot) entsprach einer ER-Färbung (s. Abb. 20). Vor dem Kontakt kam es kaum zu einer Überlappung beider Signale (gelb). Der Zellkern (weiße Punkte) wurde in der „gestreckten“ Zellform zur IS bewegt, bei stabiler IS-Zellform füllte er das gesamte von der IS abgewandte Zellinnere aus, die Zellkern-Einbuchtung war zur IS orientiert (s. Abb. 38 a). Nach Kontakt entstanden STIM1-Cluster, die an der Plasmamembran mit dem Orai1-Signal kolokalisierten (2' gelbe Pfeile). In der „gestreckten“ Zellform akkumulierten diese Cluster am Uropod (8'-24'). Bei der Annahme der runden stabilen IS-Zellform verteilten sich die Cluster zunächst um den Zellkern (36') und akkumulierten schließlich an der IS (58'). Eine Plasmamembran-Akkumulation von Orai1 entstand durch die Kontraktion der Kontaktfläche (36' grüner Pfeil), bevor die Orai1-STIM1-Cluster an der IS akkumulierten. Zur selben Zeit bewegte sich eine mittels NADH detektierte Mitochondrien-Akkumulation an die IS (blaue Pfeile).

Zur statistischen Auswertung wurden zusätzliche Einzelzeitpunkt-Aufnahmen mit höherer Auflösung 60 Minuten nach Zugabe der SEE-beladenen Raji B-Zellen angefertigt. Bis auf eine von 120 untersuchten Jurkat-Zellen wiesen alle ko-transfizierten Jurkat-Zellen Orai1-STIM1-Cluster-Akkumulationen auf. Nach der vollständigen Annahme der stabilen IS-Zellform (79 Zellen) waren diese Cluster an der IS lokalisiert (**Abb. 41 b i** stabile IS), bei unvollständiger IS befanden sich die Cluster an der Kontaktfläche mit dem Deckglas bzw. dem Uropod (**Abb. 41 b i** unvollständige IS).

Zusätzlich zu diesen Aufnahmen ko-transfizierter Zellen (rot) wurden weitere Experimente auf Orai1-Akkumulationen und Zellform untersucht (**Abb. 41 b iii**): Orai1-mEGFP-transfizierte Jurkat-Zellen 60 min nach Zugabe von anti-CD3-Antikörper-beschichteten „Beads“ (grau) bzw. SEE-beladenen Raji-Zellen (grün), sowie anti-Orai1-Antikörper-Markierungen in stabil Orai1-exprimierenden, fixierten Jurkat-Zellen (blau) bzw. in fixierten „Wildtyp“ Jurkat-Zellen (endogen, schwarz) nach 60-minütigem Raji-Kontakt (s. **Abb. 41 b ii**). In Zellen mit alleiniger Orai1-mEGFP-Transfektion (s. Abb. 38) kam es bei etwa 60 % der Zellen mit stabiler IS-Zellform zu Orai1-Golgi-Akkumulationen an der IS, ohne membranständige Akkumulation von Orai1 (s. **Abb. 41 b** reine Golgi IS Akkumulation), etwa 8 % dieser Zellen zeigten keine Orai1-Akkumulation. Bei den fixierten Zellen mit Orai1-Antikörper-Färbung wiesen etwa 5 % keine Orai1-Akkumulation auf. Alle restlichen Zellen zeigten bei stabiler IS-Zellform Orai1-Akkumulationen an der IS, bei unvollständiger IS befanden sich diese am Uropod (s. **Abb. 41 b iii**).

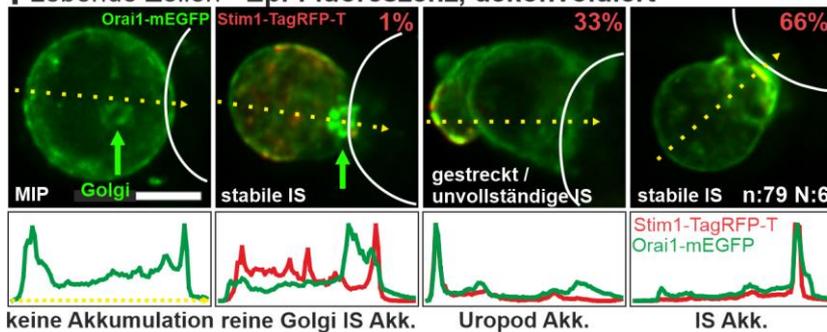
Um die Orai1-STIM1-Cluster besser aufzulösen wurden mit Orai1-mEGFP und STIM1-TagRFP-T ko-transfizierte Jurkat-Zellen zur maximalen STIM-Aktivierung mit „Thapsigargin“ behandelt und zur IS-Ausbildung auf anti-CD3-Antikörper-beschichtete Deckgläser absinken gelassen, während sie mittels TIRF-Mikroskopie aufgenommen wurden. Diese Experimente zeigten, neben einer relativ gleichmäßigen Verteilung des überexprimierten Orai1 in der Plasmamembran, punktförmige Akkumulationen von Orai1, kolokalisiert mit überexprimiertem STIM1. Die Beispielzelle in **Abb. 41 c** war 20 Minuten nach dem Kontakt mit dem Deckglas stark abgeflacht und wies neben Orai1-STIM1-Clustern (gelb) ein starkes Vorkommen von Orai1 (grün) im Rest der Deckglas-nahen Plasmamembran auf.

Ergebnisse



b Orai1 Akkumulation - Einteilung & Analyse - 60 min nach B-Zell Zugabe

i Lebende Zellen - Epi-Fluoreszenz, dekonvolviert



ii Fixierte Zellen - LSM, dekonv.

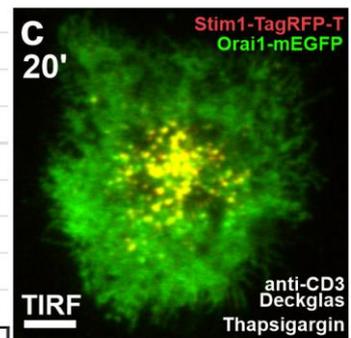
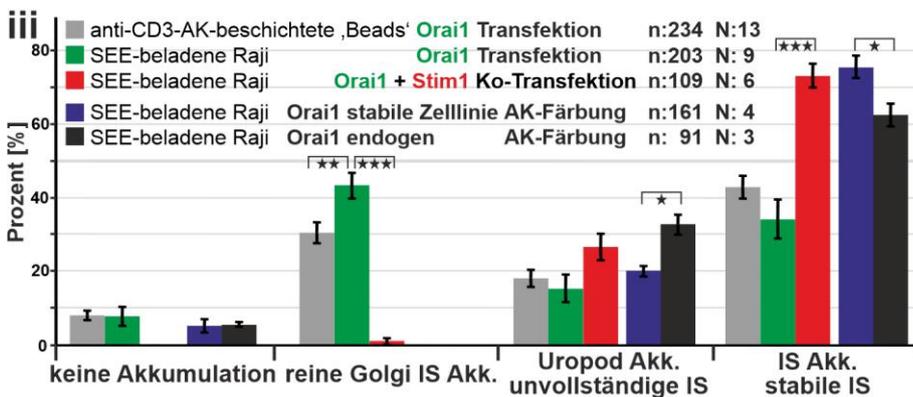
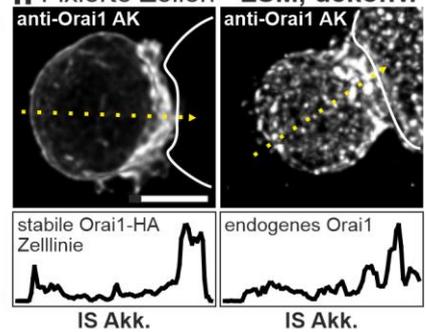


Abb. 41: Orai1- und STIM1-Dynamik und Orai1-Akkumulationen in Jurkat CD4⁺ T-Zellen bei Ausbildung Immunologischer Synapsen.

a XY-Maximal-Intensitäts-Projektionen (MIP) der Hellfeld- und XY- und XZ-MIPs der Fluoreszenz-Z-Stapel-Zeitrafferaufnahme (0,5 μm Z-Abstand, 120 s Zeitauflösung) einer mit STIM1-TagRFP-T (rot) und Orai1-mEGFP (grün) ko-transfizierten Jurkat CD4⁺ T-Zelle im Kontakt mit einer FURA-2-gefärbten und SEE-beladenen Raji B-Zelle (blau) in Kulturmedium bei 37°C. Alle Fluoreszenzaufnahmen wurden iterativ dekonvolviert. Die UV-Anregung machte Mitochondrien-Akkumulationen sichtbar (NADH, blau). **Film 13:** dropbox.com/s/kq1fd8qadh8b6zf/Film13.AVI?dl=0 **Maßstabsbalken: 5 μm Film 13**

b Orai1 Lokalisations-Analyse: i Einteilung der detektierten Orai1-Akkumulationen mit Beispielen von Einzelzeitpunkt-Aufnahmen 60 Minuten nach Zugabe der Raji-Zellen (weiße Linien) und Auswertung mittels Linien-Intensitäts-Diagrammen. ii Färbungen durch primäre Antikörper gegen Orai1 bei fixierten stabil Orai1-HA-exprimierenden Jurkat-Zellen und Jurkat E6.1 (endogenes Orai1) mit Beispielen für „IS Akkumulation“ (dekonvolvierte LSM-Aufnahmen mit 0,25 μm Z-Abstand). iii Graphische Auftragung aller wie in i ausgewerteten Experimente.

Signifikante Unterschiede wurden mittels ungepaartem Standard t-Test überprüft. * p<0,05, ** p<0,01, *** p<0,005. **Maßstabsbalken: 5 μm**

c TIRF-Aufnahme einer mit STIM1-TagRFP-T (rot) und Orai1-mEGFP (grün) transfizierten und Thapsigargin-inkubierten Jurkat CD4⁺ T-Zelle, 20 Minuten nach dem Aufsetzen auf einem anti-CD3-Antikörper-beschichteten Deckglas (n: 4, N: 2). **Maßstabsbalken: 5 μm**

Die Teile b und c dieser Abbildung sind in Quintana et al. (2011) (Abb. 1 & 2) veröffentlicht und wurden für diese Arbeit editiert und erweitert.

3.2.3 Zusammenfassung von Kapitel 3.2

Sowohl primäre stimulierte CD8⁺ T-Zellen als auch Jurkat CD4⁺ T-Zellen durchliefen bei der Ausbildung Immunologischer Synapsen (IS) mit stimulierenden Raji B-Zellen ausgeprägte Veränderungen ihrer Morphologie. Bei ausreichender Kontaktdauer und Bewegungsfreiheit nahmen alle T-Zellen eine runde Form an, mit einer verkleinerten Kontaktfläche zur B-Zelle („stabile IS“) (**Abb. 32, 38**). Bei festem Kontakt mit dem Deckglas wurde dabei der Kontaktbereich mit dem Deckglas (Uropod) möglichst nahe an die IS gebracht. Einige primäre CD8⁺ T-Zellen lösten sich nach dem Kontakt vollkommen vom Deckglas ab und bildeten ihren Uropod vollständig zurück (**Abb. 33 b, 34**). Das Zentrosom bewegte sich in den meisten untersuchten T-Zellen nach dem Kontakt innerhalb weniger Minuten nahe zum IS-Zentrum, mit Geschwindigkeiten von bis zu 180 nm/s (**Abb. 32, 35**). In Zellen, die in ihrer Formänderung beeinträchtigt waren, erreichte das Zentrosom die IS leicht verzögert und verblieb in größerem Abstand zum IS-Zentrum (**Abb. 35 b**). Mit dem Zentrosom assoziierte Organellen, wie Golgi-Apparat, Mitochondrien und Vesikel (endozytierte CD3-Vesikel und Lytische Granula) wurden durch die Zentrosombewegung ebenfalls in die Nähe der IS gebracht (**Abb. 33, 34, 35, 38**). Am Zentrosom verblieben dabei fast immer einzelne Mitochondrien, während mit dem Zentrosom assoziierte Mitochondrien-Akkumulationen bei fester Deckglasanhaftung der T-Zelle zeitlich verzögert in die Nähe der IS gebracht wurden (**Abb. 33 b**). Einzelne Mitochondrien begannen sich einige Minuten nach Kontakt mit Spitzengeschwindigkeiten von mehr als 200 nm/s durch die Zellen zu bewegen und wurden dabei vor allem an den Rändern und dem Zentrum der IS positioniert (**Abb. 33 a**). Einzelne Lytische Granula bewegten sich nach Kontakt mindestens doppelt so schnell wie das Zentrosom durch die gesamte Zelle, auch vom Zentrosom und der IS weg (**Abb. 34, 37 b**). Neben zentrosomalen Akkumulationen wurden in den meisten T-Zellen weitere Akkumulationen von Mitochondrien und endozytierten CD3-Vesikeln angefundenes, die mit dem Zellkern und/oder der Kontaktstelle mit dem Deckglas (Uropod) assoziiert waren (**Abb. 33, 35, 38**). Ebenso wurden neben membranständigen Akkumulationen von CD3 am IS-Zentrum und Aktin-Akkumulationen an den Rändern der IS (Aktin-Ring) auch membranständige Akkumulationen von CD3, Aktin, Orail und Orail-STIM1-„Clustern“ am Kontaktbereich mit dem Deckglas (Uropod) detektiert (**Abb. 35, 38, 41**). Sowohl nicht-zentrosomale Organell-Akkumulationen, als auch diese membranständigen uropodialen Signale konnten nur bei unbeeinträchtigter Formänderung vollständig in die Nähe der IS gebracht werden (**Abb. 35 b, 38 b, 40 a, 41 b**). Bei Kontaktaufnahme mit mehreren stimulierenden B-Zellen wurden sowohl von primären CD8⁺ T-Zellen als auch Jurkat CD4⁺ T-Zellen multiple Immunologische Synapsen ausgebildet, die durch Formänderungen der T-Zellen räumlich zusammengeführt wurden (**Abb. 36, 39**). Das Zentrosom verblieb in etwa 68 % aller Mehrfachkontakte an der zuerst ausgebildeten IS. Etwa 25 % aller B-Zellen bei Einzel- und Erstkontakten zeigten Apoptosesignale, bevor das Zentrosom der T-Zelle die Nähe der IS erreichte (**Abb. 32 B d, 37 a**). Bei B-Zellen, die zusätzlich kontaktiert wurden, war dies stets der Fall (**Abb. 37 a**). Alle in diesem Kapitel festgestellten Ergebnisse zur Lokalisation von Organellen und membranständigen Akkumulationen in T-Zellen bei direktem und fernem („gestrecktem“) Kontakt sowie Doppelkontakten mit Superantigen-beladenen B-Zellen sind mit Ergänzungen aus *Barr et al. (2008)* und *Qu et al. (2011)* in **Abb. 44** (s. Diskussion) zusammengefasst.

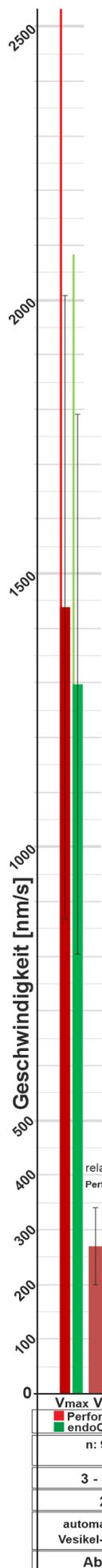
3.3 Zusammenstellung von Zell- und Organell-Geschwindigkeiten

In den Kapiteln 3.1 und 3.2 gemessene Geschwindigkeiten von Lamellopodien, Zentrosom, Vesikeln und Mitochondrien stimulierter CD8⁺ T-Zellen, sowohl mit als auch ohne B-Zell-Kontakt, sind in **Tabelle 16** und **Abb. 42** zusammengestellt. Dabei handelt es sich um die Geschwindigkeiten von Perforin- und endoCD3-Vesikeln gemäß **Abb. 30 b** (relativ zum Mittelpunkt der Perforin-Vesikel-Akkumulation), die Geschwindigkeiten von Lamellopodien entsprechend **Abb. 17 b** (relativ zur Zellmitte), die Lamellopodien- und Zentrosom-Geschwindigkeiten bei Uropodbewegungen über das Deckglas aus **Abb. 24 c** (relativ zum Deckglas), die Geschwindigkeiten einzelner Mitochondrien bei B-Zell-Kontakt gemäß **Abb. 33 a** (relativ zu Deckglas, T-Zellmitte, IS und Zentrosom), sowie die Vesikel- und Zentrosom-Geschwindigkeiten bei 1-2 B-Zell-Kontakten aus **Abb. 37 b** (relativ zu Deckglas, T-Zellmitte, IS bzw. Zentrosom). Zum Vergleich sind die Geschwindigkeiten der intrazellulären Orail-Akkumulation in Jurkat-Zellen mit individuellem B-Zell-Kontakt aus **Abb. 40** ebenfalls gezeigt (relativ zu Deckglas, T-Zellmitte und IS).

Die höchsten durchschnittlichen Maximalgeschwindigkeiten (V_{max}) wurden durch semi-automatisches XYZ-Tracking von Vesikeln in kontaktlosen Zellen mit 1297 nm/s (endoCD3) bis 1438 nm/s (Perforin) festgestellt. Bei manuellem XY-Tracking betrug dieser Wert für in das umgebende Medium ausgebildete Lamellopodien 408 nm/s und für das Front-Lamellopodium migrierender Zellen 158 nm/s (bei sehr niedriger Zeitaufösung). Die mittlere Durchschnittsgeschwindigkeit (V_{\emptyset}) betrug in beiden Fällen vergleichbare 137 nm/s bzw. 100 nm/s. Das Zentrosom erreichte bei Migration eine V_{max} von 100 nm/s relativ zum Deckglas. Ebenfalls relativ zum Deckglas wiesen die manuellen XYZ-Tracks zur Bestimmung der Zentrosomposition im semi-automatischen Vesikel-Tracking eine V_{max} von 194 nm/s auf.

Tabelle 16: Zusammenstellung berechneter Geschwindigkeiten von Zellen, Zentrosom und Organellen.

T-Zellen	Bead-stimulierte CD8 ⁺			SEA-stimulierte CD8 ⁺						Jurkat CD4 ⁺	
B-Zellen	kontaktlos					1 Raji	1-2 Raji			1 Raji	
Abbildung	30 b			17 b	24 c	33 a	37 b			40 e f	
Objekt	Perforin Vesikel	endoCD3 Vesikel	Perforin Akk.	Lamellopodien	Zentrosom	Mito-chondrien	Perforin Vesikel	endoCD3 Vesikel	Zentrosom	Golgi	
n	9 Zellen			66	12 Uropod-Beweg.	25	21	22	13	27	
N	4			3	3	2	2	5	7	7	
Δt	3 - 5,8 s			157 s		20 s	10 s	30 s	10 - 30 s	60 s	
Temperatur	25°C			37°C							
Tracks	semi-automatische XYZ			manuelle XY							
Basis	Vesikel-Fluoreszenz			Aktin-Fluo.	Hellfeld	Zentr.-Fluo.	Mito.-Fluo.	Vesikel-Fluoreszenz	Zentrosom-Fluoreszenz	Orail-Fluoreszenz	
V [nm/s] relativ zu											
abs. V_{max}											
Deckglas			275		171	116	222	436	257	182	104
T-Zellmitte				835			208	432	260	171	87
IS							222	436	263	184	94
Zentrosom	2533	2083					236	459	257		
$\emptyset V_{max}$											
Deckglas			194		158	101	115	236	112	95	40
T-Zellmitte				408			118	238	113	94	37
IS							116	240	113	110	43
Zentrosom	1438	1297					128	243	114		
V_{\emptyset}										Kontakt bis IS	
Deckglas			72		100	76	35			56	15
T-Zellmitte				137			37			45	15
IS							37			65	17
Zentrosom	269	253					39			n: 10	n: 24



Für 25 einzelne Mitochondrien wurde eine XY-Vmax von 115-128 nm/s, mit Spitzenwerten von 208-236 nm/s, berechnet. Die XY-VØ über den gesamten Experimentverlauf belief sich auf 35-39 nm/s. Die höchsten Werte wurden relativ zum Zentrosom bestimmt.

Die XY-Vmax relativ langsamer verfolgbarer endoCD3-Vesikel bei IS-Ausbildung betrug 94-110 nm/s, mit Spitzenwerten von 257-263 nm/s, während von ebenfalls selten verfolgbareren Perforin-Vesikeln eine XY-Vmax von 236-243 nm/s erreicht wurde, mit Spitzenwerten von 432-459 nm/s. Die höchsten Werte wurden hier relativ zu Zentrosom und IS bestimmt.

Für das Zentrosom wurde bei IS-Ausbildung eine XY-Vmax von etwa 94-110 nm/s, mit Spitzenwerten von 171-184 nm/s, berechnet. Die XY-VØ nach dem Kontakt mit Raji-Zellen bis zum Erreichen der IS betrug 45-65 nm/s.

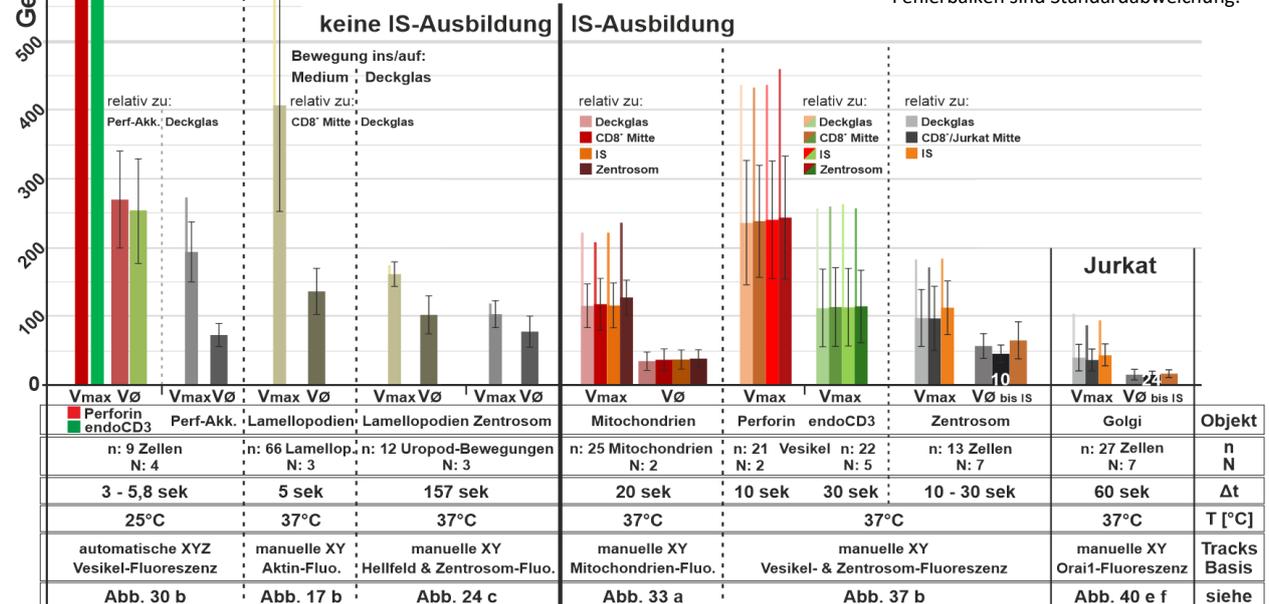
In Experimenten mit Jurkat-Zellen betrug die XY-Vmax der Orai1-Golgi-Akkumulation während der IS-Ausbildung 37-43 nm/s, die Spitzenwerte lagen bei 87-104 nm/s. Die XY-VØ nach Kontakt bis zum Erreichen der IS betrug 15-17 nm/s.

Zusammenfassung. Während Zellbewegungen, Zellformänderungen und die Bewegung des Zentrosoms in primären stimulierten CD8⁺ T-Zellen vergleichbare Maximalgeschwindigkeiten aufzeigten, konnten bei einzelnen Vesikeln deutlich höhere Geschwindigkeiten nachgewiesen werden. Bei Jurkat-Zellen wiesen Akkumulationen und Zellformänderungen etwa 2-3x niedrigere Geschwindigkeiten auf als bei stimulierten CD8⁺ T-Zellen (s. **Abb. 40**).

Abb. 42: Zusammenstellung berechneter Geschwindigkeiten von Zellen, Zentrosom und Organellen.

Zusammenfassung aller berechneten Geschwindigkeiten für Zellbewegungen, Zentrosome, sowie einzelne Mitochondrien und Vesikel in stimulierten CD8⁺ T-Zellen mit und ohne Ausbildung Immunologischer Synapsen (IS) aus **Abb. 30, 17, 24, 33** und **37** und für den Golgi-Apparat in Jurkat CD4⁺ T-Zellen mit IS-Ausbildung aus **Abb. 40** mit allen relevanten Experimentdaten in Nanometer pro Sekunde (nm/s). Alle Experimente wurden auf Poly-L-Ornithin-beschichteten Glas-Deckgläsern durchgeführt.

Fehlerbalken sind Standardabweichung.



4 Diskussion

Die zentrale Bedeutung des adaptiven Immunsystems bei der Bekämpfung von Krankheiten ist spätestens seit dem Ausbruch der „SARS-CoV-2“-Pandemie in das Bewusstsein der breiten Öffentlichkeit gelangt. Neben einer Vielzahl sogenannter „Non-Structural-Proteins“ (NSP), mit denen aktiv auf vielfältige Weise in die angeborene und adaptive Immunabwehr hemmend eingegriffen wird (*Low et al. 2022*), infiziert SARS-CoV-2 auch direkt zahlreiche Immunzellen inklusive T-Zellen, die damit nicht mehr für die Immunantwort zur Verfügung stehen (*Kuklina 2022*). Aktuelle Forschungen haben gezeigt, dass die Bindung des Spike-Proteins an von stimulierten CD8⁺ T-Zellen exprimiertes ACE2 zu einer gestörten Zellpolarisation und verminderter Abtötungseffizienz führt (*Onnis et al. 2023*). Auch zur Bekämpfung entarteter Körperzellen und zur Verhinderung von Autoimmunkrankheiten ist eine balancierte Aktivierung naiver und stimulierter T-Zellen essenziell. Dies wird durch eine ordnungsgemäß ablaufende Zellpolarisation und eventuelle Repolarisation erreicht. In zahlreichen „in vitro“-Studien mit lebenden T-Zellen auf Deckgläsern sind diese Prozesse mittlerweile vor allem für einzelne Organellgruppen wie Mitochondrien (*Contento et al. 2010; Quintana et al. 2011; He et al. 2019*) oder Lytische Granula und für das Zytoskelett beschrieben (*Bertrand et al. 2013; Ritter et al. 2015; Ritter et al. 2017; Frazer et al. 2021*). Zwischen diesen Studien bestehen allerdings einige Widersprüche, vor allem bezüglich der Bedeutung der Zentrosom-Polarisation bei der Abtötung von Zielzellen. Einige Erkenntnisse wurden in stark abgeflachten T-Zellen (z.B. auf durch Antikörper stimulierenden Deckgläsern) gewonnen, ohne Berücksichtigung der gesamten Zellform. Eine ausführliche gleichzeitige Charakterisierung und Ausmessung der Polarisationsprozesse in verschiedenen T-Zell-Populationen, sowohl mit als auch ohne Ausbildung Immunologischer Synapsen und unter Beachtung der äußeren Form der T-Zellen, lag bislang nicht vor. Die Anzahl an „in vivo“-Studien in lebenden Mäusen mittels Zwei-Photonen-Mikroskopie ist sehr begrenzt und diese Methodik ist stark in der subzellulären Auflösung eingeschränkt. Ergebnisse zur Migrationsdynamik von T-Zellen in lebendem Gewebe (*Choe et al. 2022*) und artifiziellen 3D-Matrizes (*Sadjadi et al. 2020*) können mit den in dieser Arbeit gewonnenen subzellulären morphologischen Daten kombiniert werden, um die T-Zell-Polarisation in menschlichem Gewebe durch Computer-Simulationen „in silico“ nachzustellen.

Im ersten Ergebnisteil dieser Arbeit wurden umfangreiche morphologische Daten zu primären naiven und stimulierten CD8⁺ T-Zellen, der CD4⁺ T-Zelllinie Jurkat E6.1 und der adhärennten Modell-Zelllinie HeLa auf Glas-Deckgläsern zusammengetragen. Die Lokalisationsanalysen dieses Teils sind in **Abb. 43** mit einer Ergänzung aus *Campello et al. (2006)* als schematische Zeichnung zusammenfassend dargestellt.

Im zweiten Ergebnisteil dieser Arbeit wurde die Zellform- und Organell-Dynamik sowie die Dynamik des Kalziumkanals Orail1 in primären stimulierten CD8⁺ T-Zellen bzw. Jurkat T-Zellen bei der Ausbildung Immunologischer Synapsen (IS) mit Superantigen-beladenen B-Zellen im Detail charakterisiert, sowie diverse Abstände und Geschwindigkeiten berechnet. Alle Ergebnisse der durchgeführten Lokalisationsanalysen in verschiedenen Phasen der IS-Ausbildung sind mit Ergänzungen aus *Barr et al. (2008)* und *Qu et al. (2011)* in **Abb. 44** als schematische Zeichnung zusammenfassend dargestellt.

Nach einer kritischen Betrachtung der im Rahmen dieser Arbeit genutzten Methoden und den daraus ermittelten Ergebnissen werden zunächst die untersuchten T-Zelltypen untereinander, sowie mit den HeLa-Zellen im Detail verglichen. Dabei werden morphologische Unterschiede und deren mögliche Auswirkungen diskutiert. Im Anschluss wird anhand aller Ergebnisse dieser Arbeit die T-Zell-Polarisation bei der Ausbildung Immunologischer Synapsen im Vergleich mit der Fachliteratur diskutiert und ein Modell für die gesamte T-Zell-Polarisation vorgeschlagen. Abschließend wird die Nutzung der in dieser Arbeit erhobenen Daten für Computer-Modelle in Betracht gezogen.

4.1 Kritische Betrachtung der Ergebnisse

Vor der Diskussion der wesentlichen Ergebnisse dieser Arbeit werden zunächst kritische Punkte und Limitationen der eingesetzten Experiment-Methoden diskutiert und mögliche Optimierungen aufgezeigt.

Mikroskopie. Detaillierte mikroskopische Untersuchungen von T-Zellen gestalten sich durch die geringe Größe und die ausgeprägte Dynamik dieser Zellen als äußerst schwierig. Hochaufgelöste dreidimensionale Aufnahmen existieren größtenteils von zuvor fixierten T-Zellen (*Ritter et al. 2015; Stinchcombe et al. 2015; Ritter et al. 2022*). Zeitrafferaufnahmen von lebenden T-Zellen sind zumeist zweidimensional (*Beal et al. 2009; Ritter et al. 2017*) oder basieren auf schnellen Konfokal-Systemen, wie Nipkow-Scheiben, bei deren Aufnahmen häufig große Lücken im Z-Stapel zur Kompensation der Bleichrate der Fluoreszenzfarbstoffe in Kauf genommen wurden (*Ritter et al. 2015; He et al. 2019; Frazer et al. 2021*).

In der vorliegenden Arbeit wurde durch iterativ dekonvoluierte „Standard“ Epi-Fluoreszenz-Mikroskopie eine dreidimensionale Mikroskopiemethode zur Aufnahme lebender Zellen gewählt, die sowohl für die Zellen als auch für die Fluoreszenzfarbstoffe deutlich schonender ist, als konfokale Mikroskopie (*Ettinger und Wittmann 2014*). Da die Qualität der Dekonvolution von der Nähe zum „Nyquist-Kriterium“ abhängt, müssen allerdings für möglichst hochaufgelöste Epi-Fluoreszenz 3D-Aufnahmen relativ kleine Z-Schritte und hohe Objektiv-Vergrößerungen gewählt werden (*Webb und Brown 2013*). Dies führte vor allem bei Mehrkanal-Aufnahmen zu einer sehr hohen Datenmenge und relativ geringer Zellanzahl pro Experiment. Obwohl theoretisch durch den Einsatz einer EMCCD-Kamera sehr langzeitige und hochauflösende 3D-Aufnahmen möglich waren (s. **Abb. 30, 33**), wurde die praktische Aufnahmedauer durch die Kapazität der verwendeten Computerhardware und -software begrenzt. Dies führte zu Kompromissen hinsichtlich der Anzahl der Fluoreszenzkanäle, der Experimentdauer oder der zeitlichen und räumlichen Auflösung. Zur Erhöhung der Zellanzahl pro Experiment wurde so beispielsweise in Kapitel 3.2.2 eine geringere räumliche Auflösung akzeptiert. Für **Abb. 33 b** wurde zur Erhöhung der Zellanzahl und der zeitlichen Auflösung pro Kanal und Zeitpunkt nur jeweils eine einzelne Fokusebene aufgenommen, wodurch nie alle Mitochondrien pro Zelle gleichzeitig zum selben Zeitpunkt detektiert werden konnten. Zur Detektion apoptotischer Membranbläschen („Blebs“) waren hochaufgelöste Hellfeld-Bilder notwendig (s. **Abb. 32, 33 a**), zur Berechnung von Geschwindigkeiten relativ hohe zeitliche Auflösungen (s. **Abb. 42**).

Bei Einzelzeitpunkt-Experimenten konnte mittels dekonvoluierter Epi-Fluoreszenz eine Bildqualität erreicht werden, die die Qualität unbearbeiteter konfokaler Aufnahmen in Bezug auf Auflösung und

Kontrast deutlich übertraf. Die XY-Auflösung reichte aus, um auch sehr dünne Mitochondrien in lebenden Zellen in der XY-Richtung aufzulösen, die Auflösung in der Z-Richtung war dafür jedoch etwa um den Faktor 2 zu niedrig (s. **Tabelle 10, Abb. 11**). Durch die Verwendung lebender Zellen wurde unter anderem eine starke artifizielle „Aufblähung“ der Mitochondrien bei Fixierung (s. *Qin et al. 2021*) vermieden. Die schnelle, hochempfindliche Epi-Fluoreszenz-Aufnahme verminderte Artefakte, die durch das Bleichen der Fluoreszenzfarbstoffe und die Eigenbewegungen von Zellen und Organellen hervorgerufen werden.

Bei Orail-Antikörper-Färbungen und zur Maximierung der Auflösung wurden T-Zellen fixiert und mit einem Laser-Scanning-Mikroskop konfokal aufgenommen. Die iterative Dekonvolution dieser Aufnahmen führte zu Auflösungen mit Minimalwerten von 81 nm in XY-Richtung und 252 nm in Z-Richtung (s. **Tabelle 10, Abb. 11**). Selbst sehr dünne Mitochondrien konnten so auch in der Z-Dimension annähernd aufgelöst werden (s. **Abb. 28 a**). Insbesondere in der XY-Richtung sind diese Auflösungen mit modernsten „Structured-Illumination“-Mikroskopen (SIM) vergleichbar (*Fang et al. 2021*), wobei „3D-SIM“-Mikroskope noch bessere Z-Auflösungen erreichen können, als die in dieser Arbeit verwendete Methodik (*Ritter et al. 2015; Li et al. 2023*). Zur ausreichenden Auflösung des Endoplasmatischen Retikulums (ER) wären andere „Super-Resolution“-Methoden wie „STED“ vonnöten (*Hein, Willig und Hell 2008*). Die in dieser Arbeit erreichte Auflösung reichte in der XY-Richtung etwa um den Faktor 2 und in der Z-Richtung um den Faktor 7 nicht aus, um das ER vollständig aufzulösen (s. **Tabelle 10, Abb. 11, 20**).

Zelladhäsion auf Deckgläsern. Die meisten in dieser Arbeit analysierten mikroskopischen Experimente wurden auf Poly-L-Ornithin-beschichteten Deckgläsern durchgeführt. Diese Beschichtung wurde bereits in einigen Publikationen zur örtlichen Fixierung und Stabilisierung der Zellen bei Perfusions-Experimenten eingesetzt (*Hoth, Fanger und Lewis 1997; Quintana et al. 2006; Zhou et al. 2018*) und führt zu einer starken Anhaftung der Zellen an das Deckglas. Diese Anhaftung ermöglichte die in dieser Arbeit gezeigten dreidimensionalen Aufnahmen mit hoher Auflösung über lange Zeiträume. Allerdings konnten die meisten T-Zellen nach einer erfolgten Ausbreitung über das Deckglas die Kontaktfläche nur erschwert verändern oder verkleinern, sodass Zellformänderungen auch bei der Ausbildung einer Immunologischen Synapse (IS) stark beeinträchtigt wurden (s. **Abb. 14 C b, 35 b**). Dies führte zu einer artifiziellen Verlängerung der IS-Ausbildung und zur zeitlichen Separation mehrerer Polarisationsvorgänge (s. **Abb. 40 a**), die bei unbeeinträchtigter Zellformänderung fast zeitgleich stattfanden (s. **Abb. 10 a, 33 b, 34**).

Eine Migration der T-Zellen konnte bei der Nutzung von Poly-L-Ornithin-beschichteten oder unbeschichteten Deckgläsern nur bei wenigen primären CD8⁺ T-Zellen beobachtet werden (s. **Abb. 24**). Bei Beschichtung mit Fibronectin migrierte der Großteil stimulierter CD8⁺ T-Zellen über das Deckglas (s. **Abb. 16**). In anderen Studien mit CD8⁺ T-Zellen wurde rekombinantes ICAM-1 als Deckglas-Beschichtung eingesetzt, ein von Gewebezellen exprimiertes Adhäsionsmolekül, welches T-Zellen durch die Bindung mit LFA-1 voraktiviert (*Contento et al. 2010*). In den Zeitrafferaufnahmen dieser Studien führte dies zu einer hohen Mobilität der T-Zellen und schnellen Zellformänderungen bei Kontakt mit stimulierenden Zielzellen (s. **Abb. 10 a; Ritter et al. 2015; Frazer et al. 2021**). Dadurch konnten die in der vorliegenden Arbeit identifizierten unterschiedlichen Polarisationsvorgänge nicht separiert werden.

Zur Annäherung an physiologische Bedingungen, bei denen T-Zellen einer dreidimensionalen Oberfläche mit verschiedensten Proteinen wie Kollagen, VCAMs und ICAMs ausgesetzt sind, kann in Zukunft ein „Lightsheet“-Mikroskop eingesetzt werden, bei denen die zu untersuchenden Zellen zuvor in eine „3D-Matrix“ eingebettet werden können und Z-Stapel-Aufnahmen deutlich vereinfacht sind (*Power und Huisken 2017; Schoppmeyer et al. 2018*).

Betrachtete Zellpopulationen. Untersuchungen zur allgemeinen Polarisation von T-Zellen wurden in den meisten Studien mit CD4⁺ Helfer-T-Zellen, insbesondere der Zelllinie Jurkat, durchgeführt (*Campello et al. 2006; Lim et al. 2018; Cassioli et al. 2021*). Studien mit zytotoxischen CD8⁺ T-Zellen wiesen der Zell-Polarisation meistens eine reine Funktion bei der Abtötung der Zielzelle zu (*Ritter et al. 2015; Stinchcombe et al. 2015; Frazer et al. 2021*). Die Gemeinsamkeiten mit CD4⁺ T-Zellen bei der Ausbildung von Immunologischen Synapsen wurden dabei vernachlässigt. Die meisten Forschungsgruppen veröffentlichten entweder Studien über den einen oder den anderen T-Zelltyp. Aus diesem Grund wurden in dieser Arbeit neben unstimulierten („naiven“) und stimulierten humanen CD8⁺ T-Zellen auch die humane CD4⁺ T-Zelllinie „Jurkat“ morphologisch intensiv charakterisiert und mit einer nicht dem Immunsystem angehörenden Zelllinie (HeLa) verglichen.

CD8-positive T-Zellen wurden in dieser Arbeit mittels Staphylococcus Enterotoxin A (SEA) stimuliert, ohne CD8-Kostimulation (*Dohlsten et al. 1990*). Die bei dieser Stimulation entstehenden Zellpopulationen wurden in *Knorck et al. (2018)* und *Knorck et al. (2022)* intensiv bezüglich ihrer Zusammensetzung und Zytotoxizität analysiert. Die durch diese Methodik erhaltene Population aus stimulierten CD8⁺ T-Zellen besteht sowohl aus Gedächtnis- als auch Effektorzellen und beide Subtypen zeigen ein effektives Abtöten von SEA-beladenen Zielzellen (*Knorck et al. 2022*). Obwohl diese Stimulationsmethode in vielen Studien verwendet wird, ist sie nicht Antigen-spezifisch und daher vergleichsweise „unphysiologisch“.

Die in dieser Arbeit genutzte CD4⁺ T-Zelllinie Jurkat E6.1 ist die am häufigsten in Studien mit T-Zellen genutzte T-Zelllinie, weist aber einige „loss-of-function“ Mutationen (*Gioia et al. 2018*) und eine verringerte LFA-1-Expression auf, was Auswirkungen auf die Feinstruktur ausgebildeter Immunologischer Synapsen hat (*Cassioli et al. 2021*). Obwohl in den meisten in dieser Arbeit untersuchten Jurkat-Raji-Kontakten mit CD3-Färbung eine deutliche cSMAC-Akkumulation erkennbar wurde, könnten diese Unterschiede zu primären Zellen eine mögliche Erklärung für die 2-3-fach verlangsamte Polarisation im Vergleich mit primären stimulierten CD8⁺ T-Zellen sein. Der Ablauf der IS-Ausbildung und die Entstehung von Polarisationsmustern war in den Jurkat-Zellen zwar verlangsamt, entsprachen aber den Beobachtungen bei Abtötungskontakten durch stimulierte CD8⁺ T-Zellen. Um genau aufzuklären, welche Mechanismen bei der IS-Ausbildung Abtötungs-spezifisch sind, müssen Experimente mit primären SEA-stimulierten CD4-positiven T-Zellen durchgeführt werden. Eigene Voruntersuchungen mit diesen Zellen zeigten keine morphologischen Unterschiede zu den CD8⁺ T-Zellen, weder zu stimulierten noch zu unstimulierten.

Die in dieser Arbeit als Zielzellen genutzte B-Zelllinie „Raji“ erschwerte aufgrund ihres im Vergleich mit T-Zellen deutlich größeren Volumens die Aufnahme und Auswertung von Zell-Zell-Kontakten. Weiterhin konnte mit dieser Zelllinie keine stabile Transfektion durchgeführt werden (*Doktorarbeit A. Knörck 2019*).

Alternativ kann in Zukunft die Zelllinie „NALM-6“ genutzt werden, die ebenfalls MHC-II-positiv ist und somit mit Superantigenen beladen werden kann. Das Volumen dieser Zellen ähnelt dem von T-Zellen und es war möglich, sie mit einem Apoptose-Sensor-Plasmid stabil zu transfizieren (Knorck *et al.* 2022).

Der Einsatz von organischen Fluoreszenzfarbstoffen in der Lebendzell-Mikroskopie ist aufgrund der zumeist geringen Photostabilität und der mangelnden Spezifität dieser Stoffe stark limitiert. Dies erforderte in dieser Arbeit häufig die Transfektion von Fluoreszenzprotein-Sequenzen mit angefügten spezifischen Zielsequenzen (Aktin, ER, Membran, Mitochondrien) oder der Sequenz des zu untersuchenden Proteins (α/γ -Tubulin, Perforin, Orai1, STIM1). Vor allem mit primären T-Zellen, aber auch mit der Zelllinie Jurkat wurde dadurch die Anzahl verwendbarer Zellen durch die Transfektionseffizienz stark limitiert. Weiterhin ist ein möglicher Einfluss der Transfektion selbst (Zhang *et al.* 2014) oder der artifiziellen Überexpression auf das allgemeine Polarisationsverhalten nicht auszuschließen. Die Überexpression von Orai1 ohne STIM1 führte in dieser Arbeit zu einer eingeschränkten Polarisation des mEGFP-markierten Orai1 an der IS. Erst durch die gleichzeitige Überexpression von STIM1 wurde die korrekte Polarisation von Orai1 ersichtlich und eine Golgi-Akkumulation des Orai1-mEGFP größtenteils verhindert (s. **Abb. 41 b**).

Zur Färbung des Tubulin-Zytoskeletts und zur Lokalisation des Zentrosoms wurde bei Einzelzeitpunkt-Aufnahmen der auf Taxol basierende Farbstoff „TubulinTracker green“ eingesetzt, der den Abbau von Mikrotubuli verhindern kann. Trotz des Einsatzes einer möglichst geringen Konzentration und morphologischen Vergleichen mit Kontrollzellen kann ein möglicher Einfluss auf die Lokalisation des Zentrosoms v.a. bei Zellformänderung nicht ausgeschlossen werden.

Apoptose-Detektion. Während die Detektion der Zell-Nekrose relativ einfach durch den Verlust oder die Aufnahme von Fluoreszenzfarbstoffen durch die beschädigte Plasmamembran zu detektieren ist (Backes *et al.* 2018; Govendir *et al.* 2022; Knorck *et al.* 2022), benötigt die eindeutige Detektion der Zell-Apoptose beispielsweise die Verwendung des auf GFP-RFP-Förster-Resonanz-Energie-Transfer (FRET) basierenden Markers „pCasper3-GR“ (Evrogen), der als Plasmid in die Zielzellen transfiziert werden muss. Im Gegensatz zu anderen Studien kam es in der vorliegenden Arbeit nur in Experimenten mit sehr langer Kontaktdauer von über 1 Stunde zu Nekrosen. Knorck *et al.* (2022) detektierten diese bei manchen Kontakten schon nach etwa 10 Minuten. Eine stabile Transfektion von Raji-Zellen mit pCasper3-GR konnte nicht erfolgreich durchgeführt werden. Die deutlich kleinere MHC-II-positive Zelllinie „NALM-6“ konnte jedoch erfolgreich stabil mit pCasper3-GR transfiziert werden und steht für zukünftige Experimente zur Verfügung (Knorck *et al.* 2022). Allerdings konnte in Knorck *et al.* (2022) die Apoptose erst etwa ab 10 Minuten nach Kontakt durch Casper-GR detektiert werden. Das Zentrosom erreichte in der vorliegenden Arbeit und in anderen Studien innerhalb von etwa 2-3 Minuten nach Kontakt die IS. Daher wurde in dieser Arbeit das Auftreten von apoptotischen Membranbläschen („Blebs“) bei Raji B-Zellen nach dem Kontakt mit zytotoxischen T-Zellen als Apoptosemarker gewählt (s. **Abb. 3, 32, 33 a, 35 b, 36**), detektiert durch hochaufgelöste Hellfeldaufnahmen. Diese „Blebs“ konnten in seltenen Fällen bereits wenige Sekunden und im Schnitt etwa 3-4 Minuten nach Kontakt detektiert werden, unabhängig von der Position des Zentrosoms (s. **Abb. 37 a**). Die „Blebs“ waren in der Regel zu Beginn sehr klein, begannen im Verlauf der Experimente

allerdings anzuschwellen. Daher ist anzunehmen, dass bei der Detektion von großen „Blebs“ eine deutlich frühere Fusion von Lytischen Granula (LG) an der IS stattgefunden hat. Eine von der Organellpolarisation unabhängige Induktion der Apoptose durch membranständige zytotoxische Proteine wie „Fas-Ligand“ und „TRAIL“ kann in diesen kurzen Zeiträumen ausgeschlossen werden, da beide Mechanismen über 2 Stunden bis zur Detektion der Apoptose benötigten (*Doktorarbeit A. Knörck 2019*). Da die Detektion von „Blebs“ subjektiv durch Veränderungen in Hellfeld-Zeitrafferaufnahmen erfolgen musste, sollten jedoch zusätzliche Analysen durchgeführt werden, um die Aussagen weiter zu untermauern. Zukünftig wird durch Verwendung der stabilen Zelllinie „NALM-6 pCasper“ eine Kombination von „Bleb“-Detektion und Casper-FRET möglich sein und eine eindeutige Apoptosedetektion ermöglichen.

Auswertung. Eine automatisierte Auswertung der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten mikroskopischen Experimente erwies sich aus zahlreichen Gründen als äußerst schwierig. Je nach Transfektionseffizienz variierende Signalstärken von Fluoreszenzproteinen und die mit zunehmendem Abstand zum Deckglas abnehmende Qualität der Dekonvolutions-Methodik machten eine manuelle Normierung der meisten Datensätze notwendig. So musste bei 3D-Volumenmessungen und der Analyse der Mitochondrien-Fission zunächst jeder Datensatz in Bezug auf die Intensität normiert werden (s. **Abb. 20, 28, 31**). Zur Nachverfolgung einzelner Vesikel in kontaktlosen T-Zellen konnten automatisiert dreidimensionale „Tracks“ angefertigt werden (s. **Abb. 30**). Dabei erzeugte Artefakte und fehlerhafte Tracks mussten dennoch im Anschluss manuell entfernt werden. Auch die Normierung dieser Tracks zum Ausgleich der Zell-Eigenbewegung erforderte eine manuelle Durchführung.

Bei komplexen Zeitrafferaufnahmen, in denen auch mehrere verschiedene Signale im selben Fluoreszenzkanal detektiert wurden, konnte keine konsistente automatisierte Identifikation und Separation dieser Signale erreicht werden. Daher wurden dreidimensionale Z-Stapel-Aufnahmen zu zweidimensionalen Maximal-Intensitäts-Projektionen (MIP) zusammengelegt und alle identifizierten Signale manuell nachverfolgt. Mit diesen „XY-Tracks“ wurden Abstände und Geschwindigkeiten berechnet, die durch den Verlust der Z-Dimension höher sein können als in der Arbeit angegeben.

Um potenzielle Geschwindigkeiten verschiedener Zellstrukturen und Organellen zu ermitteln, wurden in dieser Arbeit Maximalgeschwindigkeiten berechnet, deren Wert von einer ausreichenden zeitlichen Auflösung abhängt. Die maximalen Geschwindigkeiten bei Migration sind aufgrund einer niedrigen Zeitauflösung von 157 Sekunden wahrscheinlich deutlich höher als in der Arbeit angegeben (s. **Abb. 42**). Einzelne Vesikel konnten bei IS-Ausbildung aufgrund der experimentellen Limitierungen nur bei geringen Geschwindigkeiten nachverfolgt werden (s. **Abb. 37 b**). Die insbesondere im Filmmaterial (**Filme 8, 9b**) zu erkennende Gesamtdynamik beider Vesikel-Populationen zeigt allerdings, dass bei IS-Ausbildung ähnlich hohe Vesikel-Geschwindigkeiten auftreten können, wie in kontaktlosen T-Zellen (s. **Abb. 30**). Die hohe Sensitivität und der weite Dynamikbereich der für **Abb. 30** genutzten EMCCD-Kamera ermöglichte die Detektion sehr schwach fluoreszierender Vesikel ohne eine Überstrahlung durch Akkumulationen. Die manuelle XYZ-Nachverfolgung von Teilen dieses Vesikel-Pools bei IS-Ausbildung (*Diplomarbeit C. Junker 2008*) ergab annähernd so hohe Vesikel-Geschwindigkeiten wie die in **Abb. 30** durchgeführte semi-automatische XYZ-Nachverfolgung von Vesikeln ohne IS-Ausbildung.

4.2 T-Zell-Polarisation auf Glas-Deckgläsern

In diesem Kapitel werden im ersten experimentellen Teil dieser Arbeit festgestellte Unterschiede in der Zell- und Organellmorphologie von HeLa-Zellen und diversen T-Zelltypen (s. **Abb. 43**), sowie deren Auswirkungen auf die Zellphysiologie diskutiert. Weiterhin wird die Dynamik von stimulierten CD8⁺ T-Zellen bei Lamellopodienbildung und Migration, sowie ihre Vesikel-Bewegungen erörtert.

Vergleich mit HeLa-Zellen. Bei der Aufklärung allgemeiner molekularbiologischer Mechanismen hat die adhärente Epithel-Zelllinie HeLa aufgrund ihrer weiten Verbreitung, einfachen Kultivierung und hohen Transfektionseffizienz stets eine wichtige Rolle gespielt. Trotz starker genetischer Veränderungen durch Humane Papillomviren (HPV) (*Adey et al. 2013*) bietet diese Zelllinie die Basis für das Verständnis allgemeiner zellbiologischer Funktionen, sei es bei inhärenter Expression oder durch artifizielle Überexpression zu untersuchender Proteine. Die im ersten experimentellen Teil dieser Arbeit durchgeführte dreidimensionale Vermessung dieser Zellen, ihrer Zellkerne und Mitochondrien und die detaillierte Analyse ihrer Organellverteilung tragen zur allgemeinen Charakterisierung dieser Zellen bei und können für zukünftige Studien mit diesem Zelltyp hilfreich sein.

Giacomello et al. detektierten im Jahr 2010 in HeLa-Zellen aus IP₃-Rezeptoren der ER-Membran entspringende Kalzium-Mikrodomänen („Hotspots“) an der Oberfläche von Mitochondrien, die beim Kalziumeinstrom durch Plasmamembran-ständige Orai-Kanäle nicht auftraten. Dieser Umstand wurde durch die enge Verbindung zwischen ER und Plasmamembran (PM) bei der Öffnung der Orai-Kanäle durch STIM-„Cluster“ und dem daraus resultierenden räumlichen Ausschluss von Mitochondrien erklärt. Studien mit der T-Zelllinie Jurkat zeigten bei ungerichteter Stimulation durch Thapsigargin eine Kalzium-Pufferwirkung von Mitochondrien bei der Aktivierung von Orai-Kanälen und die Abhängigkeit der langanhaltenden Orai-Aktivierung von der Annäherung von Mitochondrien an die PM (*Hoth, Fanger und Lewis 1997; Quintana et al. 2006*). Falls sich die Ergebnisse von *Giacomello et al. (2010)* mit HeLa-Zellen vollkommen auf T-Zellen übertragen lassen könnten, würde dies den Einfluss von Mitochondrien auf den langanhaltenden Kalziumeinstrom durch Orai-Kanäle ausschließen. Im Folgenden werden daher in dieser Arbeit festgestellte Unterschiede bei der Zellmorphologie und der Mitochondrien-Verteilung zwischen HeLa-Zellen und Jurkat T-Zellen diskutiert, die diese widersprüchlichen Ergebnisse erklären könnten.

HeLa-Zellen breiteten sich sehr flach auf Deckgläsern aus und verankerten sich durch die Ausbildung von Aktin-Stressfasern an der Oberfläche (s. **Abb. 2, 15 a, 43**). Die gesamte zum Kulturmedium gewandte Plasmamembran der meisten HeLa-Zellen wies einen dichten Mikrovilli-Besatz auf (s. **Abb. 3 b, 12 B, 43**). Mitotische (s. **Abb. 12 B iii**) und apoptotische (s. **Abb. 3 b**) HeLa-Zellen zeigten Membranfäden, die sich von der ehemaligen Kontaktfläche mit dem Untergrund zum in diesen Phasen kugelförmigen Zellkörper spannten, da die Adhäsionskontakte mit dem Untergrund nicht vollkommen von den HeLa-Zellen aufgelöst wurden. Diese starke Adhäsion an das Deckglas verhinderte schnelle Zellformänderungen, die bei einem Anteil von Jurkat T-Zellen, in Form von Lamellopodien-Ausbildung oder Abflachung zum Deckglas, festgestellt werden konnten. Der Großteil der in dieser Arbeit verwendeten Jurkat-Zellen, die auf Poly-L-Ornithin-beschichteten oder unbeschichteten Glas-Deckgläsern in „Standard“ Ringer-Lösung

aufgebracht wurden, verblieb nach dem Absetzen in der Kugelform, mit einer im Vergleich zum Zelldurchmesser kleinen Kontaktfläche (s. **Abb. 13 A, 43**). Es konnte bei Jurkat-Zellen keine Ausbildung von Aktin-Stressfasern und nur bei wenigen Zellen ein schwacher Mikrovilli-Besatz festgestellt werden. Dementsprechend ist der Anteil der Plasmamembran, an den sich das ER und Mitochondrien annähern können, bei Jurkat-Zellen deutlich höher als bei HeLa-Zellen.

Bei den in dieser Arbeit vorgenommenen Volumenmessungen von HeLa- und Jurkat-Zellen wurde ein 5-fach höheres Gesamtvolumen der HeLa-Zellen gemessen, bei deutlich geringerem relativem Zellkern-Volumen (HeLa: 32 %, Jurkat: 59 %) (s. **Abb. 31**). Demnach wiesen die HeLa-Zellen einen deutlich höheren Anteil an Zytoplasma auf, bei sehr ähnlichem relativem Mitochondrien-Volumen (HeLa: 3,8 %, Jurkat: 3,6 %). Der Großteil der Mitochondrien war in HeLa-Zellen dicht um den meist zentral gelegenen Zellkern, sowie im Inneren der Zellausläufer lokalisiert (s. **Abb. 25, 43**; *Song et al. 2008*; *Giacomello et al. 2010*) und stark mit Mikrotubuli und ER-Filamenten assoziiert. Zusätzliche Anhäufungen von Mitochondrien traten an den Enden der Zellausläufer auf. Am HeLa-Zentrosom konnten keine Akkumulationen von Mitochondrien detektiert werden. Im Gegensatz dazu wurde in allen nicht-mitotischen Jurkat-Zellen eine Akkumulation von Mitochondrien nahe des Zentrosoms angefundenes, welches sich, wie auch unter anderem in der Studie von *Lui-Roberts et al.* aus dem Jahr 2012 gezeigt, an der prominentesten Einbuchtung des Zellkerns befand (s. **Abb. 26, 43**). Weitere Mitochondrien waren in Jurkat-Zellen aufgrund des hohen Platzanspruchs des Zellkerns und des relativ kleinen Zytoplasma-Volumens nahe der PM lokalisiert, bei etwa der Hälfte untersuchter Jurkat-Zellen akkumuliert.

Zusätzlich zu Mikrotubuli, die sich um den Zellkern legten, bildeten HeLa-Zellen deutlich stärker ausgeprägte Mikrotubuli-Bündel in die Zellausläufer aus, mit daran ausgerichteten Mitochondrien (s. **Abb. 25, 43**). Der Kinesin-Transport von Mitochondrien führt in HeLa-Zellen demnach eher zu Bewegungen in die Zellausläufer. Kugelförmige Jurkat-Zellen wiesen hauptsächlich Mikrotubuli um den Zellkern auf (s. **Abb. 22, 43**), der sich aufgrund des hohen Anteils am Gesamt-Zellvolumen sehr nahe an der PM befand. Aufgrund der Zellgeometrie und der kürzeren Laufwege erreicht in Jurkat-Zellen somit schneller ein größerer Anteil der Mitochondrien die PM bei Kinesin-Transport, als in HeLa-Zellen. Durch schnelle Zellformänderungen, wie beispielsweise eine Kontraktion der PM, können zusätzlich mehr Mitochondrien in die Nähe der PM und zum Aktin-Netzwerk gebracht werden (*Quintana et al. 2009*).

Die artifizielle Fission der in Jurkat-Kontrollzellen eher länglichen und vernetzten Mitochondrien zu kleineren Fragmenten erhöhte den Anteil der Plasmamembran, der sehr nahe Mitochondrien (< 400 nm) aufwies, von etwa 8 % auf bis zu 30 %, ohne Zellstimulation durch Thapsigargin oder anti-CD3-Antikörper (s. **Abb. 28**). Dies geschah wahrscheinlich aufgrund der Dissoziation fissionierter Mitochondrien von Mikrotubuli und deren Assoziation mit dem kortikalen Aktin-Netzwerk (*Baixauli et al. 2011*), das sich in Jurkat-Zellen aufgrund der runden Zellform und des geringen Zytoplasma-Volumens sehr nah am Zellkern befindet (s. **Abb. 16**). Ähnliche Studien mit HeLa-Zellen zeigten einen Kollaps fissionierter Mitochondrien um den Zellkern, wodurch aufgrund der abgeflachten Zellform weniger Mitochondrien in der Nähe der PM verblieben als in HeLa-Kontrollzellen (*Song et al. 2008*).

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Aufnahmen des ER in Jurkat-Zellen zeigen ein auch bei Zellformänderungen gleichmäßig im gesamten Zytoplasma verteiltes Netzwerk (s. **Abb. 20, 43**). Die an der Plasmamembran (PM) festgestellten Lücken des ER erlauben eine Positionierung von Mitochondrien sehr nahe an der PM. Der Durchmesser der ER-Filamente von etwa 60 nm (*Hein, Willig und Hell 2008*) und die Konfiguration der Orai-STIM-„Cluster“ (*Baraniak et al. 2020*) sollten eine für die Kalzium-Pufferung ausreichende räumliche Annäherung von Mitochondrien an die Orai-Kanäle ermöglichen, im Widerspruch zur Einschätzung von *Giacomello et al. (2010)*. In HeLa-Zellen könnte allerdings die starke Ausbildung von Aktin-Stressfasern und Mikrovilli, sowie die Ausrichtung der Mikrotubuli die mitochondriale Annäherung an Orai-STIM-Cluster sehr unwahrscheinlich machen.

Zusammengefasst haben die aufgezeigten Unterschiede in der Zellform, dem Zytosol-Volumen, der Mikrotubuli-Ausrichtung und der Plasmamembran-Struktur zwischen HeLa-Zellen und Jurkat T-Zellen starke Auswirkungen auf das Auftreten PM-naher Mitochondrien, wodurch die widersprüchlichen Ergebnisse zwischen HeLa- und Jurkat-Zellen bezüglich der Kalzium-Pufferung von Mitochondrien beim Orai-Kalziumeinstrom (*Quintana et al. 2006; Giacomello et al. 2010*) erklärt werden könnten. Dies zeigt, dass die Zellmorphologie bei der Interpretation komplexer zellphysiologischer Vorgänge, trotz des prinzipiellen Vorhandenseins derselben Proteine und Organellen, mit in Betracht gezogen werden sollte.

Vergleich der T-Zell-Populationen. Neben HeLa-Zellen und Jurkat CD4⁺ T-Zellen wurden im ersten experimentellen Teil dieser Arbeit auch unstimulierte („naive“) und mittels SEA stimulierte primäre CD8⁺ T-Zellen von gesunden menschlichen Blutspendern ausgemessen und charakterisiert. Diese Experimente wurden zur Vergleichbarkeit auch auf Poly-L-Ornithin-beschichteten oder unbeschichteten Glas-Deckgläsern und in „Standard“ Ringer-Lösung durchgeführt. Alle untersuchten T-Zell-Populationen wiesen, im Gegensatz zu HeLa-Zellen, Akkumulationen von Mitochondrien und endozytierten Vesikeln am Zentrosom auf (s. **Abb. 25, 26, 27, 43**), das sich in nicht-migrierenden T-Zellen und etwa der Hälfte migrierender T-Zellen an der größten Zellkern-Einbuchtung befand (s. **Abb. 22, 23, 43**). Nach einer, in allen T-Zell-Populationen ähnlich häufig auftretenden, Abflachung auf dem Deckglas war das Zentrosom mit den Organell-Akkumulationen und der Zellkern-Einbuchtung in den meisten T-Zellen zum unspezifischen Adhäsionskontakt mit dem Deckglas orientiert (s. **Abb. 23 a, 43**), wobei sich das Zentrosom zumeist in unmittelbarer Nähe zum Deckglas befand. Ein zusätzlicher Kontakt mit weiteren T-Zellen führte zu einer Annäherung des Zentrosoms an den Zell-Zell-Kontakt. Die Bindung von LFA-1 an ICAM-1, das auch von T-Zellen exprimiert wird (*Contento et al. 2010*), führt demnach wahrscheinlich zu einer stärkeren Attraktion des Zentrosoms als der unspezifische Adhäsionskontakt mit dem Deckglas.

Fast ausschließlich bei Experimenten mit stimulierten primären T-Zellen nahm ein Anteil der Zellen die Migrationsform an (s. **Abb. 14, 15, 43**), allerdings wurde die Migration durch die Anhaftung am Deckglas stark beeinträchtigt. Einige wenige Zellen konnten in Experimenten mit Kulturmedium und FCS trotz der Beschichtung mit Poly-L-Ornithin migrieren (s. **Abb. 24 b**). Bei allen untersuchten T-Zelltypen kam es zur Bildung von Lamellopodien in das Medium, stimulierte primäre Zellen streckten durch die Verschiebung des Zellkerns ihren Zellkörper in das Medium aus und nahmen so ebenfalls die Migrationsform an, wobei

das Zentrosom am Deckglas verblieb (s. **Abb. 24 a, 43**). In Experimenten mit Fibronectin-beschichteten Deckgläsern begann der Großteil stimulierter primärer T-Zellen auf dem Deckglas zu migrieren (s. **Abb. 18**, nicht gezeigte Experimente). In anderen Studien mit Jurkat T-Zellen auf Fibronectin-beschichteten Deckgläsern in Kulturmedien mit FCS breiteten sich diese Zellen größtenteils auf dem Deckglas aus und begannen teilweise zu migrieren (*Backes et al. 2018*). *Campello et al.* nutzten im Jahr 2006 Jurkat-Zellen auf Fibronectin-beschichteten Deckgläsern, die zur Induktion der Migrationsform mit Chemokinen inkubiert wurden. In den Experimenten der vorliegenden Arbeit nahmen Jurkat-Zellen die Migrationsform im Gegensatz zu stimulierten primären T-Zellen nicht an (s. **Abb. 15**). Dieser Unterschied zwischen Zelllinie und primären Zellen könnte durch die vielen bekannten Mutationen der Jurkat-Zelllinie (*Gioia et al. 2018*) und/oder durch einen unterschiedlichen Effektor-Status verursacht werden.

Primäre unstimulierte („naive“) T-Zellen konnten in diesen Experimenten nur sehr selten die Migrationsform annehmen und verhielten sich bezüglich der Zellform-Dynamik ähnlich wie Jurkat T-Zellen (s. **Abb. 15**). Das relative Zellkern-Volumen naiver T-Zellen entsprach dem der Jurkat-Zellen mit etwa 60 % (s. **Abb. 31**). Naive T-Zellen wiesen häufiger sekundäre Akkumulationen und eine größere Verteilung endozytierter Vesikel auf als Jurkat-Zellen oder primäre stimulierte T-Zellen (s. **Abb. 29**).

Die SEA-Stimulation von solchen naiven T-Zellen führte zu einer 3,3-fachen Volumenzunahme und im Vergleich mit Jurkat-Zellen oder naiven primären T-Zellen zu einem Anstieg des relativen Zytoplasma-Volumens, bei leichter Abnahme des relativen Mitochondrien-Volumens (s. **Abb. 31**). Die Mitochondrien SEA-stimulierter T-Zellen waren stärker vernetzt und gleichmäßiger verteilt (s. **Abb. 26**). Endozytierte Vesikel wurden im Vergleich mit naiven primären T-Zellen eher am Zentrosom konzentriert (s. **Abb. 29**). Ebenfalls wurden Zellformänderungen in die Migrationsform nach der SEA-Stimulation deutlich häufiger (s. **Abb. 15**).

Jurkat-Zellen ähnelten in Bezug auf morphologische Eigenschaften und relative Organellanteile eher naiven als stimulierten primären T-Zellen, trotz höherem Zell- und Organellvolumen. Ein weiterer Aspekt, der für die Ähnlichkeit der verwendeten Jurkat E6.1 T-Zellen mit naiven T-Zellen spricht, ist eine im Vergleich mit primären Effektorzellen geringe LFA-1-Expression, die zu einer schwächer ausgeprägten Zellformdynamik führen sollte (*Cassioli et al. 2021*). Da die Morphologie und die Dynamik von Jurkat T-Zellen eher der von naiven anstatt von stimulierten primären T-Zellen entspricht, kann die häufige Bezeichnung von Jurkat-Zellen als „Effektor“-T-Zellen in Frage gestellt werden.

Die von *Campello et al. (2006)* gezeigte Ausbreitung des ER durch das gesamte Zellinnere von Jurkat-Zellen, auch bei Zellformänderung, konnte in der vorliegenden Arbeit mit deutlich höherer Auflösung bestätigt werden (s. **Abb. 20, 43**). Demnach können T-Zellen in allen Zellformen durch die räumliche Nähe des ER an ihrer gesamten Plasmamembran Orai-STIM-„Cluster“ ausbilden. Die in derselben Studie gezeigte Akkumulation von Mitochondrien am Uropod Chemokin-stimulierter Jurkat-Zellen in der Migrationsform wurde in der vorliegenden Arbeit bei primären T-Zellen in der Migrationsform nachgewiesen, bei stimulierten primären T-Zellen mit zusätzlicher Verteilung einzelner Mitochondrien bis zum „Leading Edge“ (s. **Abb. 27, 43**).

Bewegungs- und Organell-Dynamik stimulierter CD8⁺ T-Zellen. Im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte Zeitrafferaufnahmen von primären stimulierten CD8⁺ T-Zellen zeigten starke dynamische Zellformänderungen mit Ausbreitungsgeschwindigkeiten von bis zu 800 nm/s durch die Bildung von Lamellopodien an Aktin-Akkumulationen und die anschließende Ausbreitung des filamentösen Aktins (s. **Abb. 16 c, Film 1**). Nach der Rückbildung von Lamellopodien verblieben mobile intrazelluläre Aktin-Akkumulationen, die zuvor noch nicht in der Literatur dokumentiert wurden. Ebenso kam es auch zur „Ausstreckung“ in die auf dem Deckglas beobachtete Migrationsform in das Kulturmedium durch Verschiebung des Zellkerns in ein Lamellopodium (s. **Abb. 24 a, 43**). Das Zentrosom blieb dabei wie bei abgeflachten Zellen (s. **Abb. 23**) am unspezifischen Adhäsionskontakt mit dem Deckglas. Bei Migration auf dem Deckglas bewegte sich das Zentrosom zwischen Zellkern und Uropod, wobei es durchgehend in der Nähe der Deckglas-Kontaktfläche verblieb (s. **Abb. 24 b, 43**). Das Zentrosom präferiert demnach die Nähe zu Adhäsionskontakten, ähnlich wie bei der Ausbildung Immunologischer Synapsen (s. Kapitel 4.3). Bei der Untersuchung der PM-nahen Aktin-Dynamik in migrierenden primären T-Zellen konnte die Bildung zweier Aktin-Akkumulationspole zur Ausbildung von Lamellopodien gezeigt werden (s. **Abb. 18, 43**). Die Dynamik dieser Ausläufer wurde zuvor bei der dreidimensionalen Migration von T-Zellen durch Kollagen-Matrizes mit niedriger Auflösung beschrieben (*Schoppmeyer et al. 2017*). Die in der vorliegenden Arbeit gezeigte hohe Auflösung am Deckglas durch TIRF könnte z.B. genutzt werden, um den Einfluss von „Profilin-1“ auf die Richtungsfindung, durch Aktin-Ausbreitung im dominierenden Akkumulationspol und Elimination des schwächeren Akkumulationspols, abzuklären. Im Gegensatz zu Untersuchungen auf ICAM-1-beschichteten Deckgläsern, bei denen der Uropod während der gerichteten Migration vom Deckglas abstand (*Ritter et al. 2015; Film 14: 0'00''-0'45''*), haften auf Fibronectin-Deckgläsern migrierende T-Zellen fast vollkommen auf dem Deckglas (**Abb. 18**). Der Ablauf der Lamellopodienbildung und der anschließenden Migration war in beiden Arbeiten allerdings sehr ähnlich.



Film 14

youtu.be/jLCNwHxpNzg

Alex T. Ritter
ASCB Celldance
2014 Video

Die in dieser Arbeit zur Nachverfolgung von Lytischen Granula (LG) und endozytierten CD3-Vesikeln optimierten Experimente mit primären stimulierten CD8⁺ T-Zellen bei 25°C zeigten neben einer reinen Zentrosom-Akkumulation der LG in allen untersuchten Zellen auch „Paare“ von LG und endoCD3-Vesikeln wie in *Qu et al. (2011)* und sehr hohe Maximalgeschwindigkeiten einzelner Vesikel von bis zu 2200 nm/s (s. **Abb. 30**). Eine große Anzahl nachverfolgter LG und endoCD3-Vesikel wies dabei Durchmesser von unter 250 nm auf und war im Vergleich mit den Vesikel-Akkumulationen am Zentrosom sehr leuchtschwach. Die im Vergleich zu anderen Studien (*Ritter et al. 2015; Doktorarbeit C.S. Backes 2016*) deutlich höher gemessenen Maximalgeschwindigkeiten konnten nur durch die hohe Sensitivität der eingesetzten EMCCD-Kamera und die hohe zeitliche Auflösung dieser Aufnahmen (~3-6 s) detektiert werden. Die deutlich niedrigeren Durchschnittsgeschwindigkeiten von etwa 250 nm/s entstanden durch häufige Intervalle ohne Bewegung insbesondere bei Vesikeln, die länger als 60 Sekunden nachverfolgt werden konnten. Beide untersuchten Vesikelarten konnten sich demnach selbst bei verringerter Temperatur innerhalb von etwa 10-30 Sekunden durch das gesamte Zellinnere der T-Zellen bewegen.

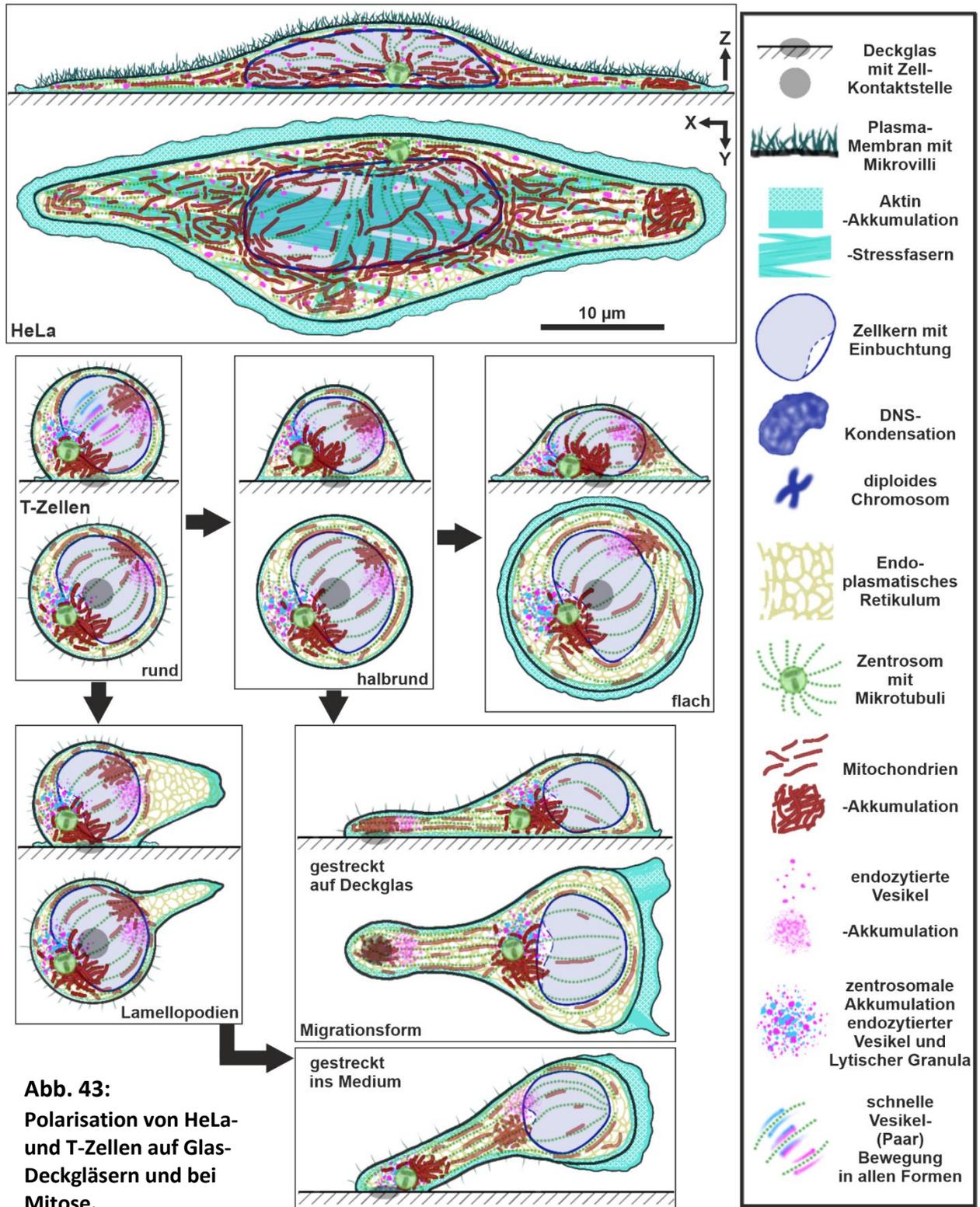
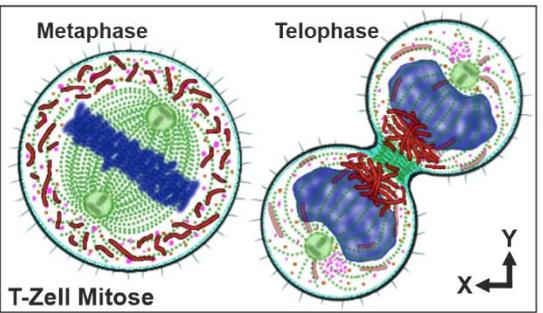


Abb. 43:
Polarisation von HeLa- und T-Zellen auf Glas-Deckgläsern und bei Mitose.

Schematische Darstellung aller morphologischen Ergebnisse für HeLa- und T-Zellen aus Kapitel 3.1 und ER-Lokalisation in gestreckten T-Zellen aus *Campello et al. (2006)*. Gezeigt sind die am häufigsten detektierten Positionen aller in der Legende aufgeführten Zellbestandteile für adhärenzte HeLa-Zellen sowie T-Zellen in der „runden“, „halbrunden“ und „flachen“ Zellform, bei Lamellopodienbildung und „Ausstreckung“ in das Kulturmedium und bei „Ausstreckung“ auf dem Deckglas als XY- und XZ-Ansicht und für T-Zellen in der Meta- und Telophase der Mitose als XY-Ansicht. Eine höhere Transparenz einzelner Elemente deutet eine geringere Auftretens-Wahrscheinlichkeit an. In stimulierten CD8⁺ T-Zellen wurde in allen nicht-mitotischen Zellformen ein schneller Plus- und Minus-End Mikrotubuli-Transport von Lytischen Granula und endozytierten Vesikeln, auch von „Paaren“ dieser Vesikel, detektiert.



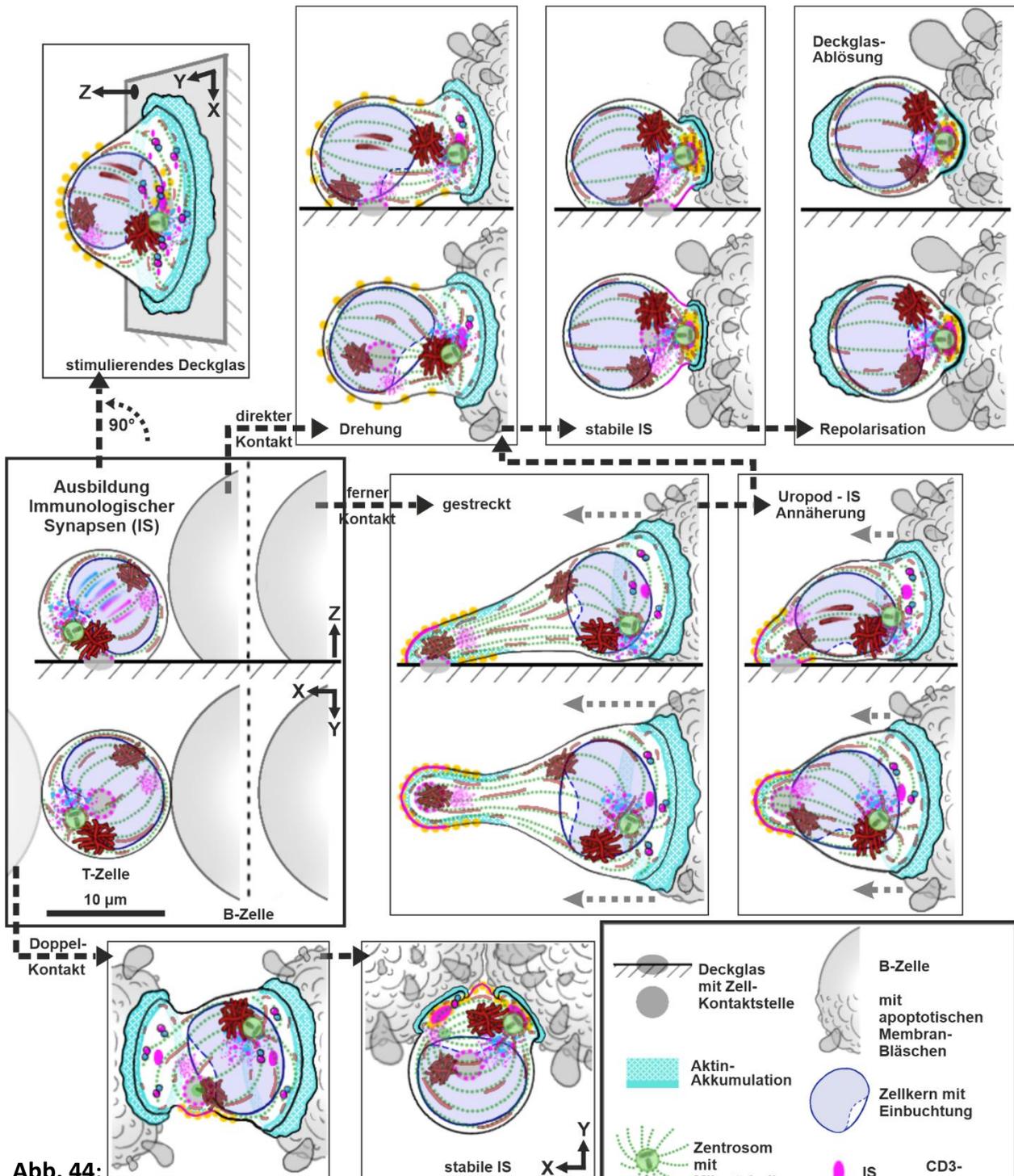


Abb. 44: Polarisation von auf Glas-Deckgläsern adhärennten T-Zellen bei der Ausbildung Immunologischer Synapsen.

Schematische Darstellung aller morphologischen Ergebnisse aus Kapitel 3.2 mit Ergänzung von „Paaren“ aus endozytierten CD3-Vesikeln und Lytischen Granula (LG) an der Immunologischen Synapse (IS) (Qu *et al.* 2011) und der Position von Orai1-STIM1-„Clustern“ beim Einsatz stimulierender Deckgläser (Barr *et al.* 2008). Gezeigt sind die am häufigsten detektierten Positionen aller in der Legende aufgeführten Zellbestandteile bei IS-Ausbildung mit „nahem“ bzw. „fernem“ („gestrecktem“) Kontakt bis zur Deckglas-Ablösung als XY- und XZ-Ansicht, sowie beim Kontakt mit zwei Zielzellen als XY-Ansicht und Kontakt mit einem stimulierenden Deckglas als XZ-Ansicht. Bei fernem Kontakt und fester Uropod-Anhaftung wurde die B-Zelle zum T-Zell-Uropod herangezogen (graue Pfeile). Eine höhere Transparenz einzelner Elemente deutet eine geringere Auftretswahrscheinlichkeit an. In allen Phasen konnte ein schneller Plus- und Minus-End Mikrotubuli-Transport von Lytischen Granula und endozytierten Vesikeln detektiert werden, auch „gepaart“ (Qu *et al.* 2011). Einzelne Mitochondrien begannen schnelle Bewegungen wenige Minuten nach Kontaktbildung.

4.3 T-Zell-Polarisation bei Ausbildung Immunologischer Synapsen

In diesem Kapitel wird die im zweiten experimentellen Teil dieser Arbeit analysierte Zellform- und Organellpolarisation von primären SEA-stimulierten CD8⁺ T-Zellen und Jurkat CD4⁺ T-Zellen bei der Ausbildung von Immunologischen Synapsen (IS) mit Superantigen-beladenen Raji B-Zellen (s. **Abb. 44**) erörtert. Weiterhin wird die Möglichkeit einer „parallelen“ Abtötung von Zielzellen, ohne Notwendigkeit der Zentrosombewegung zur IS, diskutiert.

T-Zell-Formänderung bei IS-Ausbildung. Die meisten in dieser Arbeit untersuchten T-Zellen im Kontakt mit Superantigen-beladenen B-Zellen bildeten direkt nach dem Kontakt sich auf der Oberfläche der B-Zelle ausbreitende Kontaktflächen aus. Wurden die T-Zellen nicht durch den Kontakt mit dem Deckglas und anderen T-Zellen im Kontakt mit derselben B-Zelle beeinträchtigt, kontrahierte im späteren Verlauf der Kontaktbildung die Kontaktfläche und die T-Zellen nahmen eine relativ runde Zellform an, mit dem Zellkern von der Kontaktstelle abgewandt und der Zellkern-Einbuchtung zur IS orientiert. Diese in der vorliegenden Arbeit als „stabile IS“ bezeichnete Zellform entsprach dem von *Babich und Burkhardt (2013)* als „ausgereifte“ („mature“) Immunologische Synapse beschriebenen Kontaktzustand. In Studien mit hochaufgelösten LSM- oder Elektronenmikroskopie (EM)-Aufnahmen fixierter Zell-Zell-Kontakte wurden die T-Zellen und die Zielzellen in Suspension zusammen für 5-30 Minuten vorinkubiert, sodass die meisten T-Zellen in diesen Aufnahmen ebenfalls diese runde Zellform aufwiesen (*Stinchcombe et al. 2006; Lui-Roberts et al. 2012; Ritter et al. 2015; Stinchcombe et al. 2015; Frazer et al. 2021*).

Die starke Adhäsion der T-Zellen an Poly-L-Ornithin-beschichtete Deckgläsern führte in der vorliegenden Arbeit zu einem Heranziehen der B-Zelle zur Deckglas-Kontaktstelle der T-Zelle. Der genaue Verlauf und die Dauer dieses Prozesses hingen vom Abstand zwischen T- und B-Zelle und der Bewegungsfreiheit der B-Zelle ab (s. **Abb. 44**). Durch die Annäherung der Deckglas-Kontaktstelle an die IS nahmen die T-Zellen die zuvor beschriebene runde Zellform der „stabilen IS“ an (s. **Abb. 32 i ii, 33, 35 a, 38 a, 44**). Aufgrund der starken Anhaftung der T-Zellen an die verwendeten Deckgläser und der Anwesenheit mehrerer T-Zellen im Kontakt mit derselben B-Zelle konnten einige Zellen diesen Formänderungs-Prozess nicht vollständig abschließen (s. **Abb. 32 iii, 35 b, 38 b**). In seltenen Fällen konnten sich SEA-stimulierte CD8⁺ T-Zellen während des Zell-Zell-Kontakts vom Deckglas lösen und nahmen schneller als haftende Zellen eine runde Form mit kleiner Kontaktfläche zur Zielzelle an (s. **Abb. 33 b, 34, 44**). In allen durchgeführten Experimenten mit Superantigen-beladenen B-Zellen bildete eine einzelne T-Zelle Kontakte mit fast allen berührten B-Zellen aus. Auch bei diesen Mehrfachkontakten strebten die T-Zellen die Zellform einer stabilen IS an (s. **Abb. 36, 39, 44**). In anderen Lebendzell-Studien, bei denen das Deckglas mit dem LFA-1 Bindepartner ICAM-1 beschichtet wurde, zeigten die T-Zellen durch die LFA-1 Voraktivierung (*Contento et al. 2010*) schnelle Formänderungen von der Migrationsform zur runden IS-Zellform mit relativ schwacher Beeinträchtigung durch die Bindung an das Deckglas (s. **Abb. 10 a, Ritter et al. 2015; Frazer et al. 2021**). Mehrfachkontakte wurden in diesen Studien allerdings nicht gezeigt oder ausgewertet.

Hochaufgelöste Aufnahmen der Feinstrukturen Immunologischer Synapsen sind mithilfe von speziell behandelten Deckgläsern und dem Einsatz der TIRF-Mikroskopie in großer Anzahl, sowohl mit der

T-Zelllinie Jurkat als auch primären CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen, durchgeführt worden (*Beal et al. 2009; Qu et al. 2011; Quintana et al. 2011; Ashdown et al. 2017; Ritter et al. 2017*). Die Notwendigkeit, für TIRF das Deckglas als Ziel-Oberfläche nutzen zu müssen, bringt allerdings einige Beschränkungen mit sich. Bei der Nutzung Antikörper-beschichteter Deckgläser führen die immobilen Antikörper zu einer artifiziellen Musterbildung durch die räumliche Fixierung Antikörper-gebundener Membranbausteine der T-Zellen. Um diesem Effekt entgegenzuwirken, können Deckgläser mit artifiziellen Membranen („Supported Lipid Bilayer“, SLB) beschichtet werden, in welche Antikörper oder Zielzell-Proteine mobil eingebunden werden können. Dennoch kommt es auch beim Einsatz dieser Methodik vor allem bei schwacher LFA-1-Expression zu einer gestörten Ausformung von „ausgereiften“ membranständigen IS-Strukturen (*Cassoli et al. 2021*). Die stärkste Beeinträchtigung erfahren T-Zellen mit dem Deckglas als Zieloberfläche im Vergleich mit der Zielzellmethodik bei der Zellformänderung. Auf dem Deckglas kommt es fast ausschließlich zu einer reinen Ausbreitung der Zellen ohne anschließende Annahme einer runden Zellform durch die Kontraktion der IS-Fläche. Die Zellform der auf stimulierenden Deckgläsern ausgebreiteten T-Zellen entspricht der im ersten Ergebnisteil dieser Arbeit auf Poly-L-Ornithin-beschichteten Deckgläsern gezeigten „flachen“ Zellform (s. **Abb. 14, 43**). Ohne Stimulation, z.B. durch Antikörper-Beschichtung des Deckglases, benötigte die Ausbildung dieser Zellform allerdings deutlich länger. Die Auswirkungen der beeinträchtigten Zellformänderung bei der Nutzung stimulierender Deckgläser zeigen sich z.B. bei der Lokalisation von Orail-STIM1-„Clustern“, die in diesem Versuchsaufbau in Zellbereichen abseits des Deckglases akkumulierten (*Barr et al. 2008*). In Experimenten mit Zielzellen akkumulierten diese Cluster wie in der vorliegenden Arbeit zunächst am Uropod und wurden anschließend zur IS transportiert (s. **Abb. 41, 44; Barr et al. 2008; Quintana et al. 2011). Es ist demnach wichtig zu beachten, dass beim Einsatz von stimulierenden Deckgläsern zumeist nur ein Zwischenzustand in der IS-Ausbildung erreicht wird und eine korrekte „Ausreifung“ der IS, mit vollständiger Polarisation, stark beeinträchtigt wird.**

Durch die Beschichtung der in Lebendzell-Experimenten genutzten Deckgläser mit ICAM-1 konnten *Ritter et al. (2015)* zeigen, dass zytotoxische T-Zellen nach der Annahme der runden Zellform einer „stabilen IS“ und der Ausbildung von apoptotischen Membranbläschen durch die Zielzelle wieder die Migrationsform annahmen, um weitere Zielzellen suchen und abtöten zu können. Diese Polarisationsumkehr dauerte etwa zwischen 20 und 40 Minuten. In der vorliegenden Arbeit zeigten nur diejenigen T-Zellen diese Umkehr, die sich zuvor von Poly-L-Ornithin-beschichteten Deckgläsern lösen konnten. Ohne Ablösung wurde der Kontaktpunkt mit dem Deckglas (Uropod) möglichst nahe an die IS gebracht und die stabile IS-Zellform dauerhaft aufrechterhalten (s. **Abb. 44**). Strukturen des (ehemaligen) Uropods müssen demnach vollständig an die IS gebracht werden, damit die Polarisationsumkehr der T-Zelle durchgeführt werden kann.

Zytoskelett-Dynamik und Zentrosom-Lokalisation bei IS-Ausbildung. Bei der IS-Ausbildung breiten sich T-Zellen auf der Zielzelle zunächst durch die Ausbildung eines „Aktin-Rings“ aus. Beim Übergang von der Migrationsform zur runden Zellform einer stabilen IS verkleinerte sich in dieser Arbeit (s. **Abb. 35, 38, 44**) und anderen Studien mit Zielzellen (*Quintana et al. 2011; Ritter et al. 2015*) sowohl der Durchmesser dieses Rings als auch der Aktin-Akkumulation. Dabei konnte in zytotoxischen T-Zellen ein

Rückfluss des Aktins von der IS zum Uropod mit schwacher Lamellopodienbildung nachgewiesen werden (Ritter *et al.* 2015). Die Geschwindigkeiten dieser Lamellopodien war vergleichbar mit der im ersten experimentellen Teil der vorliegenden Arbeit gemessenen Ausstreckungsgeschwindigkeit zytotoxischer T-Zellen in das Kulturmedium (s. **Abb. 17**). Im zweiten experimentellen Teil dieser Arbeit konnten bei zytotoxischen T-Zellen, die durch die Anhaftung am Deckglas stark in ihrer Formänderung beeinträchtigt waren, Aktin-„Wellen“ beobachtet werden, die vom Uropod ausgehend in Richtung IS wanderten, während die Zellen versuchten, ihren Uropod zurückzubilden (s. **Abb. 35 b**). Daher kann spekuliert werden, dass die Polarisationsumkehr der T-Zelle durch einen Richtungswechsel des Aktin-Flusses induziert wird und eine Balance zwischen beiden Flussrichtungen die IS stabilisiert. In Experimenten mit anti-CD3-Antikörperbeschichteten Deckgläsern akkumulierte das Aktin-Netzwerk zytotoxischer T-Zellen nach dem Rückzug des Zentrosoms von der Plasmamembran erneut über der gesamten Kontaktfläche mit dem Deckglas (Ritter *et al.* 2015; Ritter *et al.* 2017). In der vorliegenden Arbeit konnte eine Rückbildung des Aktin-Rings bei Zielzell-Kontakt ohne eine Ablösung der T-Zelle vom Deckglas nicht festgestellt werden. Dieser Umstand könnte dadurch erklärt werden, dass Zellbestandteile, die an das Deckglas gebunden sind, zuerst die IS erreichen müssen, bevor eine vollständige Polarisationsumkehr durchgeführt werden kann.

Die Ausdünnung des Aktin-Netzwerks im Inneren des Aktin-Rings ist eine Voraussetzung für die Akkumulation von Dynein-Motorproteinen an der Plasmamembran, deren Interaktion mit Mikrotubuli das Zentrosom bei der Ausbildung einer IS dorthin bewegen (Yi *et al.* 2013; Lim *et al.* 2018; Sanchez, Liu und Huse 2019). Ein dünnes Aktin-Netzwerk ist auch notwendig für die Sekretion von Vesikeln mittels LFA-1, welches über „Talin“ an das Aktin-Netzwerk bindet (Wang *et al.* 2022). In den untersuchten Mehrfachkontakten dieser Arbeit bildete sich an jeder Kontaktstelle ein Aktin-Ring mit zentraler Aktin-Ausdünnung aus (s. **Abb. 36, 39, 44**). Es konnte kein Unterschied in der Aktin-Dynamik zwischen mehreren Kontaktstellen festgestellt werden. Das Zentrosom verblieb in etwa zwei Drittel der Fälle am zuerst ausgebildeten Kontakt. Die Position des Zentrosoms wird in diesen Fällen wahrscheinlich von der höchsten Konzentration von membranständigem Dynein bestimmt, die unter anderem von der Stärke des T-Zell-Rezeptor-Signals abhängt (Sanchez, Liu und Huse 2019). Die Dynamik des Zentrosoms bei Mehrfachkontakten wurde zuvor nur theoretisch durch Computer-Modellierung charakterisiert (Hornak und Rieger 2022), Experimente mit realen Zellen wurden noch nicht veröffentlicht.

In fast allen Einzelkontakten zwischen T-Zellen und Superantigen-beladenen B-Zellen, die in dieser Arbeit untersucht wurden, bewegte sich das Zentrosom innerhalb der ersten Minuten der Kontaktbildung in die Nähe der Kontaktstelle. Dies geschah auch bei starker Beeinträchtigung der Zellformänderung, allerdings langsamer und mit größerem Endabstand zur IS (s. **Abb. 35 b**). Bei Ausbildung einer „stabilen IS“ entsprachen Geschwindigkeit und Endposition des Zentrosoms Untersuchungen auf ICAM-1-beschichteten Deckgläsern mit relativ unbeeinträchtigter Zellformänderung (Ritter *et al.* 2015). Neuere Untersuchungen derselben Arbeitsgruppe mit unterschiedlich stark stimulierenden Liganden zeigten eine deutlich seltenere Polarisation des Zentrosoms zur IS (Frazer *et al.* 2021). Selbst mit dem stärksten Liganden konnte das Zentrosom in der Studie von Frazer *et al.* (2021) innerhalb von 40 Minuten nur bei einem Drittel der untersuchten T-Zellen „in der Nähe“ der IS ($< 5 \mu\text{m}$) und bei etwa 18 % sehr nahe an der IS ($< 1 \mu\text{m}$)

detektiert werden, trotz ICAM-1-Beschichtung der Deckgläser. Die in der vorliegenden Arbeit genutzte Superantigen-Stimulation führt demnach zu einer relativ starken Polarisation des Zentrosoms zur IS.

Einige γ -Tubulin-EGFP transfizierte T-Zellen zeigten neben einem starken Zentrosomsignal weitere punktförmige γ -Tubulin-Akkumulationen. Dabei könnte es sich um sekundäre Zentriolen handeln, die in der Arbeit von *Stinchcombe et al. (2015)* durch Elektronenmikroskopie (EM) in zytotoxischen T-Zellen nachgewiesen wurden. Diese sekundären γ -Tubulin-Signale bewegten sich bei Einzelkontakt mit dem Uropod zur IS und bei Doppelkontakt zu der Kontaktstelle ohne Zentrosom. Die genaue Aufklärung ihrer Funktion erfordert allerdings weitere Untersuchungen.

Organell-Dynamik bei IS-Ausbildung. Die bereits im ersten experimentellen Teil dieser Arbeit in kontaktlosen T-Zellen identifizierten zentrosomalen Akkumulationen von Mitochondrien, endozytierten CD3-Vesikeln und Lytischen Granula wurden bei IS-Ausbildung durch die Bewegung des Zentrosoms zusammen mit dem Golgi-Apparat in die Nähe der IS gebracht (s. **Abb. 33, 34, 35, 38, 44**), wie es auch in anderen Studien beobachtet werden konnte (*Kupfer und Dennert 1984; Kupfer et al. 1986; Baixauli et al. 2011; Qu et al. 2011; Ritter et al. 2015*). Zusätzlich zu diesen zentrosomalen Akkumulationen konnten weitere Akkumulation von Mitochondrien und endozytierten Vesikeln detektiert und nachverfolgt werden, deren Dynamik stark von der äußeren Form der T-Zelle und der Adhäsion am Deckglas abhing. Bei unvollständiger IS verblieben diese sekundären Akkumulationen vorwiegend am Uropod und/oder dem Zellkern, während sie sich bei der Annahme der Zellform einer „stabilen IS“ mit der größten Zellkern-Einbuchtung und dem ehemaligen Uropod zur IS orientierten (s. **Abb. 33, 35, 38, 44**).

Einzelne Mitochondrien konnten in den primären stimulierten T-Zellen, die innerhalb dieser Arbeit untersucht wurden, während der gesamten Kontaktdauer sehr nah und zentral an der IS detektiert werden (s. **Abb. 33, 44**), wo sie durch die Pufferung von Kalzium-Mikrodomänen in der Nähe von Orai-STIM-„Clustern“ ein höheres und länger anhaltendes zytosolisches Kalziumsignal bewirken können (*Quintana et al. 2011*). Elektronenmikroskopische Aufnahmen zeigen die direkte Nähe von Mitochondrien zur IS (s. **Abb. 10 b ii, Stinchcombe et al. 2015**). Ebenso konnten einzelne Mitochondrien in ständiger Bewegung zu und von den Rändern der Kontaktfläche („dSMAC“) nachverfolgt werden (s. **Abb. 33 a**), wo sie laut *Baixauli et al. (2011)* zur ATP-Versorgung von Myosin-Motorproteinen benötigt werden, die CD3-„Mikrocluster“ zum Zentrum der IS („cSMAC“) transportieren und damit die Signalstärke und den Kalziumeinstrom verringern können. Bei unvollständiger IS befand sich der Großteil der Mitochondrien nicht direkt an der IS oder an den sekundären Akkumulationspunkten (s. **Abb. 33 b, 44**). Dies entspricht den von *He et al. (2019)* gezeigten Ergebnissen, bei denen nur die maximale mitochondriale Fluoreszenz automatisiert lokalisiert wurde, ohne Berücksichtigung der äußeren Form der T-Zellen (**Abb. 45**).

Im Rahmen dieser Arbeit konnte in Jurkat T-Zellen eine Assoziation zwischen membranständigen Orai1-Akkumulationen und Mitochondrien-Akkumulationen gezeigt werden, die bei der Annahme der stabilen IS-Zellform zusammen zur IS bewegt wurden (s. **Abb. 38 a, 40 c**). Orai1-STIM1-„Cluster“ akkumulierten bei unvollständiger IS ebenfalls größtenteils zunächst an der Kontaktfläche mit dem Deckglas bzw. dem Uropod (s. **Abb. 41, 44**). Nur bei stabiler IS-Zellform akkumulierten diese Cluster

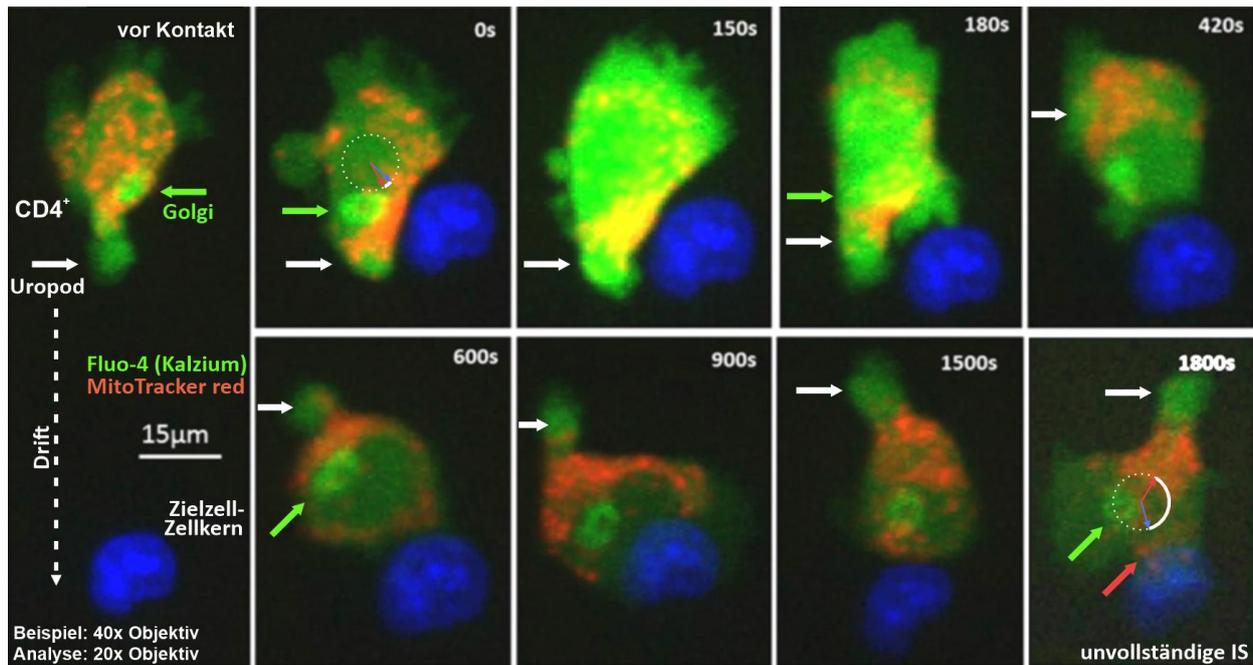


Abb. 45: Unvollständige IS-Ausbildung in der repräsentativen Beispielaufnahme zur Mitochondrien-Dynamik bei IS-Ausbildung aus He et al. (2019) (Abbildung 4 a).

Konfokale Z-Stapel-Zeitrafferaufnahme (3 µm Z-Abstand, 30 s Zeitauflösung) einer Hybridoma-T-Zelle (Zelllinie 1B6), gefärbt mit dem Kalziumsensor Fluo-4 (grün) und MitoTracker red (Mitochondrien, rot), beim, durch kontrollierten Fluss des Kulturmediums eingeleiteten, Kontakt mit einer Hoechst 33342-gefärbten stimulierenden Zielzelle (Zellkern, blau). Der Golgi-Apparat und innerhalb dessen das Zentrosom sind bei geringer intrazellulärer Kalziumkonzentration durch die Fluo-4-Färbung erkennbar (grüner Pfeil) und entfernen sich ab 420 Sekunden (s) nach Kontakt und dem Abfall der Kalziumkonzentration von der Kontaktfläche. Der Uropod der T-Zelle wird im gesamten Experimentverlauf nicht zurückgebildet (weißer Pfeil). An der IS können durchgehend Mitochondrien nachgewiesen werden (roter Pfeil, **Film 15**). Zur automatisierten Auswertung des Abstandes von Mitochondrien und IS wurde von He et al. (2019) der Winkel zwischen Zielzell-Zellkern und höchster Mitochondrien-Fluoreszenz bestimmt, wie bei 0 s und 1800 s gezeigt (weißer Kreis in Zellmitte). **Maßstabsbalken: 15 µm**
Film 15: journals.aai.org/jimmunol/article-supplement/107401/mov/ji_1800299_supplemental_video_2



Film 15

Abbildung 4 a aus He et al. (2019), editiert mit zusätzlicher Beschriftung. Der Zeitpunkt 1800 s wurde aufgehellt.

ausschließlich an der IS, zusammen mit dem Großteil der Mitochondrien (s. **Abb. 33 b, 44**). Während des gesamten Kontaktverlaufes waren Mitochondrien sowohl an der „cSMAC“- als auch der „dSMAC“-Region der IS vorhanden (s. **Abb. 33**). Diese Mitochondrien können demnach sowohl für einen langanhaltenden Kalziumeinstrom und so für eine Stabilisierung der IS (Quintana et al. 2011), aber auch für eine verringerte CD3-Stimulation und so für eine Destabilisierung der IS sorgen (Baixauli et al. 2011; Junker und Hoth 2011). Die Balancierung beider Vorgänge könnte ein Mechanismus der T-Zelle sein, um die Dauer des Zell-Zell-Kontaktes zu bestimmen. Die Annahme der stabilen IS-Zellform führt zu einer Lokalisation von Orai-STIM-Clustern und Mitochondrien-Akkumulationen in der Nähe des „cSMAC“, wodurch der Kalziumeinstrom an der IS länger andauern kann und ein langanhaltender Kontakt ermöglicht wird.

Die Dynamik von endozytierten CD3-Vesikeln und Lytischen Granula (LG) bei IS-Ausbildung wurde ebenfalls im zweiten experimentellen Teil dieser Arbeit im Detail untersucht. Neben der Bewegung von Vesikel-Akkumulationen zur IS durch die Bewegung des Zentrosoms bzw. bei Änderung der Zellform (s. **Abb. 44**) konnten auch einzelne Vesikel nachverfolgt werden, die sich während der Kontaktausbildung sowohl zum Zentrosom hin- als auch von diesem weg bewegten (s. **Abb. 34, 35 b**). Aufgrund des nicht zur Vesikel-Nachverfolgung optimierten Experimentaufbaus konnten allerdings auf diese Weise nur sehr leuchtstarke und langsame Vesikel nachverfolgt werden. Im Gegensatz dazu konnte in optimierten Experimenten mit kontaktlosen T-Zellen eine viel größere Anzahl einzelner Vesikel mit schwacher

Fluoreszenz und sehr hohen Geschwindigkeiten nachverfolgt werden (s. **Abb. 30**). Dennoch sind die bei IS-Ausbildung ermittelten Vesikel-Geschwindigkeiten in diesen nicht für die Vesikel-Nachverfolgung optimierten Experimenten (s. **Abb. 37 b**) sehr ähnlich zu den in anderen Studien ermittelten Werten (*Ritter et al. 2015; Doktorarbeit C.S. Backes 2016*), deren Experimente ebenfalls nicht zur Nachverfolgung dieses schwach-fluoreszierenden Vesikelanteils geeignet waren. Auch bei der Aufnahme von Lytischen Granula in fixierten Zellen mittels Konfokalmikroskopie war die erreichte Auflösung bzw. Sensitivität in den meisten Studien zu gering, um diesen schwach-fluoreszierenden Vesikelanteil sichtbar zu machen (**Abb. 46 e-h**; *Stinchcombe et al. 2006; Ritter et al. 2015; Govendir et al. 2022*). Zur Vesikel-Nachverfolgung optimierte Experimente bei IS-Ausbildung zeigten eine ähnlich große Anzahl von Vesikeln und annähernd so hohe Geschwindigkeiten wie die im ersten experimentellen Teil dieser Arbeit durchgeführten Experimente mit kontaktlosen T-Zellen und ebenso eine große Anzahl von endoCD3/LG Vesikel-„Paaren“ (*Diplomarbeit C. Junker 2008, Qu et al. 2011*). Dabei wurde festgestellt, dass ungepaarte LG nur kurzzeitig an der IS verblieben, im Gegensatz zu „gepaarten“ Vesikeln oder einzelnen endoCD3-Vesikeln, die deutlich länger an der IS verweilten. Diese längere Verweildauer gepaarter LG erhöhte die LG-Exozytose-Wahrscheinlichkeit signifikant (*Qu et al. 2011*). Die in dieser Arbeit festgestellte LG-induzierte Apoptose in Zielzellen vor dem Zentrosomkontakt der IS-Membran und bei Mehrfachkontakten ohne Zentrosom-Relokalisation (s. **Abb. 32 B d, 37 a**) spricht für das Vorhandensein dieses Mechanismus, durch den eine Zentrosombewegung zur IS keine notwendige Voraussetzung für die Akkumulation und Freisetzung von LG an der IS ist. Die im Vergleich zum Zentrosom um etwa den Faktor 10-20 höher gemessenen Maximalgeschwindigkeiten von LG (s. **Abb. 42**) sprechen ebenfalls für eine höhere Effektivität Zentrosom-unabhängiger Verteilungen dieser Vesikel.

Serielle Abtötung von Zielzellen. Nach der Beobachtung der Zellkontakt-vermittelten Apoptose durch zytotoxische T-Zellen wurde zunächst vornehmlich an der Fragestellung geforscht, wieso nur stimulierende Zielzellen durch den Kontakt mit diesen T-Zellen abgetötet werden, während gleichzeitig anwesende nicht-stimulierende Zellen trotz Kontakten mit T-Zellen überleben. *Kupfer et al.* stellten im Jahr 1984 in zytotoxischen T-Zellen eine Relokalisation des Zentrosoms und des damit assoziierten Golgi-Apparates zu der Kontaktfläche mit Zielzellen fest und spekulierten, dass diese Polarisation des Zentrosoms die Voraussetzung für eine selektive zielgerichtete Abtötung darstellt (*Kupfer und Dennert 1984; Kupfer, Dennert und Singer 1985*). Die gleiche Polarisation von Zentrosom und Golgi zum Zell-Zell-Kontakt wurde 1986 von derselben Arbeitsgruppe in CD4⁺ Helfer-T-Zellen im Kontakt mit Zielzellen beschrieben (*Kupfer et al. 1986*). Einige Jahre später wurde von der Griffiths-Arbeitsgruppe eine erhöhte Akkumulation von LG am Zentrosom nach Stimulation von zytotoxischen T-Zellen gezeigt (*Stinchcombe et al. 2001*), bevor im Jahr 2006 von derselben Arbeitsgruppe die These veröffentlicht wurde, dass das Zentrosom die LG durch direkten Kontakt mit der Plasmamembran der IS dorthin transportiert, ohne die Notwendigkeit für einen Plus-End-Transport (*Stinchcombe et al. 2006*). Die für diese Aussage genutzten Daten bestanden hauptsächlich aus Konfokal- und Elektronenmikroskopie (EM)-Aufnahmen von T-Zellen, zumeist in der Zellform einer „stabilen IS“, in denen das Zentrosom sehr nahe an der Membran der IS detektiert werden konnte. Allerdings sind in den dazu veröffentlichten EM-Aufnahmen stark verzogene Plasmamembranen

Abb. 46:
Optimierte Darstellung
relevanter Teile von *Abbildung 1*
aus *Stinchcombe et al. (2006)*.

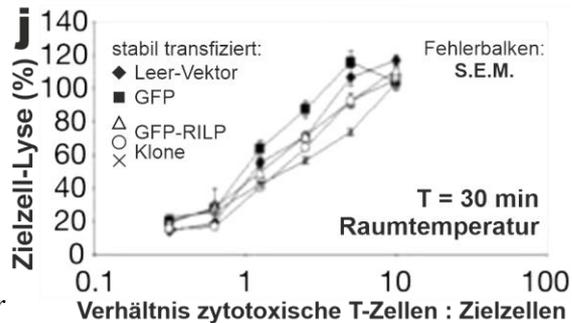
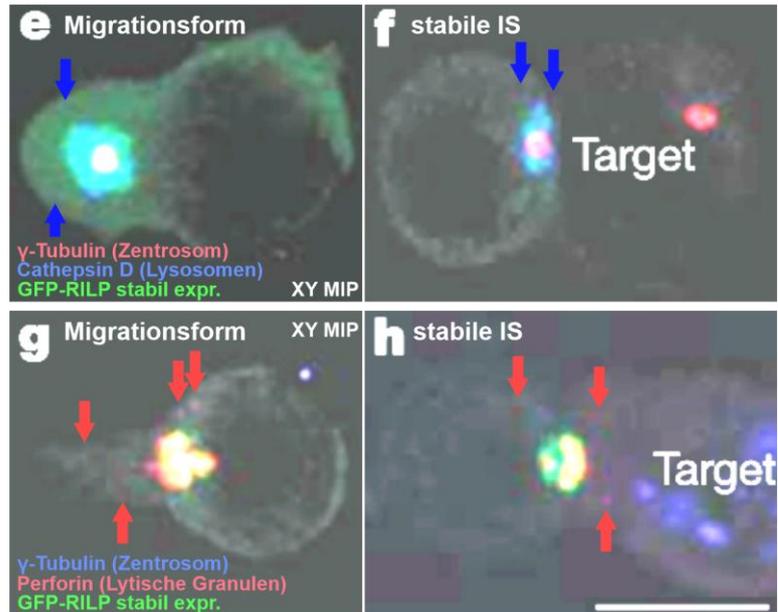
e-h Konfokale Z-Stapel-Aufnahmen (0,3 µm Z-Abstand) fixierter humaner zytotoxischer T-Zellen in der Migrationsform (e, g) und nach längerem Kontakt mit stimulierenden Zielzellen (f, h). Die T-Zellen sind stabil GFP-RILP- (grün) exprimierende Klone. Zusätzlich wurden Zentrosome (e, f: rot; g, h: blau) und Lysosomen (e, f: blau) bzw. Lytische Granula (g, h: rot) mit Antikörpern gegen γ-Tubulin, Cathepsin D bzw. Perforin markiert. Durch eine starke Aufhellung der Original-Bilder sind einzelne Lysosomen (blaue Pfeile) und Lytische Granula (rote Pfeile) zu erkennen, die nicht am Zentrosom lokalisiert sind.

Maßstabsbalken: 10 µm

j Normierte Analyse der Lysekapazität stabil-transfizierter humaner zytotoxischer T-Zellen gegen stimulierende Zielzellen in unterschiedlichen Mengen-Verhältnissen nach 30 Minuten.

Es wurden stabil mit Kontroll-Vektoren (Leer-Vektor und GFP-Vektor) und 3 verschiedene stabil GFP-RILP-exprimierende Zellpopulationen verglichen. Während der Experimente waren anti-CD3-Antikörpern im Medium vorhanden, durch die die T-Zellen beständig ungerichtet stimuliert wurden.

Abbildung 1 e-h und j aus *Stinchcombe et al. (2006)*, editiert.
 Die Original-Bilder in e-h wurden stark aufgehellt.



und im Vergleich mit Fluoreszenzaufnahmen lebender Zellen „aufgeblähte“ Organellen zu erkennen (*Stinchcombe et al. 2006; Stinchcombe et al. 2015; Ritter et al. 2022*), beides typische Artefakte der genutzten Fixierungs- und Präparierungsverfahren. Daher wurde auch die Größe einzelner LG in diesen Studien aufgrund mittels EM-Aufnahmen erstellter 3D-Rekonstruktionen deutlich höher angenommen, als sie in lebenden Zellen, unter anderem in dieser Arbeit (s. **Abb. 30**), erscheinen. Als funktionelle Kontrolle der Zentrosom-Akkumulations-Hypothese wurden von *Stinchcombe et al. (2006)* Experimente mit stabil GFP-„Rab-Interacting Lysosomal Protein“ (GFP-RILP) exprimierenden T-Zellen durchgeführt. Eine erhöhte Expression von RILP führt zu einer höheren Affinität von Dynein-Motorproteinen zu Lysosomen und somit zu einer erhöhten lysosomalen Zentrosom-Akkumulation (**Abb. 46 e-h, Jordens et al. 2001**). Von *Stinchcombe et al. (2006)* durchgeführte Zytotoxizitätsanalysen führten zu „keiner signifikanten“ Verringerung der Lysekapazität bei stabil-exprimiertem GFP-RILP (**Abb. 46 j**). Durch die optimierte Darstellung in **Abb. 46 e-h** wurden einzelne LG mit Abstand zum Zentrosom sichtbar, die GFP-RILP-Expression verhinderte demnach nicht vollständig einen Plus-End-Transport. In späteren Studien dieser Arbeitsgruppe wurde „überraschenderweise“ ein Plus-End-Transport vom Zentrosom und der IS weg nach Kontaktbildung nachgewiesen (*Ritter et al. 2015*). Mehrfachkontakte wurden von der Griffiths-Arbeitsgruppe, die die Hypothese der rein Zentrosom-vermittelten LG-Akkumulation an der IS immer noch als bewiesen annimmt, trotz geringer Zentrosom-

 Alex T. Ritter
 ASCB Celldance
 2014 Video
 Film 14
 ab 1'19"
youtu.be/jLCNwHxpNzg?t=79

Relokalisation in eigenen aktuellen Studien (*Frazer et al. 2021*), ignoriert und nie ausgewertet. Apoptoseanalysen wurden von dieser Arbeitsgruppe nur als „Endpunkt-Killing-Assay“ (s. **Abb. 46 j**) veröffentlicht, obwohl auch Einzelzellanalysen mit sehr schnell reagierenden Zielzell-Apoptosemarkern

durchgeführt wurden (s. **Film 14: 1'19''-2'34''**). Mehr als die Hälfte aller in **Film 14** ab 1'19'' gezeigten „live“ abgetöteten Zielzellen zeigten ein Aufleuchten des Zielzell-Apoptosemarkers (rot), bevor eine LG-Akkumulation (grün) die Kontaktflächen zwischen T-Zellen und Zielzelle erreichte. Dies stellt die Notwendigkeit der Zentrosom-Lokalisation an der IS zur LG-Freisetzung stark in Frage.

Geht man davon aus, dass die Zentrosom-Relokalisation zur IS notwendig für den Transport von LG zur IS ist, führt dies zu einer rein „seriellen“ Abtötung von Zielzellen, da das Zentrosom zunächst die IS jeder Zielzelle berühren müsste (**Abb. 47 a**). Während manche Studien mit NK-Zellen eine rein zentrosomale Akkumulation von LG an der IS zu bestätigen scheinen (*Stinchcombe et al. 2011; Doktorarbeit C.S. Backes 2016; Backes et al. 2018*), widersprechen die Ergebnisse dieser Arbeit und einiger in den folgenden Abschnitten diskutierter Studien mit zytotoxischen T-Zellen dieser Hypothese.

Parallele Abtötung von Zielzellen. Bereits im Jahr 1986 berichteten *Yannelli et al.* von der simultanen Abtötung mehrerer Zielzellen durch dieselbe zytotoxische T-Zelle, ohne Relokalisation der

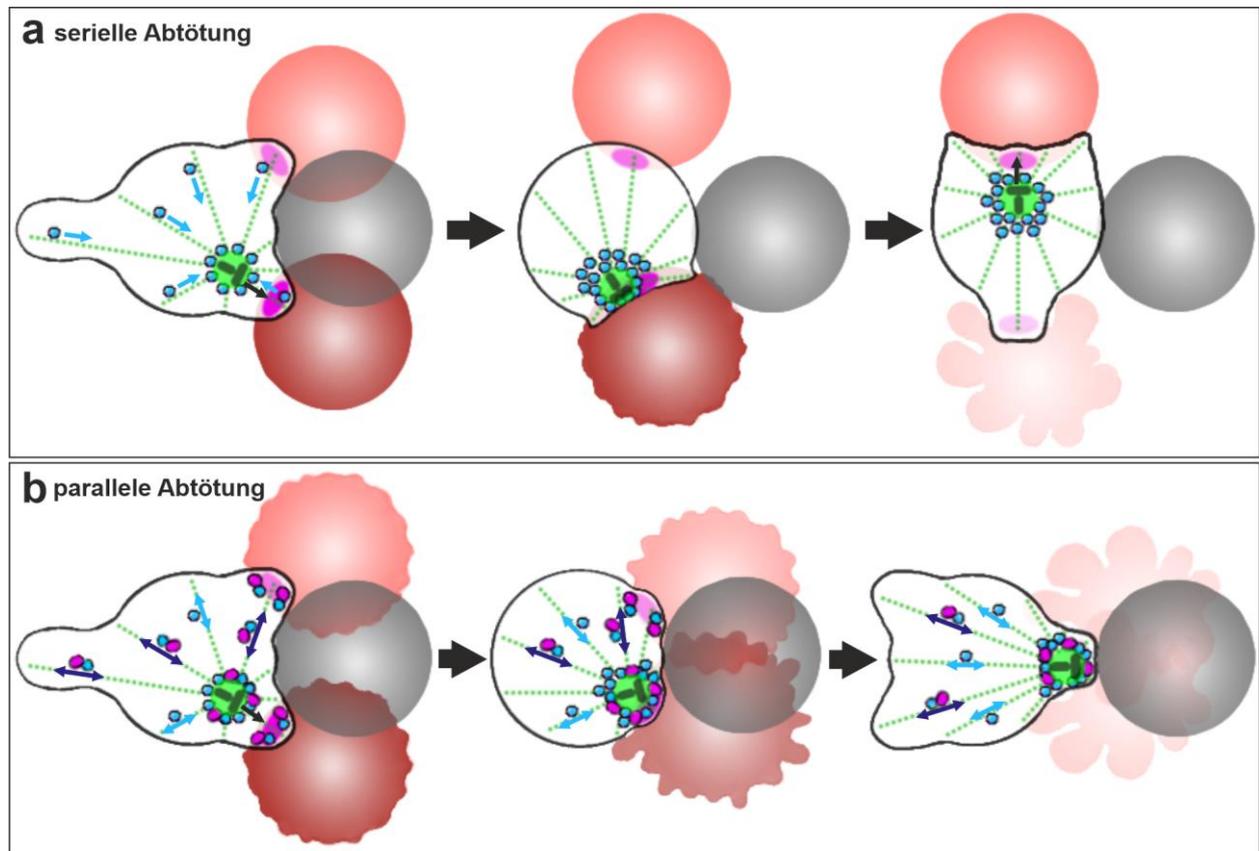
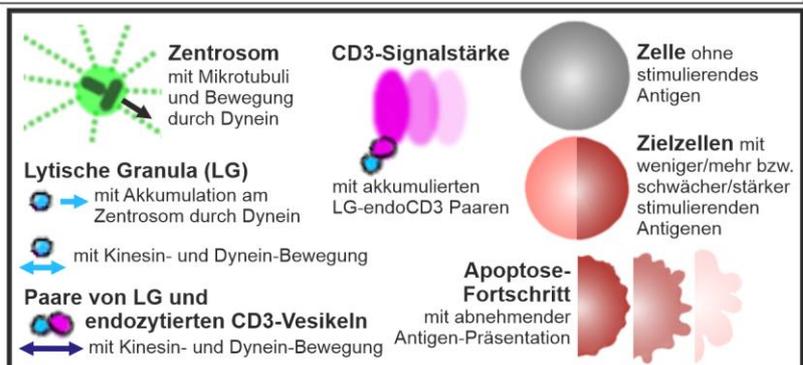


Abb. 47: Schemata für serielle (a) bzw. parallele (b) Zielzell-Abtötung.

Schematische Darstellung der Modelle für „serielle“ Zielzell-Abtötung bei reinem Minus-End-Transport von Lytischen Granula (LG, blau) zum Zentrosom (grün) und rein zentrosomalem Transport der LG an die Kontaktflächen mit Zielzellen (a) und der „parallelen“ Abtötung aller gleichzeitig kontaktierten Zielzellen durch die Akkumulation von LG an allen stimulierenden Kontaktflächen nach Plus-End-Transport mittels „Paarung“ mit lange an der IS verweilenden endozytierten CD3-Vesikeln (magenta) (b).

Das stärkste CD3-Signal, ausgelöst durch die stärkste Antigen-Stimulation (rot), bestimmt die Position des Zentrosoms in beiden Modellen. Nicht-stimulierende Zellen (grau) werden durch die Eingrenzung zytotoxischer Proteine innerhalb der Kontaktflächen nicht abgetötet.



LG-Akkumulation zu allen ausgebildeten Kontakten. Damit widersprachen sie direkt den Ergebnissen von *Kupfer, Dennert und Singer (1985)*. *Wiedemann et al.* zeigten 2006 simultane Mehrfachabtötungen ohne Relokalisation des Zentrosoms, im direkten Widerspruch zu *Stinchcombe et al. (2006)*. Aber auch für Einzelkontakte wurden einige Studien veröffentlicht, die eine Induktion der Apoptose in der Zielzelle vor Ankunft des Zentrosoms an der IS zeigten (*Bertrand et al. 2013; Filali et al. 2022*). *Kurowska et al.* berichteten 2012 von einem Kinesin-abhängigem Endtransport der LG vom Zentrosom zur Membran der IS. In einer aktuellen Studie zeigten T-Zellen ohne funktionelles Zentrosom weiterhin eine sehr hohe Abtötungskompetenz bei Erstkontakten (*Tamzalit et al. 2020*), nur der Wiederaufbau verbrauchter LG war in diesen Zellen eingeschränkt. Durch die Einsaugung des Uropods zytotoxischer T-Zellen in eine Mikropipette wurde von *Govendir et al. (2022)* die Relokalisation der LG-Akkumulation zur IS stark beeinträchtigt, sodass die Perforation der Zielzell-Membran zwar reduziert, aber nicht vollkommen verhindert wurde. Ähnliche Ergebnisse wurden in derselben Studie durch die allgemeine Inhibierung von Dynein-Motorproteinen erzielt, wodurch die Polarisation des Zentrosoms stark eingeschränkt wurde.

Studien mit TIRF-Mikroskopie auf anti-CD3-Antikörper-beschichteten Deckgläsern zeigten, dass sich das Zentrosom durchaus sehr nahe der IS annähern kann, wodurch eine große Anzahl von LG in die Nähe der IS gebracht wird (*Qu et al. 2011; Ritter et al. 2015; Klein-Hessling et al. 2017*). Die endgültige Bewegung der LG zur IS, sowie die Andockung und die Fusion der LG an der IS scheinen allerdings von der Aktivität von Kinesin-1-Motorproteinen (*Kurowska et al. 2012*), der Assoziation von LG mit endozytierten CD3-Vesikeln (*Qu et al. 2011*) und der Aktivierung von LFA-1 an sehr Aktin-armen Bereichen der IS außerhalb des „cSMAC“, mit Abstand zum Zentrosom (*Wang et al. 2022*) abzuhängen.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigten bei Stimulation mit Superantigenen eine schnelle Annäherung des Zentrosoms mitsamt Golgi-Apparat und Organell-Akkumulationen zur IS, wobei das Zentrosom bei Annahme der stabilen IS-Zellform sehr nahe und stationär am Zentrum der IS lokalisiert wurde (s. **Abb. 32 i ii, 34, 35 a, 44**). Allerdings konnten apoptotische Membranbläschen („Blebs“) bei Zielzellen nachgewiesen werden, bevor das Zentrosom die Nähe der IS erreichte (s. **Abb. 32 B d, 37 a, 44**). Weiterhin wurden bei Mehrfachkontakten Apoptosen ohne Relokalisation des Zentrosoms zur zweiten IS festgestellt. Diese Ergebnisse bestätigen die Hypothese einer Zentrosom-unabhängigen LG-Akkumulation an der IS (*Wiedemann et al. 2006; Qu et al. 2011; Wang et al. 2022*), sind aber im klaren Widerspruch zur Hypothese der rein Zentrosom-vermittelten LG-Akkumulation (*Stinchcombe et al. 2006; Frazer et al. 2021*). Die Relokalisation des Zentrosoms zur IS scheint allerdings die Wahrscheinlichkeit zu erhöhen, dass Apoptose oder sogar Nekrose in der Zielzelle auftritt (*Frazer et al. 2021; Govendir et al. 2022*), da die Anzahl an LG in der Nähe der IS stark erhöht wird. Experimente mit nicht-zytotoxischen T-Zellen zeigten in dieser Arbeit und in der Literatur eine vergleichbare Zentrosom-Dynamik mit einer Bewegung des Zentrosoms mitsamt Golgi-Apparat und Organell-Akkumulationen zur IS (s. **Abb. 38, 40 a, 44**; *Kupfer et al. 1986; Contento et al. 2010; Baixauli et al. 2011*). Daher kann davon ausgegangen werden, dass neben der Abtötung der Zielzelle auch eine Stimulation der zytotoxischen T-Zelle, ähnlich wie bei nicht-zytotoxischen T-Zellen, durch die Ausbildung der IS erreicht wird, wie von *Wiedemann et al. (2006)* gezeigt. Zugleich wird durch die IS-Lokalisation der LG-Akkumulation und des Golgi-Apparates eine Abtötung der am stärksten

stimulierenden kontaktierten Zielzelle forciert. Solange die Membran dieser Zielzelle nicht zu stark beschädigt wird, bleibt das Zentrosom an diese Zielzelle gebunden. Dennoch können weitere kontaktierte Zielzellen durch Plus-End-Transport der LG und endoCD3-vermittelte Andockung an „sekundären“ Kontakten abgetötet werden (Wiedemann *et al.* 2006; Qu *et al.* 2011). Dieser Mechanismus würde eine „parallele“ Abtötung ermöglichen, unabhängig von der Zentrosom-Lokalisation (**Abb. 47 b**). Im Vergleich mit einer „seriellen“ Abtötung (**a**) würde dies die Abtötung von Zielzell-Gruppen deutlich beschleunigen. In Zellen ohne stimulierendes Antigen wird selbst bei Kontakt mit zytotoxischen T-Zellen keine Apoptose ausgelöst, da der TCR nicht aktiviert wird und alle gebildeten Zielzell-Kontakte einen durch den Aktin-Ring abgeschlossenen Raum bilden, in welchem die zytotoxischen Proteine verbleiben. Der auch bei zytotoxischen T-Zellen oft beobachtete langanhaltende Kontakt mit Zielzellen trotz Apoptosesignalen führt zu einer langanhaltenden T-Zell-Stimulation, die wie bei nicht-zytotoxischen T-Zellen zur Produktion von Zytokinen, zur asymmetrischen Zellteilung (Capece *et al.* 2017) und zur Verlängerung der Lebensdauer der T-Zelle durch einen Telomer-Transfer von der Zielzelle genutzt werden könnte (Lanna *et al.* 2022).

4.4 Modellierung der T-Zell-Polarisation

In diesem Kapitel wird ein Modell für die T-Zell-Polarisation vorgeschlagen, die Nutzung der erhaltenen Daten für die Computer-Modellierung diskutiert und ein Ausblick auf die weitere Forschung vollzogen.

Allgemeine Modellierung. Die in dieser Arbeit gesammelten detaillierten Daten zur Dynamik der T-Zellform und Organellverteilung bei der „Ausstreckung“ der Zelle in das umgebende Kulturmedium, der Migration auf dem Deckglas und beeinträchtigter bzw. unbeeinträchtigter Ausbildung von Immunologischen Synapsen (IS) ermöglichen mit Daten aus der Literatur eine allgemeine Modellierung der T-Zell-Polarisation, abhängig von der durch Aktin bestimmten Zellform, dem Aktinfluss und der Balance zwischen der Dynein- und Kinesin-Motorproteinaktivität (**Abb. 48**).

Die Polarisation der Zellform bestimmt die Mobilität der T-Zelle durch den Fluss des Aktin-Zytoskeletts, welcher auch die Migrationsrichtung bestimmt. Die Aktivität zytosolischer Dynein-Motorproteine führt zur Akkumulation von Organellen am Zentrosom und somit zur Entstehung des primären Akkumulationspols. Die Aktivität zytosolischer Kinesin-Motorproteine bestimmt das Vorhandensein und die Position sekundärer Akkumulationspole, vorwiegend an der Zellkern-Einbuchtung, der Rückseite des Zellkerns, am Uropod während der Migrationsform, sowie an Kontaktflächen mit unspezifischen oder verstärkt an stimulierenden Oberflächen. Kommt es während der Migration zum Kontakt mit einer den T-Zell-Rezeptor (TCR) stimulierenden Oberfläche, wie einer Zielzelle mit passendem Antigen, breitet sich die T-Zelle zunächst auf dieser Oberfläche aus. Das Zentrosom wird gleichzeitig zum neu an der Oberfläche gebildeten Akkumulationspol transportiert, durch dort an der Membran akkumulierende Dynein-Motorproteine (**Abb. 48 c i**). Kinesin-abhängiger Plus-End-Transport bringt Mitochondrien und Vesikel an das kortikale Aktin-Netzwerk der Plasmamembran. Ohne eine Beeinträchtigung der Zellformänderung werden die Zellkern-Einbuchtung und der zurückgebildete Uropod mitsamt ihren Akkumulationspolen ebenfalls zur stimulierenden Oberfläche orientiert, während die Kontaktfläche mit der Oberfläche ringförmig kontrahiert

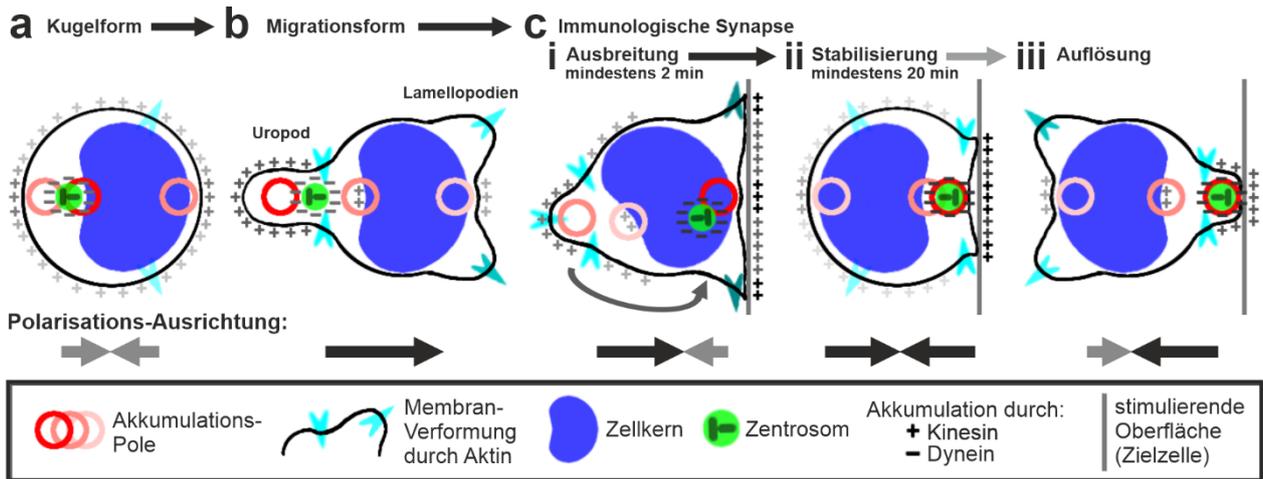


Abb. 48: Modell der Zell-Polarisation in ruhenden (a) und migrierenden (b) T-Zellen und während allen Phasen der Ausbildung Immunologischer Synapsen (c i-iii).

Während der Kugelform (a) dominiert die Zellkern-Einbuchtung als primärer Organell-Akkumulationspol (roter Kreis) mit der Zellkern-Gegenseite und der möglichen Kontaktfläche mit einer nicht-stimulierenden Oberfläche als sekundäre Akkumulationspole (hellrote Kreise). Umformungen des Aktin-Zytoskeletts (cyane Pfeile) führen zur Ausbildung von Lamellopodien. Durch Aktin/Myosin-Kontraktion wird der Zellkern (dunkelblau) in ein Lamellopodium verschoben und der Uropod ausgebildet, wodurch die T-Zelle die Migrationsform annimmt, mit dem Uropod als dominantem Akkumulationspol (b). Beim Kontakt mit einer den T-Zell-Rezeptor aktivierenden Oberfläche, wie beispielsweise einer stimulierenden Zielzelle (graue Linie) kommt es zunächst zur Ausbreitung auf dieser Oberfläche durch starke Aktin-Akkumulationen an den Rändern der Kontaktfläche und zur Ausbildung des neuen dominanten Akkumulationspols an der Immunologischen Synapse (IS) (c i). Der Uropod wird zurückgebildet und sein Akkumulationspol mit dem Akkumulationspol der IS vereinigt. Die Zellkern-Einbuchtung wird ebenfalls mit ihrem Akkumulationspol zur IS orientiert, während die Kontaktfläche mit der stimulierenden Oberfläche verkleinert und stabilisiert wird. Dadurch nimmt die T-Zelle wieder eine Kugelform an (c ii). Überwiegen abschwächende Prozesse, verkleinert sich die Kontaktfläche mit der stimulierenden Oberfläche weiter und es wird ein neuer Uropod an der IS ausgebildet, wodurch die T-Zelle erneut die Migrationsform annimmt und sich von der stimulierenden Oberfläche entfernen kann (c iii). Das Zentrosom (grün) wird in allen Phasen zum stärksten Akkumulationspol bewegt, mitsamt dem Golgi-Apparat und allen durch Dynein-Transport am Zentrosom entstehenden Akkumulationen (-). Durch Kinesin-Transport entstehende intrazelluläre und membranständige Akkumulationen (+) sind während der Migrationsform vorwiegend am Uropod und bei IS-Ausbildung an der stimulierenden Oberfläche lokalisiert.

und die T-Zelle wieder eine Kugelform annimmt (Abb. 48 c ii). Die Balance zwischen stimulierenden und abschwächenden Signalprozessen bestimmt die Stabilität dieser Zellform. So wird beispielsweise die Anzahl an TCR an der Oberfläche kontinuierlich durch Internalisierung am Zentrum der Kontaktfläche („cSMAC“) mittels Minus-End-Transport verringert, während der Plus-End-Transport von TCR-enthaltenden Vesikeln zur gesamten Kontaktfläche die für die Stimulation verfügbare Menge an TCR wieder erhöht. Bei zytotoxischen T-Zellen steigert dies gleichzeitig die Wahrscheinlichkeit zur Abtötung der Zielzelle durch die Andockung Lytischer Granula an der stimulierenden Oberfläche (IS). Kommt es zur Apoptose der Zielzelle, nimmt die Stimulationsstärke durch die damit einhergehenden Membranschäden der Zielzelle ebenfalls ab. Mitochondrien, die an die Ränder der Kontaktfläche („dSMAC“) transportiert werden, können die TCR-Internalisierung begünstigen, tragen jedoch an der gesamten Kontaktfläche zur Stabilisierung des Kalziumeinstroms bei. Überwiegen die abschwächenden Signale, beispielsweise aufgrund einer vorwiegenden Internalisierung der Rezeptoren am „cSMAC“, wegen des Einbruchs des Kalziumsignals oder aufgrund zu starker Apoptose bzw. Nekrose der Zielzelle, verkleinert sich die Kontaktfläche mit der Oberfläche weiter durch die Neuausbildung des Uropods an der IS und die Annahme der Migrationsform (Abb. 48 c iii), wodurch sich die T-Zelle von der Oberfläche lösen und entfernen kann.

Computer-Modellierung. Durch die Nutzung von Computer-Modellierungen konnten einzelne Aspekte der T-Zell-Polarisation überprüft und validiert werden, deren detaillierter Ablauf nicht vollständig durch Experimente mit realen Zellen aufgezeigt werden konnte. So wurde in der Vergangenheit beispielsweise

die Andockungsdynamik von Lytischen Granula (LG) bzw. mit endoCD3-Vesikeln „gepaarten“ LG (*Qu et al. 2011*), die Pufferwirkung von Mitochondrien beim Kalziumeinstrom über die Plasmamembran (*Quintana et al. 2011*), die Drehung des Zellinneren mitsamt Zentrosom und Organell-Akkumulationen bei nahem („direktem“) Kontakt zwischen T-Zellen und Zielzellen (*Maccari et al. 2016*), sowie der Mechanismus der Zentrosom-Relokalisation zur IS (*Hornak und Rieger 2020; Gros et al. 2021; Hornak und Rieger 2022*) mittels Computer-Modellierung dargestellt und validiert. Die genauen Parameter, die für die Übergänge des in **Abbildung 48** vorgeschlagenen Modells zur T-Zell-Polarisation relevant sind, könnten ebenfalls mittels Computer-Modellierung bestimmt werden. Durch die Nutzung der in dieser Arbeit erstellten und in der Literatur vorhandenen Daten zu Volumen, Dynamik und Geschwindigkeiten von T-Zellen und ihren Organellen könnte die Computer-Modellierung die in **Abbildung 48** gezeigten Abläufe noch detaillierter nachstellen und Vorhersagen treffen, beispielsweise über die Stabilität und Lebensdauer der Kontakte mit stimulierenden Oberflächen. Bestehende Modellierungen, wie die zur Drehung der T-Zelle bei nahem Kontakt mit Zielzellen (*Maccari et al. 2016*), könnten, durch die Integration der in dieser Arbeit erhobenen Daten zu Zellformänderungen und Kontakten in der T-Zell-Migrationsform, auf die gesamte T-Zell-Polarisation erweitert werden. Eine weitere sinnvolle Anwendung der Computer-Modellierung würde eine Kombination von „in vivo“ erhaltenen Migrationsdaten mit den in dieser Arbeit erstellten zeitlichen und morphologischen Daten zur Zellform- und Organelldynamik darstellen, um das gesamte Verhalten der T-Zellen im menschlichen Körper zu simulieren und abschätzen zu können.

Ausblick. Durch den Einsatz modernster Mikroskopie-, Kamera- und Computer-Technologien wird es in Zukunft möglich sein, die in dieser Arbeit erhaltenen morphologischen Daten stark zu erweitern und unter physiologischeren Bedingungen, beispielsweise durch die Nutzung artifizierlicher 3D-Matrizes, zu validieren. Die aufgrund der Komplexität der Bilddaten vorwiegend manuell durchgeführten Auswertungen könnten zukünftig durch neue Ansätze in der künstlichen Intelligenz, wie mit den jeweiligen Bilddaten trainierte „künstliche neuronale Netze“, automatisiert durchgeführt werden, wodurch der zeitliche Aufwand stark verringert und die Objektivität der erhobenen Daten deutlich erhöht werden könnte. Mit diesen verbesserten Methoden könnten weiterhin offene Fragen bei der T-Zell-Polarisation, wie die genauen Unterschiede zwischen zytotoxischen und nicht-zytotoxischen Immunologischen Synapsen (IS) oder die Balance der Faktoren, die über eine Stabilisierung bzw. Auflösung der IS entscheiden, im Detail aufgeschlüsselt werden. Weiterhin könnte der Einfluss der Zentrosom-Polarisation auf die Effektivität der Abtötung und der T-Zell-Stimulation genauer geklärt werden. Die bereits existierenden Computer-Modellierungen einzelner Aspekte der T-Zell-Polarisation könnten mit den vorhandenen Daten zur Polarisation eingesetzt werden, um zukünftige Forschungsschwerpunkte für eine Computer-Modellierung der gesamten T-Zell-Polarisation festzulegen. Diese gesamtheitliche Polarisations-Modellierung würde ein wertvolles Werkzeug darstellen, beispielsweise bei der Aufklärung der Entstehung von Autoimmunerkrankungen oder der Entwicklung neuer therapeutischer Ansätze zur Behandlung von Autoimmunerkrankungen, Virusinfektionen und Krebs. Als konkretes Beispiel könnte die Computer-Modellierung zur präzisen Modulation des TCR-Signals vor der realen Erzeugung von „Chimeric-Antigen-Receptor“ (CAR)-T-Zellen eingesetzt werden, deren Einsatz insbesondere in der Krebstherapie große Erfolge verspricht.

5 Literaturverzeichnis

5.1 Referenzen

1. Adey A, Burton JN, Kitzman JO, Hiatt JB, Lewis AP, Martin BK, Qiu R, Lee C, Shendure J (2013) The haplotype-resolved genome and epigenome of the aneuploid HeLa cancer cell line. *Nature* 500:207-211. doi: 10.1038/nature12064
2. Ai HW, Henderson JN, Remington SJ, Campbell RE (2006) Directed evolution of a monomeric, bright and photostable version of *Clavularia* cyan fluorescent protein: structural characterization and applications in fluorescence imaging. *Biochem J* 400:531-540. doi: 10.1042/BJ20060874
3. Alberts B (2015) *Molecular biology of the cell*. 6th ed. Garland Science, New York. doi: 10.1201/9781315735368
4. Amos B, McConnell G, Wilson T (2012) Confocal microscopy. In: *Handbook of comprehensive biophysics*. Elsevier, Amsterdam, pp 3-23. doi: 10.1016/B978-0-12-374920-8.00203-4
5. Asbury CL (2017) Anaphase A: disassembling microtubules move chromosomes toward spindle poles. *Biology (Basel)* 6. doi: 10.3390/biology6010015
6. Ashdown GW, Burn GL, Williamson DJ, Pandzic E, Peters R, Holden M, Ewers H, Shao L, Wiseman PW, Owen DM (2017) Live-cell super-resolution reveals F-Actin and plasma membrane dynamics at the T cell synapse. *Biophys J* 112:1703-1713. doi: 10.1016/j.bpj.2017.01.038
7. Azimzadeh J, Bornens M (2007) Structure and duplication of the centrosome. *J Cell Sci* 120:2139-2142. doi: 10.1242/jcs.005231
8. Babich A, Burkhardt JK (2013) Coordinate control of cytoskeletal remodeling and calcium mobilization during T-cell activation. *Immunol Rev* 256:80-94. doi: 10.1111/imr.12123
9. Backes CS (2016) *Untersuchung zytotoxischer Mechanismen in humanen natürlichen Killerzellen*. Doktorarbeit. Universität des Saarlandes, Homburg/Saar. doi: 10.22028/D291-22149
10. Backes CS, Friedmann KS, Mang S, Knorck A, Hoth M, Kummerow C (2018) Natural killer cells induce distinct modes of cancer cell death: Discrimination, quantification, and modulation of apoptosis, necrosis, and mixed forms. *J Biol Chem* 293:16348-16363. doi: 10.1074/jbc.RA118.004549

11. Baixauli F, Martin-Cofreces NB, Morlino G, Carrasco YR, Calabia-Linares C, Veiga E, Serrador JM, Sanchez-Madrid F (2011) The mitochondrial fission factor dynamin-related protein 1 modulates T-cell receptor signalling at the immune synapse. *EMBO J* 30:1238-1250. doi: 10.1038/emboj.2011.25
12. Baraniak JH, Jr., Zhou Y, Nwokonko RM, Gill DL (2020) The intricate coupling between STIM proteins and Orai channels. *Curr Opin Physiol* 17:106-114. doi: 10.1016/j.cophys.2020.07.018
13. Barr VA, Bernot KM, Srikanth S, Gwack Y, Balagopalan L, Regan CK, Helman DJ, Sommers CL, Oh-Hora M, Rao A, Samelson LE (2008) Dynamic movement of the calcium sensor STIM1 and the calcium channel Orai1 in activated T-cells: puncta and distal caps. *Mol Biol Cell* 19:2802-2817. doi: 10.1091/mbc.E08-02-0146
14. Barreiro O, de la Fuente H, Mittelbrunn M, Sanchez-Madrid F (2007) Functional insights on the polarized redistribution of leukocyte integrins and their ligands during leukocyte migration and immune interactions. *Immunol Rev* 218:147-164. doi: 10.1111/j.1600-065X.2007.00529.x
15. Beal AM, Anikeeva N, Varma R, Cameron TO, Vasiliver-Shamis G, Norris PJ, Dustin ML, Sykulev Y (2009) Kinetics of early T cell receptor signaling regulate the pathway of lytic granule delivery to the secretory domain. *Immunity* 31:632-642. doi: 10.1016/j.immuni.2009.09.004
16. Bertrand F, Muller S, Roh KH, Laurent C, Dupre L, Valitutti S (2013) An initial and rapid step of lytic granule secretion precedes microtubule organizing center polarization at the cytotoxic T lymphocyte/target cell synapse. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110:6073-6078. doi: 10.1073/pnas.1218640110
17. Bils W, Dürr G (1984) Übungsaufgaben und Antworten zu Kernthemen des Biologieunterrichts auf der Sekundarstufe II. Quelle & Meyer, Heidelberg.
18. Blott EJ, Bossi G, Clark R, Zvelebil M, Griffiths GM (2001) Fas ligand is targeted to secretory lysosomes via a proline-rich domain in its cytoplasmic tail. *J Cell Sci* 114:2405-2416. doi: 10.1242/jcs.114.13.2405
19. Borke JL, Caride AJ, Yaksh TL, Penniston JT, Kumar R (1989) Cerebrospinal fluid calcium homeostasis: evidence for a plasma membrane Ca²⁺-pump in mammalian choroid plexus. *Brain Res* 489:355-360. doi: 10.1016/0006-8993(89)90870-6
20. Buhler M, Stolz A (2022) Estrogens-origin of centrosome defects in human cancer? *Cells* 11. doi: 10.3390/cells11030432

21. Bunnell SC, Barr VA, Fuller CL, Samelson LE (2003) High-resolution multicolor imaging of dynamic signaling complexes in T cells stimulated by planar substrates. *Sci STKE* 2003:PL8. doi: 10.1126/stke.2003.177.pl8
22. Campello S, Lacalle RA, Bettella M, Manes S, Scorrano L, Viola A (2006) Orchestration of lymphocyte chemotaxis by mitochondrial dynamics. *J Exp Med* 203:2879-2886. doi: 10.1084/jem.20061877
23. Capece T, Walling BL, Lim K, Kim KD, Bae S, Chung HL, Topham DJ, Kim M (2017) A novel intracellular pool of LFA-1 is critical for asymmetric CD8(+) T cell activation and differentiation. *J Cell Biol* 216:3817-3829. doi: 10.1083/jcb.201609072
24. Cassioli C, Balint S, Compeer EB, Felce JH, Gamberucci A, Della Bella C, Felce SL, Brunetti J, Valvo S, Pende D, D'Elios MM, Moretta L, Dustin ML, Baldari CT (2021) Increasing LFA-1 expression enhances immune synapse architecture and T cell receptor signaling in Jurkat E6.1 cells. *Front Cell Dev Biol* 9:673446. doi: 10.3389/fcell.2021.673446
25. Choe K, Hontani Y, Wang T, Hebert E, Ouzounov DG, Lai K, Singh A, Beguelin W, Melnick AM, Xu C (2022) Intravital three-photon microscopy allows visualization over the entire depth of mouse lymph nodes. *Nat Immunol* 23:330-340. doi: 10.1038/s41590-021-01101-1
26. Contento RL, Campello S, Trovato AE, Magrini E, Anselmi F, Viola A (2010) Adhesion shapes T cells for prompt and sustained T-cell receptor signalling. *EMBO J* 29:4035-4047. doi: 10.1038/emboj.2010.258
27. Deman JJ, Bruyneel EA (1977) Thermal transitions in the adhesiveness of HeLa cells: effects of cell growth, trypsin treatment and calcium. *J Cell Sci* 27:167-181. doi: 10.1242/jcs.27.1.167
28. Denecke J, De Rycke R, Botterman J (1992) Plant and mammalian sorting signals for protein retention in the endoplasmic reticulum contain a conserved epitope. *EMBO J* 11:2345-2355. doi: 10.1002/j.1460-2075.1992.tb05294.x
29. Dohlsten M, Lando PA, Hedlund G, Trowsdale J, Kalland T (1990) Targeting of human cytotoxic T lymphocytes to MHC class II-expressing cells by staphylococcal enterotoxins. *Immunology* 71:96-100.
30. Eisenbeis J, Peisker H, Backes CS, Bur S, Holters S, Thewes N, Greiner M, Junker C, Schwarz EC, Hoth M, Junker K, Preissner KT, Jacobs K, Herrmann M, Bischoff M (2017) The extracellular adherence protein (Eap) of *Staphylococcus aureus* acts as a proliferation and migration repressing factor that alters the cell morphology of keratinocytes. *Int J Med Microbiol* 307:116-125. doi: 10.1016/j.ijmm.2017.01.002

31. Ettinger A, Wittmann T (2014) Fluorescence live cell imaging. *Methods Cell Biol* 123:77-94. doi: 10.1016/B978-0-12-420138-5.00005-7
32. Fang H, Geng S, Hao M, Chen Q, Liu M, Liu C, Tian Z, Wang C, Takebe T, Guan JL, Chen Y, Guo Z, He W, Diao J (2021) Simultaneous Zn(2+) tracking in multiple organelles using super-resolution morphology-correlated organelle identification in living cells. *Nat Commun* 12:109. doi: 10.1038/s41467-020-20309-7
33. Faroudi M, Utzny C, Salio M, Cerundolo V, Guiraud M, Muller S, Valitutti S (2003) Lytic versus stimulatory synapse in cytotoxic T lymphocyte/target cell interaction: manifestation of a dual activation threshold. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:14145-14150. doi: 10.1073/pnas.2334336100
34. Filali L, Puissegur MP, Cortacero K, Cussat-Blanc S, Khazen R, Van Acker N, Frenois FX, Abreu A, Lamant L, Meyer N, Vergier B, Muller S, McKenzie B, Valitutti S (2022) Ultrarapid lytic granule release from CTLs activates Ca(2+)-dependent synaptic resistance pathways in melanoma cells. *Sci Adv* 8:eabk3234. doi: 10.1126/sciadv.abk3234
35. Fischer M, Haase I, Wiesner S, Muller-Taubenberger A (2006) Visualizing cytoskeleton dynamics in mammalian cells using a humanized variant of monomeric red fluorescent protein. *FEBS Lett* 580:2495-2502. doi: 10.1016/j.febslet.2006.03.082
36. Frazer GL, Gawden-Bone CM, Dieckmann NMG, Asano Y, Griffiths GM (2021) Signal strength controls the rate of polarization within CTLs during killing. *J Cell Biol* 220. doi: 10.1083/jcb.202104093
37. Fu H, Ward EJ, Marelli-Berg FM (2016) Mechanisms of T cell organotropism. *Cell Mol Life Sci* 73:3009-3033. doi: 10.1007/s00018-016-2211-4
38. Geisler C (2004) TCR trafficking in resting and stimulated T cells. *Crit Rev Immunol* 24:67-86. doi: 10.1615/critrevimmunol.v24.i1.30
39. Gey GO, Coffman WD, Kubicek MT (1952) Tissue culture studies of the proliferative capacity of cervical carcinoma and normal epithelium. *Cancer Research* 12:264-265.
40. Giacomello M, Drago I, Bortolozzi M, Scorzeto M, Gianelle A, Pizzo P, Pozzan T (2010) Ca²⁺ hot spots on the mitochondrial surface are generated by Ca²⁺ mobilization from stores, but not by activation of store-operated Ca²⁺ channels. *Mol Cell* 38:280-290. doi: 10.1016/j.molcel.2010.04.003
41. Gioia L, Siddique A, Head SR, Salomon DR, Su AI (2018) A genome-wide survey of mutations in the Jurkat cell line. *BMC Genomics* 19:334. doi: 10.1186/s12864-018-4718-6

42. Goldenring JR (2015) Recycling endosomes. *Curr Opin Cell Biol* 35:117-122.
doi: 10.1016/j.ceb.2015.04.018
43. Govendir MA, Kempe D, Sianati S, Cremasco J, Mazalo JK, Colakoglu F, Golo M, Poole K, Biro M (2022) T cell cytoskeletal forces shape synapse topography for targeted lysis via membrane curvature bias of perforin. *Dev Cell* 57:2237-2247 e2238.
doi: 10.1016/j.devcel.2022.08.012
44. Griffiths GM (1996) Secretory lysosomes - a special mechanism of regulated secretion in haemopoietic cells. *Trends Cell Biol* 6:329-332. doi: 10.1016/0962-8924(96)20031-5
45. Gros OJ, Damstra HGJ, Kapitein LC, Akhmanova A, Berger F (2021) Dynein self-organizes while translocating the centrosome in T-cells. *Mol Biol Cell* 32:855-868.
doi: 10.1091/mbc.E20-10-0668
46. Haggie PM, Verkman AS (2002) Diffusion of tricarboxylic acid cycle enzymes in the mitochondrial matrix in vivo. Evidence for restricted mobility of a multienzyme complex. *J Biol Chem* 277:40782-40788. doi: 10.1074/jbc.M207456200
47. Hashimoto-Tane A, Saito T (2016) Dynamic regulation of TCR-microclusters and the microsynapse for T cell activation. *Front Immunol* 7:255. doi: 10.3389/fimmu.2016.00255
48. He L, Raddatz AD, Zhou F, Hwang H, Kemp ML, Lu H (2019) Dynamic mitochondrial migratory features associated with calcium responses during T cell antigen recognition. *J Immunol* 203:760-768. doi: 10.4049/jimmunol.1800299
49. Hein B, Willig KI, Hell SW (2008) Stimulated emission depletion (STED) nanoscopy of a fluorescent protein-labeled organelle inside a living cell. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:14271-14276. doi: 10.1073/pnas.0807705105
50. Hornak I, Rieger H (2020) Stochastic model of T cell repolarization during target elimination (I). *Biophys J* 118:1733-1748. doi: 10.1016/j.bpj.2020.01.045
51. Hornak I, Rieger H (2022) Stochastic model of T cell repolarization during target elimination (II). *Biophys J* 121:1246-1265. doi: 10.1016/j.bpj.2022.02.029
52. Hoth M, Penner R (1993) Calcium release-activated calcium current in rat mast cells. *J Physiol* 465:359-386. doi: 10.1113/jphysiol.1993.sp019681
53. Hoth M, Fanger CM, Lewis RS (1997) Mitochondrial regulation of store-operated calcium signaling in T lymphocytes. *J Cell Biol* 137:633-648. doi: 10.1083/jcb.137.3.633

54. Hudson KR, Robinson H, Fraser JD (1993) Two adjacent residues in staphylococcal enterotoxins A and E determine T cell receptor V beta specificity. *J Exp Med* 177:175-184.
doi: 10.1084/jem.177.1.175
55. Jordens I, Fernandez-Borja M, Marsman M, Dusseljee S, Janssen L, Calafat J, Janssen H, Wubbolts R, Neefjes J (2001) The Rab7 effector protein RILP controls lysosomal transport by inducing the recruitment of dynein-dynactin motors. *Curr Biol* 11:1680-1685.
doi: 10.1016/s0960-9822(01)00531-0
56. Junker C (2008) Kinetische Analyse der Bewegung von Organellen und Vesikeln. Diplomarbeit. Universität des Saarlandes, Homburg/Saar.
URL: [dropbox.com/s/if67drkvry5205k/Diplomarbeit%20Christian%20Junker.pdf?dl=0](https://www.dropbox.com/s/if67drkvry5205k/Diplomarbeit%20Christian%20Junker.pdf?dl=0)
57. Junker C, Hoth M (2011) Immune synapses: mitochondrial morphology matters. *EMBO J* 30:1187-1189. doi: 10.1038/emboj.2011.72
58. Kar P, Nelson C, Parekh AB (2011) Selective activation of the transcription factor NFAT1 by calcium microdomains near Ca²⁺ release-activated Ca²⁺ (CRAC) channels. *J Biol Chem* 286:14795-14803. doi: 10.1074/jbc.M111.220582
59. Kar P, Lin YP, Bhardwaj R, Tucker CJ, Bird GS, Hediger MA, Monico C, Amin N, Parekh AB (2021) The N terminus of Orai1 couples to the AKAP79 signaling complex to drive NFAT1 activation by local Ca(2+) entry. *Proc Natl Acad Sci U S A* 118. doi: 10.1073/pnas.2012908118
60. Khodjakov A, Rieder CL (1999) The sudden recruitment of gamma-tubulin to the centrosome at the onset of mitosis and its dynamic exchange throughout the cell cycle, do not require microtubules. *J Cell Biol* 146:585-596. doi: 10.1083/jcb.146.3.585
61. Klein-Hessling S, Muhammad K, Klein M, Pusch T, Rudolf R, Floter J, Qureischi M, Beilhack A, Vaeth M, Kummerow C, Backes C, Schoppmeyer R, Hahn U, Hoth M, Bopp T, Berberich-Siebelt F, Patra A, Avots A, Muller N, Schulze A, Serfling E (2017) NFATc1 controls the cytotoxicity of CD8(+) T cells. *Nat Commun* 8:511. doi: 10.1038/s41467-017-00612-6
62. Knorck A, Marx S, Friedmann KS, Zophel S, Lieblang L, Hassig C, Muller I, Pilch J, Sester U, Hoth M, Eichler H, Sester M, Schwarz EC (2018) Quantity, quality, and functionality of peripheral blood cells derived from residual blood of different apheresis kits. *Transfusion* 58:1516-1526. doi: 10.1111/trf.14616
63. Knorck A, Schafer G, Alansary D, Richter J, Thurner L, Hoth M, Schwarz EC (2022) Cytotoxic efficiency of human CD8(+) T cell memory subtypes. *Front Immunol* 13:838484.
doi: 10.3389/fimmu.2022.838484

64. Knörck A (2019) Funktionale Charakterisierung der Effektor-Mechanismen humaner CD8⁺ T-Zell Memory-Subtypen. Doktorarbeit. Universität des Saarlandes, Homburg/Saar. doi: 10.22028/D291-32017
65. Kuklina EM (2022) T lymphocytes as targets for SARS-CoV-2. *Biochemistry (Mosc)* 87:566-576. doi: 10.1134/S0006297922060086
66. Kummerow C, Junker C, Kruse K, Rieger H, Quintana A, Hoth M (2009) The immunological synapse controls local and global calcium signals in T lymphocytes. *Immunol Rev* 231:132-147. doi: 10.1111/j.1600-065X.2009.00811.x
67. Kupfer A, Dennert G (1984) Reorientation of the microtubule-organizing center and the Golgi apparatus in cloned cytotoxic lymphocytes triggered by binding to lysable target cells. *J Immunol* 133:2762-2766.
68. Kupfer A, Dennert G, Singer SJ (1985) The reorientation of the Golgi apparatus and the microtubule-organizing center in the cytotoxic effector cell is a prerequisite in the lysis of bound target cells. *J Mol Cell Immunol* 2:37-49.
69. Kupfer A, Swain SL, Janeway CA, Jr., Singer SJ (1986) The specific direct interaction of helper T cells and antigen-presenting B cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83:6080-6083. doi: 10.1073/pnas.83.16.6080
70. Kurowska M, Goudin N, Nehme NT, Court M, Garin J, Fischer A, de Saint Basile G, Menasche G (2012) Terminal transport of lytic granules to the immune synapse is mediated by the kinesin-1/Slp3/Rab27a complex. *Blood* 119:3879-3889. doi: 10.1182/blood-2011-09-382556
71. Lanna A, Vaz B, D'Ambra C, Valvo S, Vuotto C, Chiurciu V, Devine O, Sanchez M, Borsellino G, Akbar AN, De Bardi M, Gilroy DW, Dustin ML, Blumer B, Karin M (2022) An intercellular transfer of telomeres rescues T cells from senescence and promotes long-term immunological memory. *Nat Cell Biol* 24:1461-1474. doi: 10.1038/s41556-022-00991-z
72. Li X, Wu Y, Su Y, Rey-Suarez I, Matthaeus C, Updegrove TB, Wei Z, Zhang L, Sasaki H, Li Y, Guo M, Giannini JP, Vishwasrao HD, Chen J, Lee SJ, Shao L, Liu H, Ramamurthi KS, Taraska JW, Upadhyaya A, La Riviere P, Shroff H (2023) Three-dimensional structured illumination microscopy with enhanced axial resolution. *Nat Biotechnol*. doi: 10.1038/s41587-022-01651-1
73. Lim WM, Ito Y, Sakata-Sogawa K, Tokunaga M (2018) CLIP-170 is essential for MTOC repositioning during T cell activation by regulating dynein localisation on the cell surface. *Sci Rep* 8:17447. doi: 10.1038/s41598-018-35593-z

74. Low ZY, Zabidi NZ, Yip AJW, Puniyamurti A, Chow VTK, Lal SK (2022) SARS-CoV-2 non-structural proteins and their roles in host immune evasion. *Viruses* 14. doi: 10.3390/v14091991
75. Lui-Roberts WW, Stinchcombe JC, Ritter AT, Akhmanova A, Karakesisoglou I, Griffiths GM (2012) Cytotoxic T lymphocyte effector function is independent of nucleus-centrosome dissociation. *Eur J Immunol* 42:2132-2141. doi: 10.1002/eji.201242525
76. Maccari I, Zhao R, Peglow M, Schwarz K, Hornak I, Pasche M, Quintana A, Hoth M, Qu B, Rieger H (2016) Cytoskeleton rotation relocates mitochondria to the immunological synapse and increases calcium signals. *Cell Calcium* 60:309-321. doi: 10.1016/j.ceca.2016.06.007
77. Matsuda T, Cepko CL (2007) Controlled expression of transgenes introduced by in vivo electroporation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:1027-1032. doi: 10.1073/pnas.0610155104
78. Merzlyak EM, Goedhart J, Shcherbo D, Bulina ME, Shcheglov AS, Fradkov AF, Gaintzeva A, Lukyanov KA, Lukyanov S, Gadella TW, Chudakov DM (2007) Bright monomeric red fluorescent protein with an extended fluorescence lifetime. *Nat Methods* 4:555-557. doi: 10.1038/nmeth1062
79. Onnis A, Andreano E, Cassioli C, Finetti F, Della Bella C, Staufer O, Pantano E, Abbiento V, Marotta G, D'Elia MM, Rappuoli R, Baldari CT (2023) SARS-CoV-2 Spike protein suppresses CTL-mediated killing by inhibiting immune synapse assembly. *J Exp Med* 220. doi: 10.1084/jem.20220906
80. Parekh AB (1998) Slow feedback inhibition of calcium release-activated calcium current by calcium entry. *J Biol Chem* 273:14925-14932. doi: 10.1074/jbc.273.24.14925
81. Parham P (2021) *The immune system*. 5th ed. W.W. Norton & Company, New York. doi: (4th ed) 10.1201/9781317511571
82. Park CY, Hoover PJ, Mullins FM, Bachhawat P, Covington ED, Raunser S, Walz T, Garcia KC, Dolmetsch RE, Lewis RS (2009) STIM1 clusters and activates CRAC channels via direct binding of a cytosolic domain to Orai1. *Cell* 136:876-890. doi: 10.1016/j.cell.2009.02.014
83. Pattu V, Qu B, Marshall M, Becherer U, Junker C, Matti U, Schwarz EC, Krause E, Hoth M, Rettig J (2011) Syntaxin7 is required for lytic granule release from cytotoxic T lymphocytes. *Traffic* 12:890-901. doi: 10.1111/j.1600-0854.2011.01193.x
84. Peters PJ, Borst J, Oorschot V, Fukuda M, Krahenbuhl O, Tschopp J, Slot JW, Geuze HJ (1991) Cytotoxic T lymphocyte granules are secretory lysosomes, containing both perforin and granzymes. *J Exp Med* 173:1099-1109. doi: 10.1084/jem.173.5.1099

85. Power RM, Huisken J (2017) A guide to light-sheet fluorescence microscopy for multiscale imaging. *Nat Methods* 14:360-373. doi: 10.1038/nmeth.4224
86. Pulvertaft JV (1964) Cytology of Burkitt's tumour (african lymphoma). *Lancet* 1:238-240. doi: 10.1016/s0140-6736(64)92345-1
87. Qin Y, Jiang W, Li A, Gao M, Liu H, Gao Y, Tian X, Gong G (2021) The combination of paraformaldehyde and glutaraldehyde is a potential fixative for mitochondria. *Biomolecules* 11. doi: 10.3390/biom11050711
88. Qu B, Pattu V, Junker C, Schwarz EC, Bhat SS, Kummerow C, Marshall M, Matti U, Neumann F, Pfreundschuh M, Becherer U, Rieger H, Rettig J, Hoth M (2011) Docking of lytic granules at the immunological synapse in human CTL requires Vti1b-dependent pairing with CD3 endosomes. *J Immunol* 186:6894-6904. doi: 10.4049/jimmunol.1003471
89. Quintana A, Schwarz EC, Schwindling C, Lipp P, Kaestner L, Hoth M (2006) Sustained activity of calcium release-activated calcium channels requires translocation of mitochondria to the plasma membrane. *J Biol Chem* 281:40302-40309. doi: 10.1074/jbc.M607896200
90. Quintana A, Schwindling C, Wenning AS, Becherer U, Rettig J, Schwarz EC, Hoth M (2007) T cell activation requires mitochondrial translocation to the immunological synapse. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:14418-14423. doi: 10.1073/pnas.0703126104
91. Quintana A, Kummerow C, Junker C, Becherer U, Hoth M (2009) Morphological changes of T cells following formation of the immunological synapse modulate intracellular calcium signals. *Cell Calcium* 45:109-122. doi: 10.1016/j.ceca.2008.07.003
92. Quintana A, Pasche M, Junker C, Al-Ansary D, Rieger H, Kummerow C, Nunez L, Villalobos C, Meraner P, Becherer U, Rettig J, Niemeyer BA, Hoth M (2011) Calcium microdomains at the immunological synapse: how ORAI channels, mitochondria and calcium pumps generate local calcium signals for efficient T-cell activation. *EMBO J* 30:3895-3912. doi: 10.1038/emboj.2011.289
93. Raffaello A, De Stefani D, Rizzuto R (2012) The mitochondrial Ca(2+) uniporter. *Cell Calcium* 52:16-21. doi: 10.1016/j.ceca.2012.04.006
94. Riedl J, Crevenna AH, Kessenbrock K, Yu JH, Neukirchen D, Bista M, Bradke F, Jenne D, Holak TA, Werb Z, Sixt M, Wedlich-Soldner R (2008) Lifeact: a versatile marker to visualize F-actin. *Nat Methods* 5:605-607. doi: 10.1038/nmeth.1220

95. Ritter AT, Asano Y, Stinchcombe JC, Dieckmann NM, Chen BC, Gawden-Bone C, van Engelenburg S, Legant W, Gao L, Davidson MW, Betzig E, Lippincott-Schwartz J, Griffiths GM (2015) Actin depletion initiates events leading to granule secretion at the immunological synapse. *Immunity* 42:864-876. doi: 10.1016/j.immuni.2015.04.013
96. Ritter AT, Kapnick SM, Murugesan S, Schwartzberg PL, Griffiths GM, Lippincott-Schwartz J (2017) Cortical actin recovery at the immunological synapse leads to termination of lytic granule secretion in cytotoxic T lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 114:E6585-E6594. doi: 10.1073/pnas.1710751114
97. Ritter AT, Shtengel G, Xu CS, Weigel A, Hoffman DP, Freeman M, Iyer N, Alivodej N, Ackerman D, Voskoboinik I, Trapani J, Hess HF, Mellman I (2022) ESCRT-mediated membrane repair protects tumor-derived cells against T cell attack. *Science* 376:377-382. doi: 10.1126/science.abl3855
98. Rusan NM, Fagerstrom CJ, Yvon AM, Wadsworth P (2001) Cell cycle-dependent changes in microtubule dynamics in living cells expressing green fluorescent protein-alpha tubulin. *Mol Biol Cell* 12:971-980. doi: 10.1091/mbc.12.4.971
99. Sadjadi Z, Zhao R, Hoth M, Qu B, Rieger H (2020) Migration of cytotoxic T lymphocytes in 3D collagen matrices. *Biophys J* 119:2141-2152. doi: 10.1016/j.bpj.2020.10.020
100. Saeidi HR, Lohrasebi A, Mahnam K (2014) External electric field effects on the mechanical properties of the alphabeta-tubulin dimer of microtubules: a molecular dynamics study. *J Mol Model* 20:2395. doi: 10.1007/s00894-014-2395-1
101. Sambrook J, Russel RW (2001) *Molecular cloning: a laboratory manual*. 3rd vol. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
102. Sanchez-Madrid F, Serrador JM (2009) Bringing up the rear: defining the roles of the uropod. *Nat Rev Mol Cell Biol* 10:353-359. doi: 10.1038/nrm2680
103. Sanchez E, Liu X, Huse M (2019) Actin clearance promotes polarized dynein accumulation at the immunological synapse. *PLoS One* 14:e0210377. doi: 10.1371/journal.pone.0210377
104. Schaefer PM, Kalinina S, Rueck A, von Arnim CAF, von Einem B (2019) NADH autofluorescence-a marker on its way to boost bioenergetic research. *Cytometry A* 95:34-46. doi: 10.1002/cyto.a.23597
105. Schneider U, Schwenk HU, Bornkamm G (1977) Characterization of EBV-genome negative "null" and "T" cell lines derived from children with acute lymphoblastic leukemia and leukemic transformed non-Hodgkin lymphoma. *Int J Cancer* 19:621-626. doi: 10.1002/ijc.2910190505

106. Schoppmeyer R, Zhao R, Cheng H, Hamed M, Liu C, Zhou X, Schwarz EC, Zhou Y, Knorck A, Schwar G, Ji S, Liu L, Long J, Helms V, Hoth M, Yu X, Qu B (2017) Human profilin 1 is a negative regulator of CTL mediated cell-killing and migration. *Eur J Immunol* 47:1562-1572. doi: 10.1002/eji.201747124
107. Schoppmeyer R, Zhao R, Hoth M, Qu B (2018) Light-sheet microscopy for three-dimensional visualization of human immune cells. *J Vis Exp*. doi: 10.3791/57651
108. Schroeder LK, Barentine AES, Merta H, Schweighofer S, Zhang Y, Baddeley D, Bewersdorf J, Bahmanyar S (2019) Dynamic nanoscale morphology of the ER surveyed by STED microscopy. *J Cell Biol* 218:83-96. doi: 10.1083/jcb.201809107
109. Schwarz EC, Kummerow C, Wenning AS, Wagner K, Sappok A, Wagershauser K, Griesemer D, Strauss B, Wolfs MJ, Quintana A, Hoth M (2007) Calcium dependence of T cell proliferation following focal stimulation. *Eur J Immunol* 37:2723-2733. doi: 10.1002/eji.200737039
110. Shaner NC, Lin MZ, McKeown MR, Steinbach PA, Hazelwood KL, Davidson MW, Tsien RY (2008) Improving the photostability of bright monomeric orange and red fluorescent proteins. *Nat Methods* 5:545-551. doi: 10.1038/nmeth.1209
111. Song W, Bossy B, Martin OJ, Hicks A, Lubitz S, Knott AB, Bossy-Wetzel E (2008) Assessing mitochondrial morphology and dynamics using fluorescence wide-field microscopy and 3D image processing. *Methods* 46:295-303. doi: 10.1016/j.ymeth.2008.10.003
112. Stepanenko AA, Dmitrenko VV (2015) HEK293 in cell biology and cancer research: phenotype, karyotype, tumorigenicity, and stress-induced genome-phenotype evolution. *Gene* 569:182-190. doi: 10.1016/j.gene.2015.05.065
113. Stinchcombe JC, Bossi G, Booth S, Griffiths GM (2001) The immunological synapse of CTL contains a secretory domain and membrane bridges. *Immunity* 15:751-761. doi: 10.1016/s1074 7613(01)00234-5
114. Stinchcombe JC, Majorovits E, Bossi G, Fuller S, Griffiths GM (2006) Centrosome polarization delivers secretory granules to the immunological synapse. *Nature* 443:462-465. doi: 10.1038/nature05071
115. Stinchcombe JC, Salio M, Cerundolo V, Pende D, Arico M, Griffiths GM (2011) Centriole polarisation to the immunological synapse directs secretion from cytolytic cells of both the innate and adaptive immune systems. *BMC Biol* 9:45. doi: 10.1186/1741-7007-9-45

116. Stinchcombe JC, Randzavola LO, Angus KL, Mantell JM, Verkade P, Griffiths GM (2015) Mother centriole distal appendages mediate centrosome docking at the Immunological Synapse and reveal mechanistic parallels with ciliogenesis. *Curr Biol* 25:3239-3244.
doi: 10.1016/j.cub.2015.10.028
117. Tamzalit F, Tran D, Jin W, Boyko V, Bazzi H, Kepecs A, Kam LC, Anderson KV, Huse M (2020) Centrioles control the capacity, but not the specificity, of cytotoxic T cell killing. *Proc Natl Acad Sci U S A* 117:4310-4319. doi: 10.1073/pnas.1913220117
118. Taylor RC, Cullen SP, Martin SJ (2008) Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9:231-241. doi: 10.1038/nrm2312
119. Tixeira R, Phan TK, Caruso S, Shi B, Atkin-Smith GK, Nedeva C, Chow JDY, Puthalakath H, Hulett MD, Herold MJ, Poon IKH (2020) ROCK1 but not LIMK1 or PAK2 is a key regulator of apoptotic membrane blebbing and cell disassembly. *Cell Death Differ* 27:102-116.
doi: 10.1038/s41418-019-0342-5
120. Tojkander S, Gateva G, Lappalainen P (2012) Actin stress fibers--assembly, dynamics and biological roles. *J Cell Sci* 125:1855-1864. doi: 10.1242/jcs.098087
121. Trepast X, Chen Z, Jacobson K (2012) Cell migration. *Compr Physiol* 2:2369-2392.
doi: 10.1002/cphy.c110012
122. Urban E, Jacob S, Nemethova M, Resch GP, Small JV (2010) Electron tomography reveals unbranched networks of actin filaments in lamellipodia. *Nat Cell Biol* 12:429-435.
doi: 10.1038/ncb2044
123. Wang MS, Hu Y, Sanchez EE, Xie X, Roy NH, de Jesus M, Winer BY, Zale EA, Jin W, Sachar C, Lee JH, Hong Y, Kim M, Kam LC, Salaita K, Huse M (2022) Mechanically active integrins target lytic secretion at the immune synapse to facilitate cellular cytotoxicity. *Nat Commun* 13:3222. doi: 10.1038/s41467-022-30809-3
124. Webb DJ, Brown CM (2013) Epi-fluorescence microscopy. *Methods Mol Biol* 931:29-59.
doi: 10.1007/978-1-62703-056-4_2
125. Weiss A, Wiskocil RL, Stobo JD (1984) The role of T3 surface molecules in the activation of human T cells: a two-stimulus requirement for IL 2 production reflects events occurring at a pre-translational level. *J Immunol* 133:123-128.
126. Wiedemann A, Depoil D, Faroudi M, Valitutti S (2006) Cytotoxic T lymphocytes kill multiple targets simultaneously via spatiotemporal uncoupling of lytic and stimulatory synapses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:10985-10990. doi: 10.1073/pnas.0600651103

127. Yannelli JR, Sullivan JA, Mandell GL, Engelhard VH (1986) Reorientation and fusion of cytotoxic T lymphocyte granules after interaction with target cells as determined by high resolution cinemicrography. *J Immunol* 136:377-382.
128. Yi J, Wu X, Chung AH, Chen JK, Kapoor TM, Hammer JA (2013) Centrosome repositioning in T cells is biphasic and driven by microtubule end-on capture-shrinkage. *J Cell Biol* 202:779-792. doi: 10.1083/jcb.201301004
129. Yoon Y, Krueger EW, Oswald BJ, McNiven MA (2003) The mitochondrial protein hFis1 regulates mitochondrial fission in mammalian cells through an interaction with the dynamin-like protein DLP1. *Mol Cell Biol* 23:5409-5420. doi: 10.1128/MCB.23.15.5409-5420.2003
130. Zacharias DA, Violin JD, Newton AC, Tsien RY (2002) Partitioning of lipid-modified monomeric GFPs into membrane microdomains of live cells. *Science* 296:913-916. doi: 10.1126/science.1068539
131. Zhang M, Ma Z, Selliah N, Weiss G, Genin A, Finkel TH, Cron RQ (2014) The impact of Nucleofection(R) on the activation state of primary human CD4 T cells. *J Immunol Methods* 408:123-131. doi: 10.1016/j.jim.2014.05.014
132. Zhao R, Zhou X, Khan ES, Alansary D, Friedmann KS, Yang W, Schwarz EC, Del Campo A, Hoth M, Qu B (2021) Targeting the microtubule-network rescues CTL killing efficiency in dense 3D matrices. *Front Immunol* 12:729820. doi: 10.3389/fimmu.2021.729820
133. Zhou X, Friedmann KS, Lyrmann H, Zhou Y, Schoppmeyer R, Knorck A, Mang S, Hoxha C, Angenendt A, Backes CS, Mangerich C, Zhao R, Cappello S, Schwarz G, Hassig C, Neef M, Bufe B, Zufall F, Kruse K, Niemeyer BA, Lis A, Qu B, Kummerow C, Schwarz EC, Hoth M (2018) A calcium optimum for cytotoxic T lymphocyte and natural killer cell cytotoxicity. *J Physiol* 596:2681-2698. doi: 10.1113/JP274964

5.2 Bildquellen

Abbildung 1 a: Zeichnung nach histologischen Präparaten von mehrreihigem hochprismatischem Epithel mit Stereozilien. Zur Verfügung gestellt von **Ilse Vollmar-Hesse, Histonet2000**, unter der URL: histonet2000.de/images/zeichnungen/de/p012/p012_009.jpg

Abbildung 1 b: Zeichnung nach Transmissions-Elektronenmikroskopie (TEM)-Aufnahme eines Schnittes durch eine exokrine Bauchspeichel-Drüsenzelle aus **Bils und Dürr (1984)**. Zur Verfügung gestellt vom Land Baden-Württemberg unter der URL: lehrerfortbildung-bw.de/u_matnatech/bio/gym/bp2004/fb4/1_mem/3_transport/5_folie/zelle_2.jpg

Abbildung 2: Typische Fluoreszenzaufnahme fixierter adhärenter Zellen. Die Aufnahme wurde von **Excelitas PCO GmbH** (Kelheim) in der PCO ‚Pixelfly‘ Bilder-Galerie veröffentlicht, unter der URL: pco.de/fileadmin/_processed_/4/c/csm_pco_pixelfly_gal_ovaryEpithelialCells_p1020_607a073934.jpg
Die Nutzung erfolgt mit freundlicher Erlaubnis der Excelitas PCO GmbH.

Abbildung 3 a: Zeitrafferaufnahme einer mit anti-Fas-Antikörpern inkubierten Jurkat CD4⁺ T-Zelle mit Ausbildung apoptotischer Membran-Bläschen aus **Tixeira et al. (2020)** (**Abbildung 1 b**), editiert.

Abbildung 3 b: Scanning-Elektronenmikroskopie (SEM)-Aufnahme einer apoptotischen HeLa-Zelle. Im Jahr 2013 veröffentlicht von **National Institutes of Health** (Bethesda) über Wikipedia unter der URL: de.wikipedia.org/wiki/HeLa-Zellen#/media/Datei:HeLa-IV.jpg

Abbildung 4 a: Schematischer Aufbau und Transmissions-Elektronenmikroskopie (TEM)-Aufnahme (von **Roger Craig**) eines Aktin-Filaments aus **Alberts (2015)** (**Abbildung 16-11 B & C**), editiert.

Abbildung 4 b: Epi-Fluoreszenz- und TIRF-Aufnahme von Aktin in Fibroblasten und Transmissions-Elektronenmikroskopie (TEM)-Aufnahme eines Lamellopodiums. Aufnahmen aus **Urban et al. (2010)**. Bild zusammengestellt vom **Institut für Molekulare Biotechnologie (IMBA, Wien)** und im Jahr 2010 veröffentlicht unter der URL: oeaw.ac.at/fileadmin/_processed_/5/c/csm_Aktin1_b2159dbae1.jpg

Abbildung 5 a: (1/2) Bändermodell-Darstellung von assoziierten α - und β -Tubulin-Proteinen und schematischer Aufbau von Tubulin-Protofilamenten und -Filamenten aus **Saeidi, Lohrasebi und Mahnam (2014)** (**Abbildung 1**), editiert. (2/2) Transmissions-Elektronenmikroskopie (TEM)-Aufnahmen von Tubulin-Filamenten (Frontansicht von **Richard Linck**, Seitenansicht von **Richard Wade**) aus **Alberts (2015)** (**Abbildung 16-42 D & E**).

Abbildung 5 b: (1/2) Schematische Darstellung des Säugetier Zentrosom-Komplexes mit Mutter- und Tochter-Zentriolen aus *Buhler und Stolz (2022)* (**Abbildung 1**), editiert. (2/2) Transmissions-Elektronenmikroskopie-Aufnahme von Zentriolen aus *Stinchcombe et al. (2015)* (**Abbildung 1 A**).

Abbildung 5 c: Antikörper-Färbung gegen α -Tubulin in fixierten sekretorischen „U-2 OS“ Zellen. Aufnahme von **Abcam plc** (Cambridge), veröffentlicht unter der URL: abcam.com/cms/displayImage.cfm?intImageID=3343

Die Nutzung geschieht mit freundlicher Erlaubnis von Abcam plc.

Abbildung 6: Zeitraffer-Konfokalmikroskopie-Aufnahme einer mitotischen HeLa-Zelle, editiert. Die Aufnahme wurde erstellt von **Joël Beadoun** (Ellenberg Gruppe, EMBL, Heidelberg) und im Jahr 2008 veröffentlicht unter der URL: www.mitocheck.org/gfx/banner.jpg

Abbildung 7: Schematische Darstellung einer tierischen Zelle mit Organellen. Erstellt von 'MesserWoland' und 'Sczegan1990' und im Jahr 2006 veröffentlicht über Wikipedia ‚common license‘ unter der URL: commons.wikimedia.org/wiki/File:Biological_cell.svg

Abbildung 8: Schematische Darstellung der Transportwege endozytotischer und sekretorischer Vesikel aus *Alberts (2015)* (**Abbildung 13-3 B**), editiert.

Abbildung 9: „Leading Edge“- und Uropod-Ausbildung in T-Zellen, Schema. Aus *Sanchez-Madrid und Serrador (2009)* (**Abbildung 1 a-c**), editiert.

Abbildung 10 a: Zeitrafferaufnahme einer „OT-I“ Maus CD8⁺ T-Zelle im Kontakt mit einer stimulierenden Maus T-Zelle aus *Parham (2021)* (**Abbildung 8-26**), editiert. Aufnahme von **Alex T. Ritter** und **Gillian M. Griffiths**.

Abbildung 10 b: Transmissions-Elektronenmikroskopie (TEM)-Aufnahmen von Maus CD8⁺ T-Zellen im Kontakt mit unstimulierenden und stimulierenden Maus T-Zellen aus *Stinchcombe et al. (2015)* (**Abbildung 1 A & C**), editiert.

Abbildung 41 b & c: Orail-Akkumulationen in Jurkat CD4⁺ T-Zellen bei Ausbildung Immunologischer Synapsen: enthält Bestandteile aus *Quintana et al. (2011)* (**Abbildung 1 & 2**), editiert und erweitert.

Abbildung 45: Unvollständige IS-Ausbildung in der repräsentativen Beispielaufnahme zur Mitochondrien-Dynamik bei IS-Ausbildung aus *He et al. (2019)* (**Abbildung 4 a**), editiert.

Abbildung 46: Optimierte Darstellung relevanter Teile von Abbildung 1 aus *Stinchcombe et al. (2006)* (**Abbildung 1 e-h & j**), editiert.

6 Anhang

6.1 Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	englisch	deutsch
ACE	angiotensin converting enzyme	Angiotensin-umwandelndes Enzym
AK	antibody	Antikörper
AM	acetoxymethyl	Acetoxymethyl
APC	antigen presenting cell	Antigen-präsentierende Zelle
APS	ammonium persulfate	Ammoniumpersulfat
ATP	adenosine triphosphate	Adenosintriphosphat
BSA	bovine serum albumine	bovines Serum-Albumin
CAR	chimeric antigen receptor	chimärischer Antigen-Rezeptor
CCD	charge-coupled device	ladungsgekoppeltes Bauteil
CD	cluster of differentiation	Differenzierungsgruppen
COX	cyclooxygenase	Cyclooxygenase
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole	4',6-Diamidin-2-phenylindol
(d)DNS	(double-stranded) deoxyribonucleic acid	(doppelsträngige) Desoxyribonukleinsäure
DMEM	Dulbecco's modified Eagle medium	Dulbeccos modifiziertes Eagle-Medium
DMSO	dimethyl sulfoxide	Dimethylsulfoxid
dNTP	deoxyribonucleotide triphosphate	Desoxyribonukleotid-triphosphat
DPBS	Dulbecco's phosphate buffered saline	Dulbeccos Phosphat-gepufferte Kochsalz-Lösung
EDTA	etheylenediaminetetraacetic acid	Ethylendiamintetraessigsäure
EMCCD	electron multiplier charge-coupled device	Elektronen-vervielfältigendes ladungsgekoppeltes Bauteil
ER	endoplasmic reticulum	Endoplasmatisches Retikulum
FCS	fetal calf serum	fetales Kälber-Serum
FRET	Foerster resonance energy transfer	Förster Resonanz Energie-Transfer
FWHM	full width at half maximum	volle Weite bei halbem Maximum
HA	hemagglutinin	Hämagglutinin
HBSS	Hank's balanced salt solution	Hanks balancierte Salzlösung
hDrp	human dynamin-related protein	humanes Dynamin-assoziiertes Protein
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1- piperazineethanesulfonic acid	4-(2-Hydroxyethyl)-1- piperazinylethansulfonsäure
HF	brightfield	Hellfeld
hFis	human fission protein	humanes Fissions-Protein
HPV	human papilloma virus	humanes Papillomvirus
ICAM	intercellular adhesion molecule	Interzelluläres Adhäsions-Molekül
IL	interleukin	Interleukin
IP ₃	inositol-1,4,5-trisphosphate	Inositol-1,4,5-trisphosphate
IS	immunological synapse	Immunologische Synapse
LED	light emitting diode	Licht-emittierende Diode

Anhang

LFA	lymphocyte function-associated antigen	Lymphozyten-Funktion assoziiertes Antigen
LG	lytic granules	Lytische Granula
LR	laser refraction	Laser Refraktion
LSM	laser scanning microscopy	Laser-Raster Mikroskopie
MCU	mitochondrial calcium uniporter	mitochondrialer Kalzium Uniporter
(m)EGFP	(monomeric) enhanced green fluorescent protein	(monomerisches) verbessertes grün-fluoreszierendes Protein
MHC	major histocompatibility complex	Histokompatibilitäts-Komplex
MIP	maximum-intensity projection	Maximal-Intensitäts-Projektion
mTFP	monomeric teal fluorescent protein	monomerisches grünblau-fluoreszierendes Protein
n	refraction index	Brechungsindex
NA	numerical aperture	Numerische Apertur
NADH	nicotinamide adenine dinucleotide + hydrogen	Nicotinamidadeninukleotid + Wasserstoff
NFAT	nuclear factor of activated T cells	nuklearer Faktor aktivierter T-Zellen
NK	natural killer	natürliche Killer
NSP	non-structural proteins	nicht-strukturelle Proteine
PBL	peripheral blood lymphocytes	periphere Blutlymphozyten
PCM	pericentriolar material	perizentriolares Material
PCR	polymerase chain reaction	Polymerase-Kettenreaktion
PFA	paraformaldehyde	Paraformaldehyd
PM	plasma membrane	Plasmamembran
PMCA	plasma membrane calcium ATPase	Plasmamembran Kalzium-ATPase
PSF	point spread function	Punkt-Ausbreitungs-Funktion
RFP	red fluorescent protein	rot-fluoreszierendes Protein
RILP	Rab-interacting lysosomal protein	mit Rab interagierendes lysosomales Protein
ROI	region of interest	Messbereich
RT	room temperature	Raumtemperatur
SARS-CoV	severe acute respiratory syndrome coronavirus	schwerwiegendes akutes Atemwegssyndrom Coronavirus
SD	standard deviation	Standardabweichung
SEA / SEE	<i>Staphylococcus aureus</i> enterotoxin A / E	<i>Staphylococcus aureus</i> Enterotoxin A / E
S.E.M.	standard error of the mean	Standardfehler des Mittelwerts
SEM	scanning electron microscopy	Raster Elektronen-Mikroskopie
SERCA	sarco/endoplasmic reticulum calcium ATPase	Sarko/Endoplasmatisches Retikulum Kalzium-ATPase
SIM	structured-illumination microscopy	strukturierte Beleuchtungs-Mikroskopie
SLB	supported lipid bilayer	unterstützte Lipid-Doppelschicht
c / p / d SMAC	central / peripheral / distal supramolecular activation cluster	zentraler / peripherer / distaler supramolekularer Aktivierungskomplex
SOCE	store operated calcium entry	Speicher-vermittelter Kalziumeinstrom

STED	stimulated emission depletion	stimulierte Emissions-Verringerung
STIM	stromal interaction molecule	stromaständiges Interaktionsmolekül
TBE	TRIS/Borate/EDTA	TRIS/Borat/EDTA
TCR	T cell receptor	T-Zell-Rezeptor
TEM	transmission electron microscopy	Transmissions-Elektronen-Mikroskopie
TEMED	Tetramethylethylenediamine	Tetramethylethylendiamin
TIRF	total internal reflection fluorescence microscopy	interne Totalreflexions- Fluoreszenz-Mikroskopie
TMRM	Tetramethylrhodamine methyl ester	Tetramethylrhodamin-methyl Ester
TRAIL	tumor necrosis factor related apoptosis inducing ligand	Tumor-Nekrose-Faktor assoziierter Apoptose-induzierender Ligand
TRIS	tris(hydroxymethyl)aminomethane	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
USB	universal serial bus	universelle serielle Verbindung
UV	ultraviolet	ultraviolett
V max/min/∅	speed maximal/minimal/mean	Geschwindigkeit maximal/minimal/durchschnittlich
VCAM	vascular cell adhesion molecule	vaskuläres Zell-Adhäsionsmolekül
γTuRC	gamma-tubulin ring complex	gamma-Tubulin Ring Komplex
∅	mean	durchschnittlich

6.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Beispiele für Zell-Polarisation im Zellverband (a) und Zellinneren (b)	- 12 -
Abbildung 2: Typische Fluoreszenzaufnahme fixierter adhärenter Zellen	- 13 -
Abbildung 3: Hellfeld- und SEM-Aufnahmen apoptotischer Zellen.....	- 14 -
Abbildung 4: Aktin-Filament Aufbau (a) und Aufnahmen von Aktin in Fibroblasten (b).....	- 15 -
Abbildung 5: Tubulin-Filament- und Zentrosom-Aufbau.....	- 16 -
Abbildung 6: Fluoreszenz-Zeitrafferaufnahme einer HeLa-Zelle in der Mitose.....	- 16 -
Abbildung 7: Schematische Darstellung einer tierischen Zelle mit Organellen.....	- 17 -
Abbildung 8: Transportwege endozytotischer und sekretorischer Vesikel	- 19 -
Abbildung 9: „Leading Edge“- und Uropod-Ausbildung in T-Zellen.....	- 20 -
Abbildung 10: Maus CD8 ⁺ T-Zell-Polarisation	- 22 -
Abbildung 11: FWHM-Berechnung und -Messung	- 49 -
Abbildung 12: Z-Stapel-Aufnahmen von auf Glas-Deckgläsern kultivierten HeLa-Zellen.....	- 53 -
Abbildung 13: Z-Stapel-Aufnahmen von auf Glas-Deckgläsern aufgebrauchten T-Zellen.....	- 57 -
Abbildung 14: Morphologische Zellformen von auf Glas-Deckgläsern aufgebrauchten T-Zellen	- 60 -
Abbildung 15: Prozentueller Anteil von T-Zellen mit Deckglas-Interaktion nach 5 und 30 min.....	- 63 -
Abbildung 16: Fluoreszenz-Z-Stapel-Aufnahmen von Lifeact-mEGFP-transfizierten Zellen.....	- 65 -
Abbildung 17: Manuelles XY-Tracking von Lamellopodien stationärer Bead-stimulierter CD8 ⁺ T-Zellen.....	- 66 -
Abbildung 18: Aktin-Dynamik in migrierenden SEA-stimulierten CD8 ⁺ T-Zellen	- 67 -
Abbildung 19: Zellkern-Morphologie in HeLa- und T-Zellen.....	- 69 -
Abbildung 20: ER-Morphologie in HeLa-Zellen und Jurkat CD4 ⁺ T-Zellen	- 71 -

Abbildung 21: Tubulin-Morphologie und Zentrosom-Lokalisation in HeLa-Zellen.....	- 73 -
Abbildung 22: Tubulin-Morphologie und Zentrosom-Lokalisation in T-Zellen.....	- 74 -
Abbildung 23: Zentrosom-Lokalisation in formveränderten T-Zellen	- 75 -
Abbildung 24: Zentrosom-Position in Zeitrafferaufnahmen von SEA-stimulierten CD8 ⁺ T-Zellen und Geschwindigkeiten bei Uropod-Bewegung	- 77 -
Abbildung 25: Mitochondrien-Morphologie und -Akkumulationen in HeLa-Zellen.....	- 79 -
Abbildung 26: Mitochondrien-Morphologie und -Akkumulationen in runden und abgeflachten T-Zellen	- 80 -
Abbildung 27: Mitochondrien-Akkumulationen in gestreckten CD8 ⁺ T-Zellen.....	- 81 -
Abbildung 28: Mitochondrien-Morphologie und -Lokalisation nach Überexpression mitochondrialer Fissions-Proteine in Jurkat CD4 ⁺ T-Zellen.....	- 83 -
Abbildung 29: Lokalisationen und Akkumulationen endozytierter Vesikel in HeLa- und T-Zellen.....	- 85 -
Abbildung 30: Endosomale CD3- und Perforin-enthaltende Vesikel in „Bead“-stimulierten CD8 ⁺ T-Zellen und semi-automatische Nachverfolgung	- 87 -
Abbildung 31: Volumenmessungen von HeLa, Jurkat CD4 ⁺ , naiven CD8 ⁺ und SEA-stimulierten CD8 ⁺ T-Zellen.....	- 90 -
Abbildung 32: T-Zellform, Zentrosom-Dynamik und B-Zell-Apoptose bei CD8 ⁺ -Raji Kontakten	- 94 -
Abbildung 33: T-Zell Mitochondrien-Dynamik und -Geschwindigkeiten bei CD8 ⁺ -Raji Kontakten	- 98 -
Abbildung 34: T-Zellform-, Zentrosom- und Perforin-Dynamik bei Deckglas-Ablösung während CD8 ⁺ -Raji Kontakt.....	- 101 -
Abbildung 35: T-Zellform-, Zentrosom-, anti-CD3-Antikörper- und Aktin-Dynamik bei direkten und gestreckten CD8 ⁺ -Raji Kontakten.....	- 104 -
Abbildung 36: Doppelkontakt mehrfach-gefärbter SEA-stimulierter CD8 ⁺ T-Zellen mit SEA-beladenen Raji B-Zellen	- 106 -
Abbildung 37: Analyse aller durchgeführten Einzelzell-Experimente mit CD8 ⁺ -Raji Kontakten.....	- 108 -
Abbildung 38: T-Zellform-, Aktin-, CD3-, Orai1- und Mitochondrien- Dynamik von Jurkat CD4 ⁺ T-Zellen im direkten und gestreckten Kontakt mit SEE-beladenen Raji B-Zellen.....	- 110 -
Abbildung 39: Doppelkontakt mehrfach-gefärbter Jurkat CD4 ⁺ T-Zellen mit SEE-beladenen Raji B-Zellen	- 112 -
Abbildung 40: Analyse aller detektierten Zellbestandteile bei Jurkat-Raji-Kontakten	- 114 -
Abbildung 41: Orai1- und STIM1-Dynamik und Orai1-Akkumulationen in Jurkat CD4 ⁺ T-Zellen bei Ausbildung Immunologischer Synapsen	- 118 -
Abbildung 42: Zusammenstellung berechneter Geschwindigkeiten von Zellen, Zentrosom und Organellen.....	- 121 -
Abbildung 43: Polarisation von HeLa- und T-Zellen auf Glas-Deckgläsern und bei Mitose.....	-133 -
Abbildung 44: Polarisation von auf Glas-Deckgläsern adhärenen T-Zellen bei der Ausbildung Immunologischer Synapsen	- 134 -
Abbildung 45: Unvollständige IS-Ausbildung in der repräsentativen Beispielaufnahme zur Mitochondrien-Dynamik bei IS-Ausbildung aus <i>He et al. (2019) (Abbildung 4 a)</i>	- 139 -
Abbildung 46: Optimierte Darstellung relevanter Teile von <i>Abbildung 1</i> aus <i>Stinchcombe et al. (2006)</i>	- 141 -
Abbildung 47: Schemata für serielle (a) bzw. parallele (b) Zielzell-Abtötung.....	- 142 -
Abbildung 48: Modell der Zell-Polarisation in ruhenden (a) und migrierenden (b) T-Zellen und während allen Phasen der Ausbildung Immunologischer Synapsen (c i-iii)	- 145 -

6.3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Chemikalienliste mit Bezugsquelle und Bestellnummer, alphabetisch geordnet.....	- 26 -
Tabelle 2: Medien und Pufferlösungen mit Hersteller und Zusammensetzung / Bestellnummer	- 27 -
Tabelle 3: Hersteller-„Kits“ mit Bestellnummer, alphabetisch geordnet	- 27 -
Tabelle 4: Antikörper-Liste mit Eigenschaften, Hersteller und Bestellnummer / Referenz	- 27 -
Tabelle 5: Plasmid-Liste mit Bezeichnung, Zielsequenz, Bezugsquelle und Referenz	- 28 -
Tabelle 6: Liste genutzter Mikropartikel („Beads“) mit Durchmesser, Eigenschaften und Bezug.....	- 28 -
Tabelle 7: Liste genutzter Zellen mit Bezugsquelle, Bestellnummer und Referenz.....	- 29 -
Tabelle 8: Geräte-Liste mit Komponenten, Bezugsquelle und Bestellnummer, falls verfügbar.....	- 29 -
Tabelle 9: Software-Liste mit Version, Modulen, Einsatz und Hersteller, alphabetisch geordnet	- 30 -
Tabelle 10: Parameter aller Epi-Fluoreszenz Einzelzeitpunkt-Experimente	- 39 -
Tabelle 11-1: Parameter aller mikroskopischen Zeitraffer-Experimente 1/2	- 40 -
Tabelle 11-2: Parameter aller mikroskopischen Zeitraffer-Experimente 2/2.....	- 42 -
Tabelle 12: Parameter aller Laser-Scanning-Mikroskopie (LSM)-Einzelzeitpunkt-Experimente	- 43 -
Tabelle 13: Parameter aller TIRF-Experimente	- 44 -
Tabelle 14: Halbwertsbreiten (FWHM)-Berechnung und -Messung	- 48 -
Tabelle 15: Volumen-Messungen und Organell-Anteile am Gesamt-Zellvolumen	- 89 -
Tabelle 16: Zusammenstellung berechneter Geschwindigkeiten von Zellen, Zentrosom und Organellen.....	- 120 -

6.4 Filmverzeichnis

- Film 1: Aktin-Dynamik einer stationären Bead-stimulierten CD8⁺ T-Zelle bei starken Zellformänderungen.
URL: dropbox.com/s/yguwx2x30jg7ljj/Film1.AVI?dl=0
- Film 2: Aktin-Dynamik einer migrierenden SEA-stimulierten CD8⁺ T-Zelle mit Fein-Auflösung am Deckglas durch TIRF-Mikroskopie. URL: dropbox.com/s/gdbe4q6rz749mog/Film2.AVI?dl=0
- Film 3: Starke Zellformänderungen einer stationären SEA-stimulierten CD8⁺ T-Zelle mit Zentrosom- und Zytosol-Markierung. URL: dropbox.com/s/8vt3llc9dmo8qao/Film3.AVI?dl=0
- Film 4: Zellformänderungen und Zentrosom-Lokalisation einer SEA-stimulierten CD8⁺ T-Zelle bei Migration über das Deckglas. URL: dropbox.com/s/w6luyhefv7iiji/Film4.AVI?dl=0
- Film 5: Bewegungen von Perforin-Vesikeln und endozytierten CD3-Vesikeln in einer Bead-stimulierten CD8⁺ T-Zelle. URL: dropbox.com/s/8iq4n8pnmdylcjx/Film5.AVI?dl=0
- Film 6a: Direkter Kontakt mit Ausbildung einer stabilen Immunologischen Synapse zwischen SEA-beladener B-Zelle und SEA-stimulierter CD8⁺ T-Zelle mit Zentrosom- und Zytosol-Markierung. URL: dropbox.com/s/shgeigvf53fz7av/Film6a.AVI?dl=0
- Film 6b: Gestreckter Kontakt mit Ausbildung einer stabilen Immunologischen Synapse zwischen SEA-beladener B-Zelle und SEA-stimulierter CD8⁺ T-Zelle mit Zentrosom- und Zytosol-Markierung. URL: dropbox.com/s/0qmcsxmakszdn6b/Film6b.AVI?dl=0
- Film 6c: Gestreckter Kontakt mit unvollständiger Ausbildung einer Immunologischen Synapse zwischen SEA-beladener B-Zelle und SEA-stimulierter CD8⁺ T-Zelle mit Zentrosom- und Zytosol-Markierung. URL: dropbox.com/s/9583rrx7azakpb3/Film6c.AVI?dl=0

- Film 7a: Einzel-Mitochondrien-Dynamik SEA-stimulierter CD8⁺ T-Zellen bei direktem und gestrecktem Kontakt und Ausbildung stabiler Immunologischer Synapsen mit SEA-beladener B-Zelle.
URL: dropbox.com/s/mqg9tadf8gena1x/Film7a.AVI?dl=0
- Film 7b: Mitochondrien-Dynamik und Kalziumeinstrom in SEA-stimulierten T-Zellen bei Ausbildung stabiler Immunologischer Synapsen mit SEA-beladener B-Zelle und Deckglas-Ablösung.
URL: dropbox.com/s/xbc8n5hypp0w20v/Film7b.AVI?dl=0
- Film 7c: Zellformänderungen und Mitochondrien-Dynamik einer gestreckten SEA-stimulierten CD8⁺ T-Zelle bei Ausbildung einer stabilen Immunologischen Synapse mit einer SEA-beladenen B-Zelle.
URL: dropbox.com/s/Ofkvsuxguty1su/Film7c.AVI?dl=0
- Film 8: Tubulin- und Perforin-Dynamik einer SEA-stimulierten CD8⁺ T-Zelle mit Deckglas-Ablösung bei Abtötung einer SEA-beladenen B-Zelle. URL: dropbox.com/s/ldvkmjh89ztvid8/Film8.AVI?dl=0
- Film 9a: Zentrosom-, CD3- und Mitochondrien-Dynamik einer SEA-stimulierten CD8⁺ T-Zelle im direkten Kontakt und Ausbildung einer stabilen Immunologischen Synapse mit einer SEA-beladenen B-Zelle. URL: dropbox.com/s/zpzxphanlxldgvo/Film9a.AVI?dl=0
- Film 9b: Aktin-, Zentrosom-, CD3- und Mitochondrien-Dynamik einer auf dem Deckglas gestreckten SEA-stimulierten CD8⁺ T-Zelle bei Abtötung einer SEA-beladenen B-Zelle.
URL: dropbox.com/s/q1oal0t62fcgno1/Film9b.AVI?dl=0
- Film 10: Aktin-, Zentrosom-, CD3- und Mitochondrien-Dynamik einer SEA-stimulierten CD8⁺ T-Zelle bei gleichzeitiger Abtötung zweier SEA-beladener B-Zellen und Ausbildung von zwei stabilen Immunologischen Synapse. URL: dropbox.com/s/q7pskm9vw6rvj1e/Film10.AVI?dl=0
- Film 11a: Aktin-, CD3-, Mitochondrien- und Orai1-Dynamik einer Jurkat CD4⁺ T-Zelle im direkten Kontakt und Ausbildung einer stabilen Immunologischen Synapse mit einer SEE-beladenen B-Zelle.
URL: dropbox.com/s/mn8hppcm27pe0p6/Film11a.AVI?dl=0
- Film 11b: Aktin-, CD3-, Mitochondrien- und Orai1-Dynamik einer Jurkat CD4⁺ T-Zelle bei Kontakt und unvollständiger Ausbildung einer Immunologischen Synapse mit einer SEE-beladenen B-Zelle.
URL: dropbox.com/s/forrrbqa39nir1k/Film11b.AVI?dl=0
- Film 12: Aktin-, CD3-, Mitochondrien- und Orai1-Dynamik einer Jurkat CD4⁺ T-Zelle bei Mehrfachkontakt und Ausbildung von zwei stabilen Immunologischen Synapse mit zwei SEE-beladenen B-Zellen.
URL: dropbox.com/s/gb3t7tb2iso2i3c/Film12.AVI?dl=0
- Film 13: Orai1-, STIM1- und Mitochondrien-Dynamik einer Jurkat CD4⁺ T-Zelle bei Ausbildung einer stabilen Immunologischen Synapse mit einer SEE-beladenen B-Zelle.
URL: dropbox.com/s/kq1fd8qadh8b6zf/Film13.AVI?dl=0
- Film 14: Alex T. Ritter „ASCB Celldance 2014“ Wettbewerbs-Beitrag: Aktin-Dynamik bei Deckglas-Migration, sowie Lytische Granula bei Ausbildung Immunologischer Synapsen und bei Abtötung von Zielzellen. URL: youtu.be/jLCNwHxpNzg
- Film 15: Mitochondrien-Dynamik und Kalziumeinstrom in einer CD4⁺ T-Zelle bei unvollständiger Ausbildung einer Immunologischen Synapse mit einer stimulierenden Zielzelle. URL: journals.aai.org/jimmunol/article-supplement/107401/mov/ji_1800299_supplemental_video_2

7 Publikationen

Eisenbeis J, Peisker H, Backes CS, Bur S, Holters S, Thewes N, Greiner M, **Junker C**, Schwarz EC, Hoth M, Junker K, Preissner KT, Jacobs K, Herrmann M, Bischoff M (2017) The extracellular adherence protein (Eap) of *Staphylococcus aureus* acts as a proliferation and migration repressing factor that alters the cell morphology of keratinocytes.

Int J Med Microbiol 307:116-125. doi: 10.1016/j.ijmm.2017.01.002

Quintana A*, Pasche M*, **Junker C***, Alansary D, Rieger H, Kummerow C, Nunez L, Villalobos C, Meraner P, Becherer U, Rettig J, Niemeyer BA, Hoth M (2011) Calcium microdomains at the immunological synapse: how ORAI channels, mitochondria and calcium pumps generate local calcium signals for efficient T-cell activation.

EMBO J 30:3895-3912. doi: 10.1038/emboj.2011.289

Qu B*, Pattu V*, **Junker C**, Schwarz EC, Bhat SS, Kummerow C, Marshall M, Matti U, Neumann F, Pfreundschuh M, Becherer U, Rieger H, Rettig J, Hoth M (2011) Docking of lytic granules at the immunological synapse in human CTL requires Vti1b-dependent pairing with CD3 endosomes.

J Immunol 186:6894-6904. doi: 10.4049/jimmunol.1003471

Pattu V*, Qu B*, Marshall M, Becherer U, **Junker C**, Matti U, Schwarz EC, Krause E, Hoth M, Rettig J (2011) Syntaxin7 is required for lytic granule release from cytotoxic T lymphocytes.

Traffic 12:890-911. doi: 10.1111/j.1600-0854.2011.01193.x

Junker C, Hoth M (2011) Immune synapses: mitochondrial morphology matters.

EMBO J 30:1187-1189. doi: 10.1038/emboj.2011.72

Quintana A, Kummerow C, **Junker C**, Becherer U, Hoth M (2009) Morphological changes of T cells following formation of the immunological synapse modulate intracellular calcium signals.

Cell Calcium 45:109-122. doi: 10.1016/j.ceca.2008.07.003

Kummerow C, **Junker C**, Kruse K, Rieger H, Quintana A, Hoth M (2009) The immunological synapse controls local and global calcium signals in T lymphocytes.

Immunol Rev 231:132-147. doi: 10.1111/j.1600-065X.2009.00811.x

* diese Autoren haben gleichwertig zu dieser Veröffentlichung beigetragen

8 Danksagung

Ich danke meiner gesamten Familie und meinen Freunden für die gesamte Unterstützung über die vielen Jahre. Vor allem möchte ich meinen Kindern danken, die mir immer die Kraft gegeben haben, weiterzumachen. Ich möchte diese Arbeit insbesondere meinen Großeltern widmen, welche die Vollendung dieses Werks leider nicht mehr miterleben konnten.

Ein besonderer Dank geht an Markus Hoth für seinen immerwährenden Optimismus, seine unendliche Geduld und seine stete Unterstützung. Ebenso an Barbara Niemeyer für die exzellente Unterstützung bei der Planung molekularbiologischer Methoden und Dalia Alansary für unzählige Dinge wie Plasmide, Präparationen und jedwede Unterstützung.

Mein herzlicher Dank geht an Andrea Armbrüster, Anja Ludes, Bettina Strauß, Carmen Hässig, Carmen Mangerich, Claudia Kilter, Cora Hoxha und Gertrud Schwär für die exzellente technische Arbeit bei der Isolation von Zellen, der Zellkultur und/oder molekularbiologischen Methoden.

Mein Dank geht auch an Bin Qu und Varsha Pattu für die Bereitstellung von Zellen und Plasmiden, sowie Jens Rettig und Ute Becherer für die Bereitstellung der LSM- bzw. TIRF Mikroskope.

Regine Kaleja danke ich für die ausgezeichnete Abwicklung aller bürokratischen Dinge. Rüdiger Stumpf danke ich für die exzellente handwerkliche Unterstützung wie z.B. die Anfertigung der Deckglas-Halter. Vielen Dank auch an Gerhard Bračić für alle IT-technischen Dinge und die interessanten Diskussionen.

Allen aktuellen und ehemaligen Mitgliedern des Labors danke ich für die immer angenehme Atmosphäre, fruchtbare Diskussionen und jedwede Unterstützung. Johannes Koch danke ich für das Lesen der Arbeit.

Ein besonderer Dank geht auch an Ralph Schöneborn, ohne dessen Geduld und Vertrauen diese Arbeit nichtmehr zustande gekommen wäre.

Alexey Khodjakov, Connie Cepko, Norbert Blum, Patricia Wadsworth, Roland Wedlich-Soldner und Yisang Yoon danke ich für die Bereitstellung von Plasmiden.

Den Firmen Abcam plc und Excelitas PCO GmbH danke ich für die Freigabe zur Nutzung von Bildern.

Lebenslauf

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