

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

# Mitochondrienlokalisation und Kalziumsignale nach Bildung der Immunologischen Synapse

Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors  
der Naturwissenschaften der medizinischen Fakultät

der Universität des Saarlandes

2009

vorgelegt von

**Christian Daniel Schwindling**

geboren am: 21.02.1978 in Völklingen

Die experimentellen Arbeiten im Rahmen der vorliegenden Diplomarbeit wurden am physiologischen Institut und am Institut für Biophysik der Universität des Saarlandes durchgeführt.

Erstgutachter: Prof. Dr. Markus Hoth

Zweitgutachter: Prof. Dr. Richard Zimmermann

## Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>5</b>
<b>2</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>7</b>
<b>3</b>	<b>Abstract</b>	<b>8</b>
3.1	Functions of mitochondria during T-cell activation . . . . .	8
<b>4</b>	<b>Einleitung</b>	<b>9</b>
4.1	Funktionen von T-Zellen im Immunsystem . . . . .	9
4.2	Die Immunologische Synapse . . . . .	10
4.3	Kalziumabhängige Signaltransduktion in T-Zellen . . . . .	12
4.4	Funktionen des CRAC/Orai Kanals in T-Zellen . . . . .	14
4.4.1	Der CRAC/Orai-Kanal . . . . .	14
4.4.2	Orai-Proteine: Untereinheiten des CRAC-Kanals . . . . .	16
4.4.3	STIM-Proteine: Funktionen während der T-Zell Akti- vierung . . . . .	17
4.5	Funktionen von Mitochondrien bei der kalziumabhängigen Si- gnaltransduktion . . . . .	19
4.6	Zielsetzung dieser Arbeit . . . . .	22
<b>5</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>23</b>
5.1	Material . . . . .	23
5.1.1	Chemikalien . . . . .	23
5.1.2	Medien und Lösungen . . . . .	24
5.1.3	Antikörper . . . . .	24
5.1.4	Konstrukte . . . . .	25
5.1.5	Mikropipetten . . . . .	25
5.1.6	Geräte . . . . .	25
5.1.7	Software . . . . .	26
5.2	Zellen und Beads . . . . .	26
5.2.1	Parentale Jurkat-Zellen . . . . .	26
5.2.2	Humane CD4 <sup>+</sup> T-Zellen . . . . .	26
5.2.3	Transfektion von parentalen Jurkat T-Zellen . . . . .	26
5.2.4	Herstellung der aCD3/aCD28 beschichteten Beads . . . . .	26
5.3	Fluoreszenz-Techniken . . . . .	27
5.3.1	Markierung der Mitochondrien mit MitoTracker Green FM . . . . .	27
5.3.2	Aktin-Färbung von parentalen Jurkat-Zellen . . . . .	27
5.3.3	Fura-2/AM - Messungen . . . . .	28

<i>INHALTSVERZEICHNIS</i>	3
5.3.4 Rhod-2/AM - Messungen . . . . .	28
5.4 Elektrophysiologische Technik zur Kontrolle des lokalen Kalziumeinstroms . . . . .	29
5.4.1 Lokale Kalzium-Applikation mittels Patch-Clamp Technik . . . . .	30
5.4.2 Kombination aus lokaler Kalzium-Applikation und fokaler Stimulation von T-Zellen . . . . .	31
<b>6 Ergebnisse</b>	<b>35</b>
6.1 Arbeitshypothese . . . . .	35
6.2 Kalziumabhängige mitochondriale Bewegung zur Immunologischen Synapse . . . . .	35
6.3 Intrazelluläre Kalziumsignale in T-Zellen werden durch die mitochondriale Lokalisation beeinflusst . . . . .	39
6.3.1 Kontrollierte lokale Kalzium-Applikation durch cell-attached Patch Technik . . . . .	39
6.3.2 Einfluss der Mitochondrien-Lokalisation auf Kalziumsignale in Jurkat T-Zellen . . . . .	40
6.3.3 Einfluss der Mitochondrien-Lokalisation auf Kalziumsignale in CD4 <sup>+</sup> T-Zellen . . . . .	42
6.3.4 Analyse intramitochondrialer Kalziumsignale nach lokaler Kalzium-Applikation . . . . .	44
6.3.5 Effekte von 2-APB und BTP-2 auf Kalziumsignale nach cell-attached Patch Applikation . . . . .	44
6.4 Mitochondrien wandern zur Immunologischen Synapse und nicht zum Bereich des Kalziumeinstroms . . . . .	49
6.4.1 Lokale Kalzium-Applikation und fokale Stimulation durch antikörperbeladene Pipette . . . . .	49
6.4.2 Lokale Kalzium-Applikation und fokale Stimulation von T-Zellen durch antikörperbeschichtete Pipetten . . . . .	50
6.4.3 Lokale Kalzium-Applikation und fokale Stimulation von T-Zellen durch antikörperbeschichtete Beads . . . . .	52
<b>7 Diskussion</b>	<b>58</b>
7.1 Mitochondriale Translokation zur IS . . . . .	58
7.2 Kontrolle der intrazellulären Kalziumsignale durch die mitochondriale Lokalisation . . . . .	61
7.3 Aufklärung des Ziels mitochondrialer Bewegungen . . . . .	66
<b>8 Anhang</b>	<b>73</b>
8.1 Literaturverzeichnis . . . . .	73

*INHALTSVERZEICHNIS*

4

8.2	Danksagung . . . . .	82
8.3	Unbedenklichkeitserklärung der Ethikkommission . . . . .	83
8.4	Eidesstattliche Erklärung . . . . .	83
8.5	Lebenslauf . . . . .	84

## 1 Abkürzungsverzeichnis

2-APB	2-Aminoethyl-diphenyl-borat
Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
AP-1	Aktivator Protein 1
APC	Antigen präsentierende Zelle
ATP	Adenosintriphosphat
BAPTA	1,2-bis(2-aminophenoxy)ethane-N,N,N',N'-tetraacetic acid
BTP-2	3,5-bistrifluoromethyl-pyrazol
cADPR	cyclic Adenosinediphosphateribose
cAMP	Zyklisches Adenosinmonophosphat
CCCP	Mesoxalonitril 3-chlorophenylhydrazon
CD	Cluster of differentiation
CRAC	Calcium release-activated calcium channel
CTLA-4	Cytotoxic T-lymphocyte antigen 4
DAG	Diazylglyzerin
DC	Dendritische Zelle
DNA	Desoxyribonukleinsäure
Drp1	Dynamamin related protein 1
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FITC	Fluorescein-5-isothiocyanat
HEK	Human embryonic kidney
ICAM	Intracellular cell-adhesion molecule
Ig	Immunglobulin
I $\kappa$ B	Inhibitory protein $\kappa$ B
IL	Interleukin
IP <sub>3</sub>	Inositol-1,4,5-triphosphat
IP <sub>3</sub> R	IP <sub>3</sub> -Rezeptor
IS	Immunologische Synapse
ITAM	Immunoreceptor tyrosin-based activation motif
K <sub>Ca</sub>	Kalzium-abhängige Kaliumkanäle
Lck	Lymphocyte-specific protein tyrosine kinase
LFA-1	Lymphocyte function-associated antigen-1
MAP-Kinase	Mitogen-activated protein kinase
MHC	Major histocompatibility complex
NAAD	Nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate
NFAT	Nuclear factor of activated T-cell

NF $\kappa$ B	Nuclear factor $\kappa$ B
PBL's	Periphere Blutlymphozyten
PKC	Phosphokinase C
PIP <sub>2</sub>	Inositol-4,5-bisphosphat
PLC	Phospholipase C
PMCA	Plasmamembran Kalzium ATPase
RT	Raumtemperatur
SCID	Severe combined immunodeficiency
SERCA	Sarco-endoplasmic-reticulum calcium ATPase
SMAC	Supra-molecular activation complex
SOC	Store-operated channel
STIM	Stromal interaction molecule
TCR	T-Zell Rezeptor
TG	Thapsigargin
TK	Tyrosinkinase
TRP	Transient receptor potential
ZAP-70	$\xi$ -chain-associated protein of 70 kD

## 2 Zusammenfassung

Die Erhöhungen von intrazellulären Kalziumkonzentrationen sind wichtige Schlüsselsignale bei der Aktivierung von T-Zellen. Nach Bindung des Antigen-MHC-Komplexes an den TCR kommt es zur Aktivierung einer Signalkaskade, die u.a. in der Genexpression von Interleukinen und der Proliferation der T-Zellen mündet. Für die Aktivierung der entsprechenden Transkriptionsfaktoren wird ein so hoher und langanhaltender Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration benötigt, dass die Entleerung der intrazellulären Kalziumspeicher allein nicht ausreichend ist. Zusätzlich erfolgt ein Einstrom von Kalzium aus dem Extrazellulärraum durch kalziumspeicheraktivierte CRAC-Kanäle ( $\text{Ca}^{2+}$  release-activated  $\text{Ca}^{2+}$ -channels). Dadurch kommt es zu einer lokalen Erhöhung der Kalziumkonzentration im Bereich dieser Kanäle, wodurch diese kalziumabhängig inhiert werden. Mitochondrien können mit Hilfe ihres Kalzium-Uniporters dieses einströmende Kalzium aufnehmen und verhindern somit die Inaktivierung der CRAC-Kanäle. Dadurch kann insgesamt mehr Kalzium in die T-Zellen fließen und dies führt zu langanhaltenden intrazellulären Erhöhungen der Kalziumkonzentrationen.

Ziel dieser Arbeit war, die Funktionen von Mitochondrien während der T-Zell Aktivierung näher aufzuklären. So konnten wir zeigen, dass die mitochondrialen Bewegungen zur Immunologische Synapse (IS) kontinuierlich über einen Zeitraum von mindestens einer Stunde erfolgen und für diese Bewegungen ein Kalziumeinstrom über die Plasmamembran von T-Zellen essentiell ist. Desweiteren wurde mit Hilfe einer Kombination aus elektrophysiologischen, fluoreszenzbasierten und Kalzium-Imaging Techniken gezeigt, dass die intrazellulären Kalziumkonzentrationen von der mitochondrialen Lokalisation in Bezug zu den Kalziumkanälen in der Plasmamembran abhängig sind. Je näher die Mitochondrien an den Kalziumkanälen in der Plasmamembran lokalisiert sind, desto mehr Kalzium fließt in die Zelle ein. Dieser Effekt ist in humanen  $\text{CD4}^+$  T-Zellen stärker ausgebildet als in der T-Zelllinie Jurkat. Im Rahmen dieser Doktorarbeit sollte darüberhinaus herausgefunden werden, was das eigentliche Ziel dieser mitochondrialen Bewegungen ist: die IS oder der Kalziumeinstrom? Um diese Frage zu beantworten, wurden neue Methoden entwickelt, mit der wir in der Lage waren, sowohl Kalzium lokal zu applizieren, als auch an einem genau definierten Bereich der T-Zellmembran eine IS zu induzieren. So konnte gezeigt werden, dass die Mitochondrien entlang des Aktin-Zytoskeletts zur IS wandern, unabhängig davon, wo der Kalziumeinstrom in der T-Zelle lokalisiert ist. Mit dieser neu entwickelten Methode können in der Zukunft auch viele andere Fragestellungen im Bereich der Kalzium-Signalübertragung in Zellen des Immunsystems beantwortet werden.

### 3 Abstract

#### 3.1 Functions of mitochondria during T-cell activation

The increase of intracellular calcium concentrations is an important signal during T-cell activation. Binding of antigen-MHC-complexes to T-cell receptors induces activation of different signalling pathways, ending up in gene expression of different cytokines and proliferation of T-cells. It is necessary for the activation of transcription factors in order to generate very high and long-lasting intracellular calcium concentrations that calcium enters the cells through calcium release-activated calcium channels (CRAC) located in the plasma membrane in addition to store depletion. These CRAC-channels are inactivated by inflowing calcium, which accumulates in microdomains underneath the mouth of the channels. Mitochondria are able to take up this inflowing calcium by their calcium uniporters and thereby prevent the inactivation of CRAC channels. As a consequence more calcium enters the T-cells and long-lasting elevations in intracellular calcium concentrations are generated.

The goal of this thesis was to reveal the functions of mitochondria during the T-cell activation in detail. We could show that mitochondrial movements to the immunological synapse (IS) occur continuously for at least one hour. Calcium influx over the plasma membrane is essential for the mitochondrial movement towards the IS. Furthermore, using a combination of different electrophysiological and fluorescence-based imaging techniques, we show that the intracellular calcium concentrations depend on the localisation of mitochondria towards the calcium influx source. The closer the mitochondria are located at the site of the calcium influx, the more calcium enters the cell. This effect was even bigger in isolated human CD4<sup>+</sup> T-cells than in a Jurkat T-cell line. The most important question which should be answered during this thesis, was: What is the destination of moving mitochondria: the IS or the calcium influx source? To answer this question we developed a new technique which allowed us to apply calcium locally and simultaneously inducing an IS at a distinct area of the plasma membrane. Using this method, we could show that mitochondria are moving along the actin-cytoskeleton towards the IS independently of the localisation of the calcium influx source in T-cells. This new method can also be used in the future to answer other questions in the field of calcium signalling in lymphocytes.

## 4 Einleitung

### 4.1 Funktionen von T-Zellen im Immunsystem

Das Immunsystem dient der Abwehr potentiell pathogener Keime sowie der Erkennung und Eliminierung infizierter und entarteter Zellen. Dabei spielen T-Lymphozyten, die der spezifischen, zellulären (adaptiven) Immunabwehr zugeordnet werden, eine wichtige Rolle. Dieser Zelltyp hat unterschiedliche Funktionen innerhalb des Immunsystems und wird dementsprechend in verschiedene Unterklassen eingeteilt.

Den größten Anteil der T-Zellen (65 %) bilden die T-Helferzellen ( $CD4^+$ ), die an der zellulären Immunreaktion und Differenzierung von B-Zellen zu antikörperproduzierenden Plasmazellen beteiligt sind. Die T-Helferzellen werden anhand der Zytokine, die sie produzieren, in drei Untergruppen eingeteilt:

- $T_H0$ -Zellen produzieren Interleukin-2 (IL-2), Interferon  $\gamma$ , Interleukin-4 und -5
- $T_H1$ -Zellen produzieren Interleukin-2 und Interferon  $\gamma$
- $T_H2$ -Zellen produzieren Interleukin-4 und -5

Welche  $T_H$ -Subpopulation zur Infektionsbekämpfung gebildet wird, hängt von mehreren Faktoren wie z. B. dem Erregertyp oder dem betroffenen Gewebe ab. Die restlichen 35 % der T-Lymphozyten werden den  $CD8^+$  T-Killerzellen zugerechnet (zytotoxische T-Lymphozyten). Sie können Virusinfizierte Zellen nach Antigen-spezifischer Präsentation erkennen und mittels Perforinen lysieren.

Zunächst müssen T-Zellen stimuliert werden, bevor sie ihre Zielfunktionen ausführen können. Dies geschieht vor allem durch Wechselwirkungen mit Antigen-präsentierenden Zellen (APC), zu denen dendritische Zellen, B-Zellen und Monozyten bzw. Makrophagen gezählt werden. Die wichtigsten Moleküle in diesem Aktivierungsprozess sind die T-Zell-Rezeptoren (TCR) auf den T-Zellen und die Histokompatibilitätskomplexe (MHC = Major Histocompatibility Complex) auf den APC's. Die TCR's sind nicht-kovalent mit den Cluster of Differentiation 3 (CD3) -Molekülkomplexen assoziiert, die die eigentliche Signalübertragung ins Zellinnere übernehmen. Zusammen werden TCR und CD3-Molekülkomplexe als funktionelle TCR-Komplexe bezeichnet. Darüber hinaus sind mit dem TCR kostimulatorische Moleküle wie CD28 und CTLA-4 (cytotoxic T-lymphocyte antigen 4) assoziiert. Fehlen diese kostimulatorischen Signale bei der Antigenerkennung, so wird die T-Zelle anerg, d.h. sie lebt zwar weiter, kann jedoch nicht mehr aktiviert werden, auch nicht

durch spätere Antigenpräsentation durch eine APC. Dies dient der Eliminierung von T-Zellen, deren TCR mit körpereigenen Strukturen interagieren und ist somit ein wichtiger Mechanismus zur Vermeidung von Autoimmunreaktionen. Die ebenfalls mit dem TCR assoziierten Korezeptoren CD4 bzw. CD8 sind für die Stabilisierung des Kontaktes zwischen T-Zelle und APC notwendig.

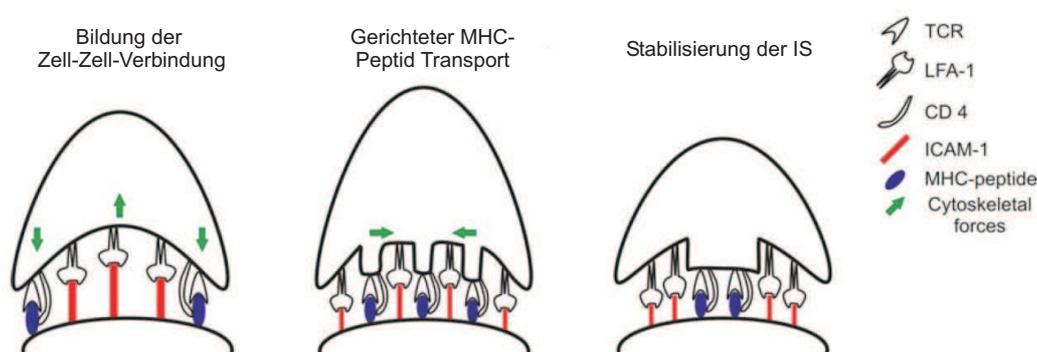
Im Rahmen dieser Interaktion zwischen APC und T-Zelle kommt es zur Aktivierung einer intrazellulären Signalkaskade (siehe Abschnitt 4.3), die zur Bildung und Ausschüttung verschiedener Zytokine führt. Diese Interleukine (IL) dienen zum einen der eigenen „Rückkopplungs-Aktivierung“ über den IL-2 Rezeptor, was zu einer klonalen Expansion und damit zu einer Population identischer T-Zellklone führt. Desweiteren werden über die IL-2 und IL-4 B-Lymphozyten aktiviert, die dann proliferieren und sich zu Antikörperproduzierenden Plasmazellen entwickeln. Durch die Zytokinfreisetzung werden zusätzlich natürliche Killerzellen, Mastzellen, Makrophagen und Granulozyten aktiviert, die dann gemeinsam gegen die Pathogene kämpfen können.

## 4.2 Die Immunologische Synapse

Es ist seit dem Jahr 1998 bekannt, dass die T-Zellen mit den APC eine Verbindung eingehen, die in der Aktivierung und nachfolgenden Proliferation der T-Zellen mündet (Monks *et al.*, 1998). Ein wichtiger Vorgang während der T-Zell Aktivierung ist die anhaltende Stimulation des TCR (Ullman *et al.*, 1990). Erreicht wird dies durch eine komplexe Interaktion von Molekülen innerhalb der Interaktionszone zwischen T-Zelle und APC, die Immunologische Synapse (IS) genannt wird. Obwohl das Konzept der IS nicht neu ist, wurde diese Zell-Zell-Interaktion erst in letzter Zeit näher untersucht (Grakoui *et al.*, 1999; Qi *et al.*, 2001). Die Bildung der IS ist in drei Phasen unterteilt (siehe Abb. 1):

1. Bildung der Zell-Zell-Verbindung, wobei entweder Leukozyten-Funktions-Antigen 1 (LFA-1, T-Zellen) oder Intrazelluläres Zelladhäsions-Moleküle (ICAM-1 Proteine; APC) im Zentrum der Interaktionsstelle verankert werden und den „central supramolecular activation cluster“ (c-SMAC) bilden. Dadurch wird die Wanderung der T-Zellen gestoppt und die Polarisierung der T-Zellen gestartet.
2. Gerichteter Transport von MHC-Antigenpeptid Komplexen, wobei diese Komplexe in die c-SMAC Zone wandern (TCR-abhängig). Diese molekulare Bewegung wird durch eine Umorganisation des Zytoskeletts vermittelt.

3. Stabilisierung der IS: die ausgereifte IS besteht aus drei konzentrischen Bereichen mit einem geclusterten MHC-Peptid/TCR-CD3 Bereich im Inneren (c-SMAC) zusammen mit anderen Molekülen (z.B.: CD4, CD8, CD2 und CD28) und einem äußeren Bereich, indem Adhäsionsmoleküle wie LFA-1 akkumulieren (p-SMAC). Gleichzeitig werden große Moleküle wie CD43 und CD45 aus dem Bereich der IS verdrängt und im äußersten „distal supramolecular activation cluster“ (d-SMAC) angereichert (siehe Abb. 2).



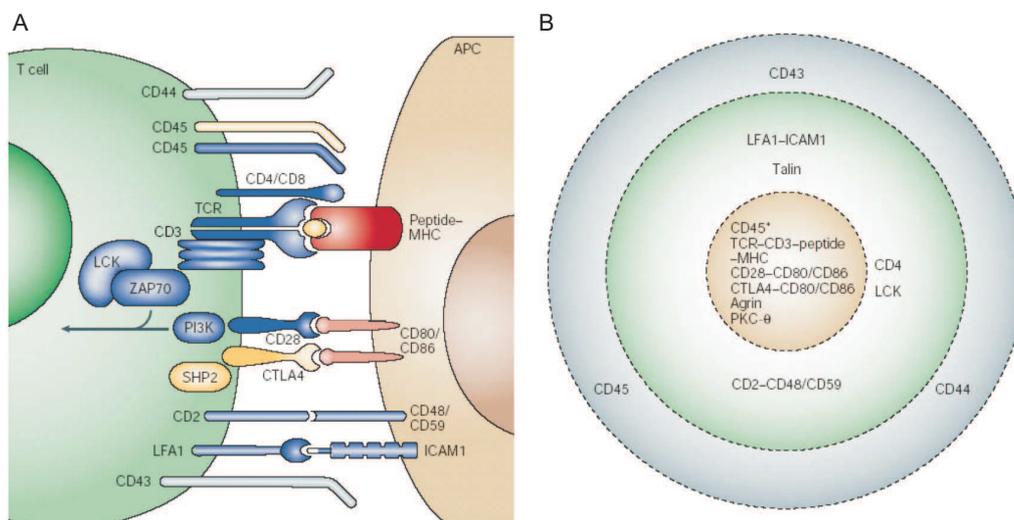
**Abb. 1: Bildung der Immunologischen Synapse:** Die Bildung der IS ist in drei Phasen unterteilt: Die Bildung der Zell-Zell-Verbindung, den gerichteten MHC-Peptid Transport und die Stabilisierung der IS (aus Grakoui *et al.*, 1999).

Durch diese IS-Bildung umgeht das Immunsystem viele Barrieren, die die TCR-Aktivierung negativ beeinflussen würden, wie z.B. die sterische Hinderung von großen Glykoproteinen wie CD43 und CD45, die geringe Größe des TCR und MHC, die geringe Affinität des TCR-MHC-Peptid Komplexes und die geringe Anzahl von MHC-Peptid Komplexen auf der Oberfläche der APC's (Friedl *et al.*, 2005; Grakoui *et al.*, 1999; Jacobelli *et al.*, 2004; Krummel und Davis, 2002).

Da die intrazellulären Signalmoleküle, die durch die TCR-Aktivierung entstehen, nur eine kurze Halbwertszeit besitzen, wird ihre Akkumulation durch eine kontinuierliche TCR-Aktivierung nach IS-Bildung sichergestellt (Beeson *et al.*, 1996).

Zusammenfassend lässt sich also sagen, dass die IS eine hoch organisierte zelluläre Verbindung zwischen T-Zelle und APC darstellt. Die IS stellt sicher, dass Vorgänge auf der Zelloberfläche letztendlich zu einer T-Zell Aktivierung führen können. Durch die Antigen-induzierte Polarisation der T-Zelle werden zytosolische und plasmamembranständige Moleküle rekrutiert, die an intrazellulären Signalkaskaden beteiligt sind. Proteine, die die T-Zell Aktivierung

behindern würden, werden von der IS fern gehalten (Janeway *et al.*, 2005). Somit dient die IS dazu, das Schicksal der T-Zellen zu entscheiden, wie z.B.: Anergie, den Grad der Zellproliferation oder der Toleranz.



**Abb. 2: Aufbau der IS:** (A) zeigt eine Auswahl von Molekülen, die an der Bildung der IS beteiligt sind. Kostimulatorische Peptide und der MHC-Komplex auf der APC sind in rot dargestellt, positive Kostimulatoren auf der T-Zelle in blau, negative in gelb. Grau sind die Moleküle, die nicht zur Signalübertragung beitragen. Der Pfeil steht für Signale, die gemeinsam zur T-Zell Aktivierung führen. (B) zeigt einen Querschnitt durch die IS mit den typischen Zonen (cSMAC (hellgrün), pSMAC (dunkelgrün) und dSMAC (blau)) und den darin angereicherten Molekülen (aus Huppa and Davis, 2003).

### 4.3 Kalziumabhängige Signaltransduktion in T-Zellen

Nach der Bindung des MHC-Antigen-Komplexes an den TCR im Rahmen der IS-Bildung kommt es im ersten Schritt der Signaltransduktion zur Phosphorylierung von Tyrosinkinasen, die ihrerseits die Phospholipase  $C\gamma$  ( $PLC\gamma$ ) phosphorylieren und damit aktivieren. Die Phospholipase  $C\gamma$  spaltet das membranständige Phospholipid Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat ( $PIP_2$ ) in die „second messenger“ Inositol-1,4,5-triphosphat ( $IP_3$ ) und Diacylglycerol (DAG).  $IP_3$  führt durch Bindung an die  $IP_3$ -Rezeptoren des endoplasmatischen Retikulums (ER) zu einer Freisetzung von Kalziumionen aus den Kalziumspeichern in das Zytoplasma und zu einer Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration. Das freigesetzte DAG und der Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration führen zur Aktivierung der Proteinkinase C

(PKC) und rufen eine Phosphorylierung mehrerer Proteinkomplexe wie z. B. AP-1 (activator protein 1) und I $\kappa$ B/NF- $\kappa$ B hervor (Crabtree and Clipstone, 1994). Der I $\kappa$ B/NF- $\kappa$ B-Komplex dissoziiert aufgrund seiner Phosphorylierung in die beiden Untereinheiten I $\kappa$ B und NF- $\kappa$ B. Das phosphorylierte I $\kappa$ B wird im Zytoplasma degradiert, wohingegen der nun aktivierte Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B in den Zellkern wandert. Dort bindet er an den Promotor des IL-2-Gens und zusammen mit anderen Transkriptionsfaktoren wie AP-1 und NFAT (nuclear factor of activated T-cells) induziert dieser Komplex die Expression von IL-2 (Baldwin, 1996; Partiseti *et al.*, 1994).

Die phosphorylierten, zytosolischen NFAT-Proteine werden durch die kalzium/calmodulinabhängige Phosphatase Calcineurin nach einem Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration dephosphoryliert und damit aktiviert (Flanagan *et al.*, 1991; Hogan *et al.*, 2003). Dadurch kommt es zu einer Konformationsänderung des NFAT, welches durch die Exposition seiner Kernlokalisationssequenz in den Kern transloziert. Dort kooperiert NFAT mit verschiedenen Kofaktoren wie z. B. AP-1 und bildet funktionelle Transkriptionsfaktor-Komplexe, die zur Expression von verschiedenen Genen führen. Auch AP-1, das als wichtigster Interaktionspartner von NFAT gilt, wird durch kalziumabhängige Kinasen kontrolliert (Rao *et al.*, 1997).

Zur Aktivierung der Transkriptionsfaktoren wird eine langanhaltende Erhöhung des intrazellulären Kalziumspiegels benötigt, die nicht vollkommen durch die Freisetzung von Kalzium aus den intrazellulären Speichern (ER) erreicht werden kann (Goldsmith and Weiss, 1988; Negulescu *et al.*, 1994). Weiterhin ist bekannt, dass das Kalziumsignal in aktivierten T-Lymphozyten biphasisch ansteigt (Gardner, 1989). Daher muss neben der Entleerung der intrazellulären Kalziumspeicher auch ein Kalziumeinstrom über die Plasmamembran stattfinden, denn ohne diesen Einstrom aus dem Extrazellularraum wäre das Immunsystem nicht funktionsfähig. Es wurde gezeigt, dass das Signal für die Aktivierung dieses Kalziumeinstroms die initiale Entleerung der intrazellulären Kalziumspeicher ist (Putney, 1990). Daher wurde diese Art von Kanal, die auch in vielen anderen Zellen entdeckt wurde, „speicheraktivierter Kanal“ (SOC = store-operated channel) genannt. Der in T-Zellen und anderen Zellen gefundene „store-operated channel“ heißt CRAC-Kanal (Ca<sup>2+</sup> release-activated Ca<sup>2+</sup> channel) und wurde nach dem gleichen, ursprünglich in Mastzellen gefundenen Kanal benannt (Hoth and Penner, 1992). Er unterscheidet sich von anderen SOC's durch seine hohe Selektivität für Kalziumionen (siehe Abschnitt 4.4).

Neben dieser Möglichkeit wurden zwei weitere Ansätze zur Freisetzung von Kalzium aus intrazellulären Speichern beschrieben. Sowohl die T-Zelllinie Jurkat als auch primäre T-Lymphozyten exprimieren den Ryanodin- Rezeptor in der Membran des endoplasmatischen Retikulums. Durch Bindung des

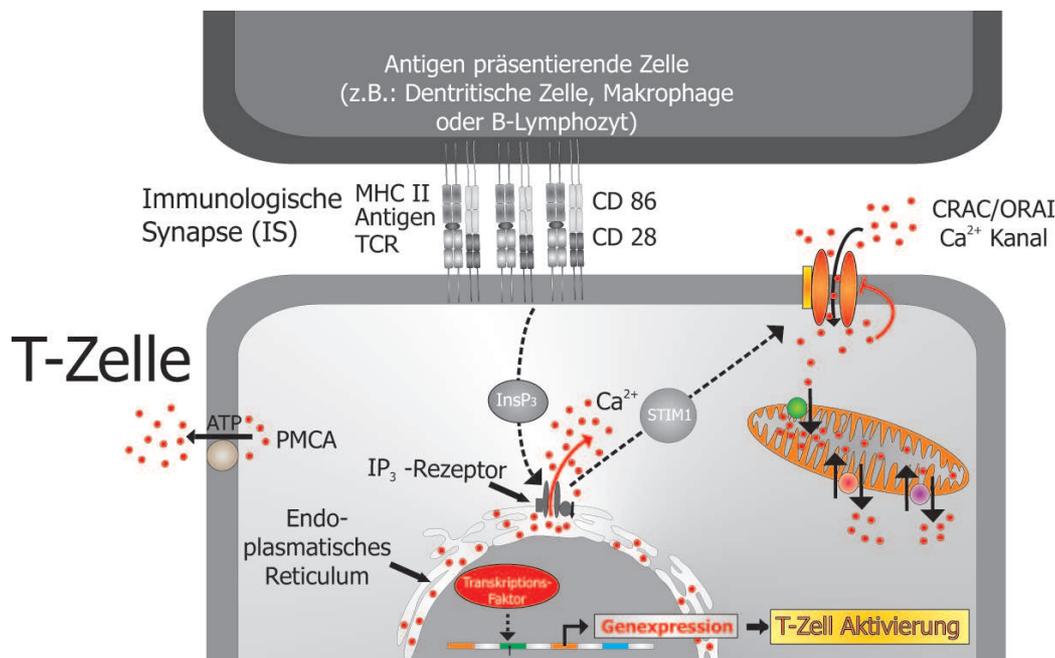
„second messengers“ cADPR (cyclic ADP-ribose) an die Ryanodin-Rezeptoren wird Kalzium aus dem ER freigesetzt. Während der  $IP_3$ -abhängige Weg wichtig für die schnelle Freisetzung von Kalzium und die anschließende Aktivierung des CRAC-Kanals nötig ist, spielt cADPR eine Rolle in der Aufrechterhaltung des Kalziumsignals (Guse, 2004). Desweiteren wird in T-Lymphozyten eine NAADP<sup>+</sup>-abhängige (NAADP<sup>+</sup> = nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate) Kalziumfreisetzung aus intrazellulären Speichern beschrieben, über die aber noch wenig bekannt ist. Ein Überblick über die Kalzium-abhängige Signaltransduktion in T-Zellen ist in Abb. 3 zu sehen. Die zeitliche und räumliche Dynamik des Kalziumsignals, die sich durch das Zusammenspiel von intrazellulärem und extrazellulärem Kalziumstrom in das Zytosol ergibt, ermöglicht die Modulation von Immunantworten. Treten Störungen in diesem Zusammenspiel auf, so können daraus Krankheiten resultieren, die mit einer Immunschwäche einhergehen (Feske *et al.*, 2001; Le Deist *et al.*, 1995; Partiseti *et al.*, 1994). Um geeignete Therapien und Medikamente gegen diese Krankheiten entwickeln zu können, ist es wichtig, die genauen Zusammenhänge dieser komplexen Signalwege zu entschlüsseln.

## 4.4 Funktionen des CRAC/Orai Kanals in T-Zellen

### 4.4.1 Der CRAC/Orai-Kanal

Der CRAC/Orai Kanal ist, wie in Abschnitt 4.3 beschrieben, ein Kalziumkanal in der Plasmamembran humaner T-Zellen, Mastzellen und vieler anderer Zelltypen. Er besitzt eine Selektivität für Kalziumionen gegenüber monovalenten Kationen von ungefähr 1000:1 (Hoth and Penner, 1993) und eine Einzelkanalleitfähigkeit von 10-20 fS (Prakriya and Lewis, 2002; Zweifach and Lewis, 1993). Bezüglich der Kalzium-Selektivität entspricht der CRAC/Orai Kanal fast der Selektivität spannungsgesteuerter Kalziumkanäle, die jedoch eine wesentlich höhere Einzelkanalleitfähigkeit besitzen. Im Gegensatz zu diesen spannungsgesteuerten Kalziumkanälen wird der CRAC/Orai Kanal nicht durch Potentialänderung, sondern durch die Entleerung der intrazellulären Kalziumspeicher aktiviert. Der Kalziumstrom über die Plasmamembran ist notwendig, damit eine effektive Aktivierung der T-Zellen bis hin zur Expression von Interleukinen erfolgen kann.

Durch den Kalziumstrom über die CRAC-Kanäle sammelt sich Kalzium intrazellulär in einer Mikrodomäne unter dem Kanaleingang an und inaktiviert diesen. Eine Hemmung der CRAC-Kanäle durch die ansteigende Kalziumkonzentration würde also das Kalziumsignal schnell wieder abfallen lassen. Diese Hemmung wird unter anderem dadurch verhindert, dass Mitochondrien, die in der Nähe der Plasmamembran lokalisiert sind, das einströmende



**Abb. 3: T-Zell Aktivierung:** Die Antigen-präsentierende Zelle (APC) bindet mit dem MHC-Antigen-Komplex und kostimulatorischen Molekülkomplexen an den TCR. Diese Zell-Zell-Verbindung wird Immunologische Synapse (IS) genannt. Nach der Bildung der IS kommt es zur Bildung von verschiedenen Signalmolekülen wie z. B. Inositoltriphosphat (IP<sub>3</sub>). IP<sub>3</sub> bindet an Rezeptoren in der Membran des ER und Kalzium wird daraufhin aus den intrazellulären Speichern freigesetzt. Diese Freisetzung verursacht die Translokation des ER-membranständigen Moleküls STIM1 zur Plasmamembran, wo es mit Orai1, einer Untereinheit des CRAC-Kanals, interagiert und den Kanal aktiviert. Kalzium strömt in die T-Zelle ein und aktiviert verschiedene Transkriptionsfaktoren (z. B. NFAT), die wiederum die Genexpression von Interleukinen aktivieren. Die Mitochondrien verhindern durch die Kalziumaufnahme mit ihren Kalzium-Uniportern und die anschließende, langsame Kalzium-Freisetzung durch Kalzium-Austauscher die kalziumabhängige Inaktivierung des CRAC-Kanals und tragen so zur T-Zell Aktivierung bei.

Kalzium über einen Uniporter aufnehmen und als „Kalzium-Puffer“ die Rückkopplungshemmung des CRAC-Kanals verhindern (siehe Abschnitt 4.5). Das von den Mitochondrien aufgenommene Kalzium wird nur langsam wieder über einen  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher in das Zytoplasma abgegeben (Hoth *et al.*, 1997; Lewis, 2001). Ebenso wird ein Teil des eingeströmten Kalziums über die SERCA-Pumpe (sarco-endoplasmatic-reticulum- $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase) aktiv aus dem Zytosol aufgenommen.

Trotz dieser eindeutig charakterisierten funktionellen Eigenschaften des CRAC / Orai Kanals konnten seine molekularen Eigenschaften bis heute nicht vollständig geklärt werden. Es gilt als sicher, dass Orai1 zumindest einen Teil des Kanals bildet (siehe Abschnitt 4.4.2), allerdings wird kontrovers diskutiert, ob auch weitere Proteine wie z. B. Mitglieder der TRP-Proteine (TRP = transient receptor potential) an dessen Aufbau beteiligt sind.

#### 4.4.2 Orai-Proteine: Untereinheiten des CRAC-Kanals

Die Orai-Proteinfamilie in Säugern besteht aus drei Mitgliedern: Orai1, Orai2 und Orai3. Feske *et al.* führten eine Linkage-Gen-Analyse an SCID-Patienten durch, deren T-Zellen durch den Mangel an  $I_{CRAC}$  gekennzeichnet sind (Feske *et al.*, 2006). In dieser Studie wurde eine Mutation in der Porenregion des Orai1-Gens entdeckt, die für den stark verminderten CRAC-Strom in den T-Zellen dieser Patienten verantwortlich ist. Eine Transfektion dieser Zellen mit Wildtyp-Orai1 führte zu einer vollständig Regeneration von  $I_{CRAC}$ . Zudem zeigte sich in einem Screen nach Genen, die in Drosophilazellen für die Translokation von NFAT in den Zellkern benötigt werden, dass Orai1 essentiell für den Kalziumstrom ist (Feske *et al.*, 2005). Auch Vig *et al.* konnten mittels siRNA Screen in Drosophila- und in HEK293-Zellen zeigen, dass Orai bzw. Orai1 eine wichtige Komponente des  $I_{CRAC}$  ist (Vig *et al.*, 2006b; Zhang *et al.*, 2006).

Alle Mitglieder der Orai-Familie sind Membranproteine mit vier Transmembrandomänen (Feske *et al.*, 2006; Vig *et al.*, 2006b; Zhang *et al.*, 2006; siehe Abb. 4). Orai1 ist nur in der Plasmamembran lokalisiert. Mehrere Arbeitsgruppen zeigten eine starke Erhöhung (50- bis 100-fach) von  $I_{CRAC}$ , wenn Orai1 zusammen mit STIM1 überexprimiert wurde (Peinelt *et al.*, 2006; Soboloff *et al.*, 2006b; Zhang *et al.*, 2006). Wenn allerdings nur Orai1 überexprimiert wurde, führte dies zu einer Hemmung des  $I_{CRAC}$  in Jurkat-, RBL- und HEK293-Zellen (Peinelt *et al.*, 2006; Soboloff *et al.*, 2006b; Zhang *et al.*, 2006). In Drosophila S2-Zellen führte auch eine alleinige Überexpression von Orai1 zu einem Anstieg des  $I_{CRAC}$ , der allerdings durch eine zusätzliche STIM1-Überexpression noch erheblich verstärkt wurde (Zhang *et al.*, 2006). Diese Daten zeigen, dass eine kombinierte STIM1- und Orai1-Überexpression

notwendig und hinreichend ist, um die  $I_{CRAC}$  Amplitude um mindestens eine Größenordnung zu erhöhen.

Wurden die menschlichen Orai1-Homologe Orai2 und Orai3 zusammen mit STIM1 überexprimiert, konnte ebenfalls eine Potenzierung von  $I_{CRAC}$  gemessen werden (Lis *et al.*, 2007). Alle drei Orai Varianten zeigen verschiedene biophysikalische Eigenschaften z. B. ihrer Selektivität, ihrer kalziumabhängigen Aktivierung und pharmakologischen Profilen nach 2-APB Behandlung. Es wird daher davon ausgegangen, dass es zu einer Heteromerisierung zwischen den Orai Proteinen kommt, um flexibel auf die verschiedenen Bedingungen der intrazellulären Kalziumsignale reagieren zu können.

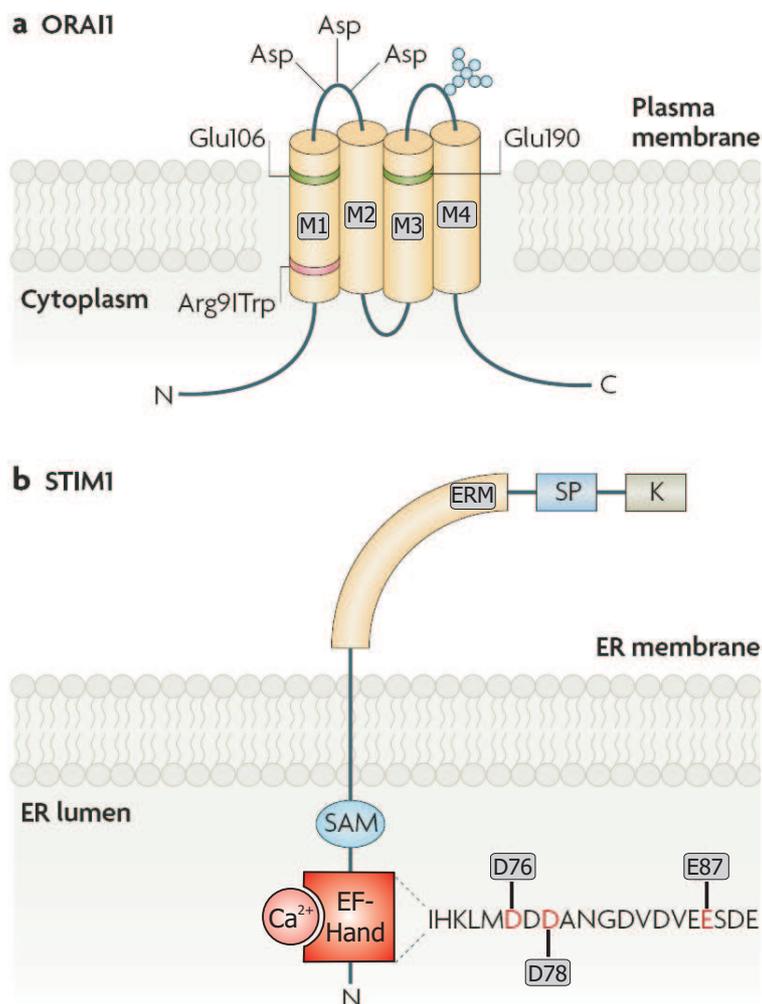
#### 4.4.3 STIM-Proteine: Funktionen während der T-Zell Aktivierung

Im Jahr 2005 entdeckten Roos *et al.* eine essentielle Komponente von  $I_{CRAC}$  (Roos *et al.*, 2005). Das schon früher beschriebene stromal-interaction molecule 1 (STIM1) (Oritani and Kincade, 1996) war für den speichergesteuerten Kalziumeinstrom essentiell. Roos *et al.* führten einen siRNA Screen in *Drosophila* S2-Zellen durch, der 170 Gene beinhaltete, die mit dem speichergesteuerten Kalziumsignal in Verbindung gebracht werden konnten. Diese Insektenzellen wurden mit doppelsträngiger RNA (dsRNA) inkubiert, die die gleiche Sequenz wie ein 500 bp Fragment von GC9126 (*Drosophila Stim*) hatten. Es zeigte sich ein deutlich reduzierter Kalziumeinstrom nach Thapsigargin Behandlung. Zusätzlich war die Konzentration von STIM mRNA um über 50 % gegenüber den Kontrollzellen reduziert.

Das STIM Protein aus *Drosophila* hat zwei Säugerhomologe STIM1 und STIM2, die ebenfalls die Aktivierung des CRAC-Kanals kontrollieren (Roos *et al.*, 2005; Liou *et al.*, 2005). STIM1 besteht aus einer Transmembrandomäne (siehe Abb. 4) und ist in der ER Membran lokalisiert, wo es mit seinem carboxyterminalen EF-Hand Motiv die Kalziumkonzentration im ER Lumen messen kann.

Nach Entleerung der intrazellulären Kalziumspeicher kommt es zu einer Reorganisation von STIM1 von einer homogenen Verteilung hin zu einer Akkumulation nahe der Zellmembran („Punctae“-Bildung), ohne dass STIM1 jedoch in die Membran integriert wird (Liou *et al.*, 2005; Wu *et al.*, 2006). Diese Umverteilung tritt wenige Sekunden vor dem Öffnen der CRAC-Kanäle auf und deutet darauf hin, dass dies ein essentieller Schritt während der  $I_{CRAC}$  Aktivierung ist (Wu *et al.*, 2006).

Neueste Ergebnisse deuten auf eine direkte Interaktion zwischen STIM und Orai Proteinen hin (Wei *et al.*, 2008). Wei *et al.* postulieren, dass der CRAC/Orai Kanal in seiner aktiven Form aus vier Orai-Molekülen und zwei STIM



**Abb. 4: Aufbau der CRAC-Kanal Untereinheit Orai1 und dem Kalziumsensor STIM1 in der ER-Membran:** (A) Orai1 ist ein Plasmamembranprotein mit vier Transmembrandomänen (M1 - M4) und intrazellulären Amino- und Carboxytermini. Die Markierung zeigt die Arg91Trp Mutation in Patienten mit SCID Syndrom (severe combined immunodeficiency), die die Funktion des CRAC-Kanals beeinträchtigt. Ebenfalls angedeutet sind zwei konservierte Glutamatreste (Glu106 und Glu190) und drei Aspartatreste (Asp), die die Kalziumpermeabilität des CRAC-Kanals beeinflussen. (B) Das Stromal interaction molecule 1 (STIM1) hat nur eine Transmembrandomäne und ist hauptsächlich in der Membran des ER lokalisiert. Der N-Terminus enthält das Kalziumbindende EF-Hand Motiv mit den negativ geladenen Resten, die notwendig für die Messung der Kalziumkonzentration im ER sind. Vorhersagen über Protein-Protein Interaktionsdomänen in STIM1 beinhalten ein sterile A-Motiv (SAM), coiled-coil Ezrin, Radixin und Moesin (ERM) Domänen, eine Serin und Prolinreiche Region (SP) und eine Lysin-reiche Region (K) (aus Feske, 2007).

Proteinen aufgebaut ist. Penna *et al.* konnten zeigen, dass die Orai-Moleküle unter Ruhebedingungen als Dimere vorliegen, die dann mit den C-Termini der STIM-Moleküle interagieren und erneut dimerisieren. Dadurch bildet sich das aktive Orai-Tetramer und bildet den aktiven Kanal (Penna *et al.*, 2008).

#### 4.5 Funktionen von Mitochondrien bei der kalziumabhängigen Signaltransduktion

Mitochondrien sind Organellen, die in allen eukaryotischen Zellen vorkommen und aus zwei verschiedenen Membranen aufgebaut sind: die äußere und die innere Membran, die in zahlreiche Cristae gefaltet ist. Zwischen den beiden Membranen befindet sich der Intermembranraum und das Zentrum der Mitochondrien bildet die Matrix, die von der inneren Membran umhüllt ist (siehe Abb. 5). Die bekannteste Funktion der Mitochondrien ist die Herstellung von chemischer Energie in Form von ATP (Adenosin-Triphosphat) durch die katabolen Reaktionen des Zitronensäure-Zyklus und der oxydativen Phosphorylierung. Diese Vorgänge laufen in der Matrix und der inneren Membran ab. Jedoch erfüllen die Mitochondrien noch weitere Aufgaben, wie die Regulation der Apoptose (Duchen, 2000) und die Regulation der kalziumabhängigen Signaltransduktion (Hoth *et al.*, 2000).

Mitochondrien können durch einen Uniporter, der in der inneren Membran verankert ist, sehr schnell Kalzium aus dem Cytosol aufnehmen. Diese elektrogene passive Aufnahme wird hauptsächlich durch einen Anstieg der zytosolischen Kalziumkonzentration ausgelöst und durch das negative Potential über der inneren mitochondrialen Membran (- 180 mV) angetrieben, welches durch die Elektronentransportkette verursacht wird. Dieser Uniporter hat nur eine geringe Affinität für Kalzium, d.h. er nimmt nur Kalzium auf, wenn es in höheren Konzentrationen (ab 500 nM) in unmittelbarer Nähe der Mitochondrien auftritt, z.B. in der Nähe von offenen Kalziumkanälen in der Plasmamembran oder dem ER (Rizzuto *et al.*, 2000). Das aufgenommene Kalzium wird anschließend von den Mitochondrien über  $\text{Ca}^{2+}/\text{Na}^{+}$ - und  $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$ -Austauscher in der inneren mitochondrialen Membran wieder abgegeben (Hoth *et al.*, 1997; Lewis, 2001). Diese Abgabe ist jedoch so gering, dass die Affinität des Uniporters nicht ausreicht, um das Kalzium erneut in die Mitochondrien aufzunehmen. Ein weiterer Mechanismus mit dem Kalzium aus den Mitochondrien entfernt werden kann ist die PTP (permeability transition pore) (Huser *et al.*, 1998). Über diesen sehr leitfähigen, nicht-selektiven Kanal ist noch wenig bekannt. Er schützt die Mitochondrien wahrscheinlich vor Kalziumüberladung durch die schnelle Kalziumaufnahme des Uniporters. Durch diese Mechanismen der schnellen Kalziumaufnahme

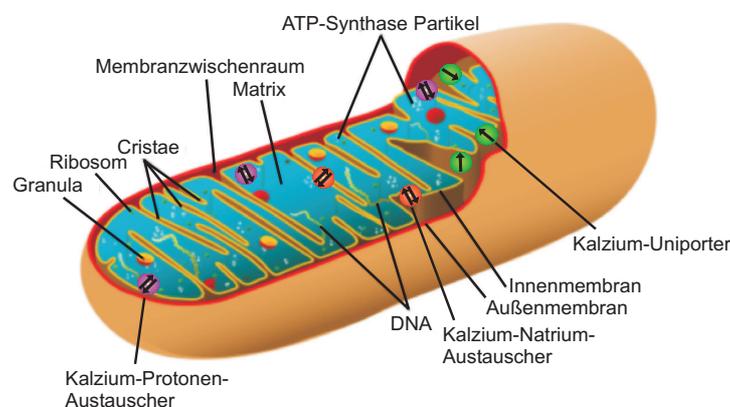
und langsamen Abgabe können die Mitochondrien als intrazelluläre Kalziumpuffer dienen.

Mit Hilfe dieser Pufferfunktion sind die Mitochondrien in der Lage verschiedene Kalzium-Transporter, wie  $IP_3$ -abhängige Kalzium-Kanäle in der ER-Membran (Rizzuto *et al.*, 1993) oder CRAC-Kanäle in der Plasmamembran (Hoth *et al.*, 2000) zu regulieren. Der Kalziumeinstrom über die CRAC-Kanäle ist essentiell für die Aktivierung von T-Zellen. Diese CRAC-Kanäle werden jedoch ihrerseits durch das einströmende Kalzium gehemmt, das sich in zytosolischen Mikrodomänen unter den CRAC-Kanälen ansammelt. Indem nun Mitochondrien, die sich in der Nähe dieses Kanals befinden, das einströmende Kalzium durch den Uniporter aufnehmen, wird die Inaktivierung der CRAC-Kanäle verhindert. Neben der Aufnahme durch Mitochondrien, wird das eingeströmte Kalzium auch von der SERCA in das Lumen des ER's zurückgepumpt und damit die intrazellulären Kalziumspeicher wieder aufgefüllt. Diese Kalziumaufnahme ins ER erfolgt jedoch langsamer als die mitochondriale Aufnahme.

Mitochondrien können in lebenden Zellen eine große Formenvielfalt annehmen, die von vielen kleinen Kompartimenten bis hin zu komplizierten tubulären Netzwerken reicht (Collins *et al.*, 2002; Rizzuto *et al.*, 1993). Durch die Assoziation von Mitochondrien mit dem Zytoskelett der Zelle kann ihre intrazelluläre Verteilung verändert werden. Sie stehen u. a. mit den Mikrotubuli (Ball and Singer, 1982), mit Mikrofilamenten (Morris and Hollenbeck, 1995) und mit intermediären Filamenten in Kontakt (Summerhayes *et al.*, 1983). Mitochondrien zeigen eine Bewegung entlang von Mikrotubuli, die sowohl vorwärts (+) als auch rückwärts (-) gerichtet sein kann (Morris and Hollenbeck, 1995). Diese Bewegung erfolgt mit Hilfe von Motorproteinen, den Kinesinen für die Bewegung in (+)-Richtung und den Dyneinen für die Bewegung in (-)-Richtung. Diese Proteine sind Komplexe, die aus zwei identischen schweren Ketten und einigen kleineren leichten Ketten aufgebaut sind. Jede schwere Kette bildet eine globuläre Kopfregion, die die Motorproteine ATP-abhängig an die Mikrotubuli bindet (Molecular Biology of the Cell, 1994). Die Dyneine sind über Dynactin an die Mitochondrien gekoppelt (Habermann *et al.*, 2001) und die so gebundenen Motorproteine vermögen unter ATP-Verbrauch die Mitochondrien entlang der Mikrotubuli zu bewegen.

Quintana *et al.* haben herausgefunden, dass sich die Mitochondrien in T-Zellen mit Hilfe von Kinesinen nach Thapsigargin-Stimulation entlang der Mikrotubuli in Richtung Plasmamembran wandern (Quintana *et al.*, 2006). Diese Annäherung an die Plasmamembran und die darin enthaltenen CRAC-Kanäle erlaubt es den Mitochondrien Kalzium effektiv an den CRAC-Kanälen aufzunehmen und somit deren Inaktivierung zu verhindern. Bei den mitochondrialen Bewegungen zur IS spielen die Mikrotubuli nur eine untergeord-

nete Rolle. Quintana *et al.* haben in einer weiteren Studie festgestellt, dass die mitochondrialen Bewegungen zur IS entlang des Aktin-Zytoskeletts erfolgen (Quintana *et al.*, 2007). Eine Zerstörung dieses Aktin-Netzwerks mit Latrunculin B verhindert auch die Bewegungen der Mitochondrien zur IS. Nach diesen Ergebnissen schlugen die Autoren folgendes Modell zur mitochondrialen Translokation vor: Die Mitochondrien bewegen sich aktiv entlang der Mikrotubuli in Richtung Plasmamembran, bis sie das kortikale Aktin-Netzwerk erreicht haben. Dort angekommen, wechseln die Mitochondrien von den Mikrotubuli auf das Aktin-Zytoskelett, um dann in Richtung IS zu wandern. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Mitochondrien bewegliche Strukturen in der Zelle sind. Sie können durch Kalzium-Sensor-Moleküle die intrazellulären Kalziumsignale in mitochondriale Bewegungen umsetzen, die dann von den assoziierten Motorproteinen ausgeführt werden (Yi *et al.*, 2004). Die Identität dieser Kalzium-Sensor-Moleküle ist noch nicht genau erforscht. Mit Hilfe der Motorproteine und Kalzium-Sensor-Moleküle könnten die Mitochondrien sich allerdings gezielt in die Bereiche der Zellen bewegen, in denen ihre Kalziumpuffer-Funktion oder ihre ATP-Produktion benötigt werden.



**Abb. 5: Aufbau eines Mitochondriums:** Zur näheren Erläuterung siehe Abschnitt 4.5. Die für die Kalzium-Homöostase wichtigen Transportproteine sind in der inneren mitochondrialen Membran lokalisiert. Über der inneren Membran liegt ein Membranpotential von  $-180\text{ mV}$  an, wodurch Kalzium sehr schnell durch den Uniporter aufgenommen werden kann. Die Kalzium-Austauscher geben das aufgenommene Kalzium anschließend wieder langsam ab.

## 4.6 Zielsetzung dieser Arbeit

Quintana *et al.* haben gezeigt, dass die Mitochondrien in T-Zellen während der T-Zell Aktivierung zur IS wandern. Im ersten Teil dieser Arbeit sollte dieser Vorgang im Hinblick auf die Kalziumabhängigkeit und die zeitliche Kinetik näher untersucht werden. Hierzu wurde die Lokalisation von Mitochondrien in parentalen Jurkat T-Zellen nach Stimulation mit antikörperbeschichteten Beads unter Kalzium und kalziumfreien Bedingungen analysiert.

Zusätzlich sollte der Einfluss der Mitochondrien in T-Zellen auf die Ausbreitung von intrazellulären Kalziumsignalen näher erforscht werden. Um diese Fragestellung zu lösen, wurde eine Kombination aus elektrophysiologischen und fluoreszenzmikroskopischen Techniken eingesetzt, um Kalzium lokal über einen cell-attached Patch an der T-Zell Membran zu applizieren und gleichzeitig die intrazellulären Kalziumkonzentrationen und Lage der Mitochondrien zu detektieren.

Die Aufklärung des Ziels mitochondrialer Bewegungen während der T-Zell Aktivierung war die Hauptfrage, die in dieser Arbeit beantwortet werden sollte. Es war bis dato nicht klar, ob die Mitochondrien zu einem vermehrten Kalziumeinstrom an der IS wandern, um die Inaktivierung der CRAC-Kanäle dort zu verhindern oder ob sie unabhängig von der Kalziumeinstromquelle entlang des Zytoskeletts zur IS wandern. Durch vorangegangene Arbeiten ist bekannt, dass es nach IS-Bildung zu einer Reorganisation des Aktin-Zytoskeletts kommt und sich die Mitochondrien entlang dieses Zytoskeletts zur IS bewegen (Quintana *et al.*, 2007). Durch einen neuartigen experimentellen Aufbau, in dem wir die Bildung der IS und den Kalziumeinstrom in den T-Zellen räumlich separieren konnten, waren wir in der Lage diese Fragen zu beantworten. Dieser experimentelle Aufbau beinhaltete eine lokale Kalzium-Applikation durch einen cell-attached Patch auf einer Seite der T-Zelle und eine kontrollierte Platzierung eines antikörperbeschichteten Beads auf der anderen Seite der T-Zelle. Auch in diesen Experimenten wurden die intrazellulären Kalziumkonzentrationen und die mitochondrialen Lokalisationen simultan im zeitlichen Verlauf gemessen.

Durch die so gewonnenen Erkenntnisse ist ein weiterer Schritt in der Erforschung des menschlichen Immunsystems und die Funktionen der Mitochondrien in diesem Kontext getan. Mit der neu entwickelten Methode zur Separation von Kalziumeinstrom und Bildung einer IS können in der Zukunft auch andere Fragen bezüglich der Kalziumsignalübertragung in Lymphozyten beantwortet werden, die dann möglicherweise in Zukunft zur Entwicklung von neuen Medikamenten führen können.

## 5 Material und Methoden

### 5.1 Material

#### 5.1.1 Chemikalien

Hier nicht aufgeführte Standardlaborchemikalien und Lösungen wurden von den Firmen VWR, Roche, Merck oder Sigma-Aldrich in der Qualität „zur Analyse“ bezogen.

- 2-Aminoethyl-diphenyl-borat (2-APB) (Sigma-Aldrich, D9754)
- 3,5-bistrifluoromethyl-pyrazol (BTP-2) (Altana Pharma)
- $\text{CaCl}_2$  (J. T. Baker, 0504)
- Mesoxalonitril 3-chlorophenylhydrazon (CCCP) (Sigma-Aldrich, 21855)
- DMSO (Sigma, A-0808)
- EGTA (Sigma, E-4378)
- ER-Tracker Green (Molecular Probes, E34251)
- FCS (fetales Kälberserum)(Gibco, 10270-106)
- Fura-2/AM (Molecular Probes, F1221)
- HEPES (Sigma, H-7523)
- MitoTracker Green FM (Molecular Probes, M7514)
- Nocodazol (Sigma-Aldrich, M1404)
- Penicillin/Streptomycin (Gibco, 15140-122)
- Rhod-2/AM (Molecular Probes, R1244)
- Silikon-Fett (Merck, 107746)
- Thapsigargin (Molecular Probes, T7459)

### 5.1.2 Medien und Lösungen

- Medien:
  - RPMI-1640 Invitrogen 500 ml (Gibco), Kat.-Nr. 21875-034: versetzt mit 5.5 ml Penicillin/Streptomycin (Verdünnung 1:100; Stammlösung: 10 000 units/ml Penicillin + 10 000  $\mu$ g/ml Streptomycin), 55 ml FCS
  - PBS Invitrogen (Gibco), Kat.-Nr. 14190-094
  - HBSS (PAA Laboratories GmbH, Kat.-Nr. H15-009)
  
- Lösungen:
  - **0,5 mM CaCl<sub>2</sub>-Lösung:** 155 mM NaCl, 4,5 mM KCl, 10 mM Glukose, 5 mM HEPES, 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,5 mM CaCl<sub>2</sub>, pH 7,4 (eingestellt mit NaOH)
  - **1 mM CaCl<sub>2</sub>-Lösung:** 155 mM NaCl, 4,5 mM KCl, 10 mM Glukose, 5 mM HEPES, 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM CaCl<sub>2</sub>, pH 7,4 (eingestellt mit NaOH)
  - **1 mM CaCl<sub>2</sub>-Lösung mit 1  $\mu$ M Thapsigargin:** 1  $\mu$ M Thapsigargin, 155 mM NaCl, 4,5 mM KCl, 10 mM Glukose, 5 mM HEPES, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM CaCl<sub>2</sub>, pH 7,4 (eingestellt mit NaOH)
  - **0 mM CaCl<sub>2</sub>-Lösung mit 1  $\mu$ M Thapsigargin:** 1  $\mu$ M Thapsigargin (TG), 155 mM NaCl, 4,5 mM KCl, 10 mM Glukose, 5 mM HEPES, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM EGTA, pH 7,4 (eingestellt mit NaOH)

### 5.1.3 Antikörper

- Anti-Human-CD28 Acide free (Euroclone)
- Anti-Human-CD3 Acide free (Euroclone)
- Anti-Human CD3-FITC Antikörper (Dako Cytomation)
- Anti-Human CD3 Antikörper Azide free (AbD Serotec)
- Anti-Human CD28 Antikörper Azide free/Low Endotoxin (BD Pharmingen)

#### 5.1.4 Konstrukte

- TagYFP-bActin
- eGFP-bActin
- pDS SP-YFP-STIM1 II-2

#### 5.1.5 Mikropipetten

- Glaskapillaren aus Sodaklarglas (Hilgenberg, 1412627)
- Glaskapillaren aus Bo-Silikatglas (Hilgenberg, 1405063)

#### 5.1.6 Geräte

- Mikroskope:
  - Zeiss Cell Observer (High Speed Fluoreszenz)
  - Olympus IX70 (Calcium-Imaging)
- Zentrifugen:
  - Centrifuge 5450 C (Eppendorf)
  - Universal 32 R (Hettich)
- Elektrophysiologische Geräte:
  - Heka EPC 9 (Patch-Clamp-Verstärker)
  - Sutter Instrument Company MP-285 (Mikromanipulator)
  - APS (Mikromanipulator)
  - Sutter Instrument Company P-97 (Mikropipetten-Puller)
- Elektroporatoren:
  - Bio-Rad Gene Pulser II
  - Amaxa Nucleofector II
- Schüttler:
  - Reax 2 (Heidolph)
  - Duomax 1030 (Heidolph)

### 5.1.7 Software

- Microsoft Excel
- Zeiss AxioVision (Version 7.2.1)
- TILL Photonics Vision (Version 4.01)
- Wavemetrics Igor Pro (Version 6.0.3.1)
- Corel Draw Graphics Suite (Version 11)

## 5.2 Zellen und Beads

### 5.2.1 Parentale Jurkat-Zellen

Die Kultivierung der parentalen Jurkat-Zellen (Fanger, C. M. *et. al*, 1995) erfolgte in RPMI-Medium (Invitrogen), das mit Penicillin/Streptomycin (Gibco) und FCS (Gibco) versetzt wurde. Durch Passagieren wurde die Zelldichte in einem Bereich von 200 000 - 900 000 Zellen/ml gehalten. Die Kultivierung erfolgte bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> und 95 % H<sub>2</sub>O.

### 5.2.2 Humane CD4<sup>+</sup> T-Zellen

Humane periphere Blutlymphozyten und CD4<sup>+</sup> T-Zellen wurden isoliert und kultiviert wie in Schwarz, A., *et. al* (2004) beschrieben . Um eine Voraktivierung von CD4<sup>+</sup> T-Zellen zu verhindern, wurden die Zellen mittels negativer Aufreinigung laut Herstellerprotokoll behandelt (T-Cell Negative Isolation Kit; Invitrogen; Karlsruhe, Germany).

### 5.2.3 Transfektion von parentalen Jurkat T-Zellen

Parentale Jurkat T-Zellen wurden in einer Dichte von 300 000 Zellen/ml kultiviert. Pro Transfektion wurden ca. 3 Millionen Zellen und eine DNA-Menge von 1-3 µg verwendet. Die Transfektionen wurden gemäß Herstellerprotokoll durchgeführt (Amaxa GmbH, Optimized Protocol for Jurkat Cells, Programm C-16).

### 5.2.4 Herstellung der aCD3/aCD28 beschichteten Beads

Zunächst wurden 100 µl Beads (Polybead polystyrene 6.0 micron Microspheres, Polysciences, Inc.) mit 900 µl 0,1 M Boratpuffer (0,1 M Borsäure, pH 8,5 mit NaOH eingestellt) gemischt und anschließend 5 min bei 8000 x g zentrifugiert. Die Beads wurden dann zweimal in je 1 ml Boratpuffer gewaschen.

Nach dem Waschen wurden die Beads in 450  $\mu\text{l}$  Boratpuffer resuspendiert und 12,5  $\mu\text{l}$  anti-CD3 Antikörper und 37,5  $\mu\text{l}$  anti-CD28 Antikörper zugegeben. Die Beads wurden über Nacht auf dem Rotator mit den Antikörpern inkubiert. Anschließend wurden die Beads erneut zentrifugiert, dann in 500  $\mu\text{l}$  Boratpuffer mit 10 mg/ml BSA resuspendiert und 30 min auf dem Rotator inkubiert. Dieser Schritt wurde insgesamt dreimal wiederholt, bevor die Beads in 500  $\mu\text{l}$  Storage Puffer (Bottle Nr.7 des Carbodiimide Kit für Carboxylate Beads von Polysciences, Inc.) resuspendiert und dann bei 4°C gelagert wurden. Bevor die Beads verwendet wurden, wurde die entsprechende Menge zunächst 2 x mit PBS gewaschen und dann in die entsprechende Messlösung aufgenommen.

### 5.3 Fluoreszenz-Techniken

#### 5.3.1 Markierung der Mitochondrien mit MitoTracker Green FM

Zum Markieren der Mitochondrien in parentalen Jurkat-Zellen und peripheren Blutlymphozyten wurde in dieser Arbeit MitoTracker Green FM (Molecular Probes) verwendet. Es handelt sich dabei um einen Fluoreszenzfarbstoff, der sich spezifisch in die mitochondriale Membran einlagert. Um die Mitochondrien zu markieren, werden die Zellen mit 200 nM MitoTracker Green FM für 30 min inkubiert, woraufhin der Farbstoff passiv durch die Plasmamembran diffundiert und in aktiven Mitochondrien akkumuliert. Das Anregungsmaximum liegt bei 490 nm und das Emissionsmaximum bei 516 nm.

#### 5.3.2 Aktin-Färbung von parentalen Jurkat-Zellen

Zunächst wurden die jeweiligen Experimente wie beschrieben durchgeführt (Bead-Stimulation oder lokale Kalzium Applikation) und anschließend eine Färbung des Aktin Zytoskeletts der Jurkat T-Zellen vorgenommen. Diese Färbung wurde direkt am Messplatz durchgeführt, ohne den experimentellen Aufbau zu verändern oder die Zellen aus der Messkammer zu entnehmen. Die Aktin-Färbung erfolgte wie bei Quintana *et al.* (2007) beschrieben. Daraufhin wurden die Zellen bei 580 nm mit einem Polychrom IV Monochromator (TILL Photonics, Gräfelfing, Deutschland) jeweils für 3000 ms belichtet, wobei als Anregungsfilter ein HQ 560/55 und ein 595 LP als dichroischer Teilerspiegel eingesetzt wurden. Die Fluoreszenz wurde bei 605 nm (HQ 645/75) mit einer CCD Kamera (TILL Photonics) aufgenommen und mittels TILL Vision Software analysiert.

### 5.3.3 Fura-2/AM - Messungen

Für zytosolische Kalzium-Messungen wurden die T-Zellen bei RT für 30 min mit 2  $\mu\text{M}$  Fura-2/AM in RPMI/HEPES-Medium beladen und einmal gewaschen. Vor den Experimenten wurden die Zellen auf ein Deckglas (Durchmesser 25 mm, Stärke 1, Kindler) überführt und für 2 min im Dunkeln absetzen gelassen. Danach wurden die Fura-2 Fluoreszenzen entweder direkt gemessen und die Zellen mit den jeweiligen Messlösungen umspült oder die Zellen wurden zuerst gepatcht, die Fura-2 Messung gestartet und nach 20 s der Kalziumeinstrom durch Änderung des Membranpotentials gestartet.

Die Fura-2 beladenen T-Zellen wurden für jeweils 20 ms mit Licht der Wellenlängen 340 und 380 nm belichtet. Die Fura-2 Emission wurde bei 520 nm mit einer CCD-Kamera (TILL Imago) detektiert. Als Mikroskop wurde ein Olympus IX70 mit einem 60x UPlanFL Objektiv (N.A.=1,25) und einem dichroischen Spiegel DCLP 500 (UV) mit einem LP 515 als Emissionsfilter verwendet. Alle Messungen wurden mit dem Programm TILL Vision (TILL Photonics) aufgenommen und anschließend mit diesem Programm und mit IGOR pro (Wavemetrics) ausgewertet.

### 5.3.4 Rhod-2/AM - Messungen

Bei Rhod-2/AM handelt es sich um ein Rhodamin-Derivat, welches positiv geladen ist. Durch diese Eigenschaft wird Rhod-2 über eine Membranpotential getriebene Aufnahme in Mitochondrien angereichert. Mitochondrien besitzen eine hohe Kalziumaufnahme-Kapazität und benötigen daher Kalziumindikatoren mit einer niedrigen Affinität für Kalzium, wie Rhod-2 ( $K_d = 570 \text{ nM}$ ). Rhod-2 hat sein Absorptionsmaximum bei 550 nm und sein Emissionsmaximum bei 571 nm.

Für mitochondriale Kalzium-Messungen wurden parentale Jurkat T-Zellen bei RT für 45 min mit 10  $\mu\text{M}$  Rhod-2/AM in RPMI/HEPES-Medium beladen, einmal gewaschen und anschließend elektroporiert. Diese Elektroporation diente zur Entfernung von überschüssigem Rhod-2 aus dem Zytosol (Quintana *et al.*, 2007). Nach zweimaligem Waschen wurden die Zellen bei RT für 10 min gelagert und danach in eine 0 mM  $\text{CaCl}_2$ -Lösung mit 1  $\mu\text{M}$  Thapsigargin überführt.

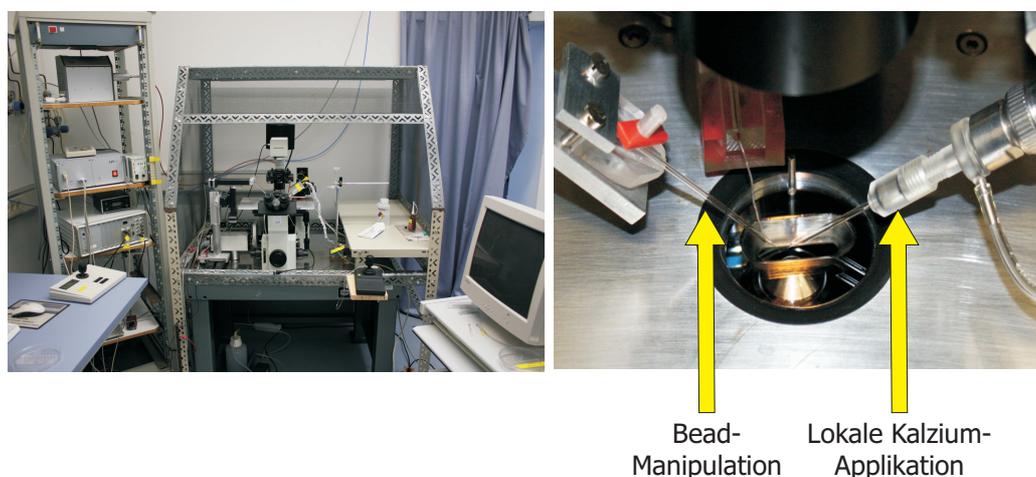
Zunächst wurde das Membranpotential der Zellen in der cell-attached Patch Konfiguration auf + 150 mV geklemmt und nach 20 s auf - 100 mV eingestellt. Als Pipettenlösung wurde eine 1 mM  $\text{CaCl}_2$ -Lösung benutzt. Die Messungen und Analyse wurde wie in Quintana *et al.*, (2007) beschrieben durchgeführt.

## 5.4 Elektrophysiologische Technik zur Kontrolle des lokalen Kalziumeinstroms

Um Kalzium an einem räumlich begrenzten Teil der Plasmamembran von T-Zellen zu applizieren, wurde in dieser Arbeit die Patch Clamp Technik eingesetzt. Diese Methode der lokalen Kalzium-Applikation wurde erstmals von Mogami *et al.* eingesetzt, um die Kalzium-Ausbreitung in pankreatischen Azinuszellen zu untersuchen. Die Bezeichnung Patch bezieht sich auf den kleinen Membranausschnitt (engl. Patch: Flicker) unter der Patch-Pipette, die zugleich als Messelektrode diente. Während den Messungen wurde der Membranpatch auf einem vorgegebenem Potential gehalten (engl. to clamp: befestigen, festklemmen). Die Messelektrode wurde aus einer Glaskapillare (Borosilikatglas) angefertigt, die dazu unter Hitzeeinwirkung mit einem Pipettenpuller (Sutter Instruments) sehr dünn ausgezogen wurde. Die Leitfähigkeit der Pipette wurde durch Befüllung mit einer Lösung (1 mM  $\text{CaCl}_2$ -Lösung) hergestellt, in die ein mit Silberchlorid beschichteter Silberdraht eintauchte. Die gefüllte Patch-Pipette wurde in einen Halter gespannt und an den dort angebrachten Vorverstärker angeschlossen. Der Stromkreis wurde mittels einer Badelektrode aus Silberdraht geschlossen. Die kurze Entfernung zwischen Messelektrode und Verstärker war notwendig, um die Überlagerung der sehr kleinen Messströme durch äußere Störsignale auf ein Mindestmaß zu verringern. Der Widerstand der mit Lösung befüllten Messelektrode betrug in den Experimenten dieser Arbeit zwischen 2 und 5 M $\Omega$ .

Zu Beginn der Experimente wurde die Patch-Pipette vorsichtig auf eine intakte T-Zelle platziert. Unterhalb der Pipette innerhalb des Durchmessers der Spitze befand sich ein Stück Membran - der Patch oder Membranfleck. Anschließend wurde durch leichten Unterdruck, der am hinteren Ende der Pipette angelegt wurde, eine starke Verbindung zwischen Membran und Pipette erzeugt. Zwischen dem Inneren der Pipette und der Außenlösung entstand dadurch ein elektrischer Widerstand in der Größenordnung von mehreren Gigohm, der sogenannte Gigaseal. Mit der Herstellung des Gigaseals war die sogenannte cell-attached-Konfiguration erreicht.

Durch Änderung des Membranpotentials mit Hilfe des Patch-Clamp-Verstärkers (Heka Elektronik, EPC 9) war es möglich, den Kalziumeinstrom von der Pipette über Kalzium-Kanäle in der Plasmamembran in die Zelle zu steuern. So wurde zu Beginn der Experimente ein positives Membranpotential angelegt (+ 150 mV für Jurkat T-Zellen und + 60 mV für  $\text{CD4}^+$  T-Zellen), um einen frühzeitigen Kalziumeinstrom zu unterbinden. Durch sprunghafte Änderung des Membranpotentials auf negative Werte (- 100 mV für Jurkat T-Zellen und - 60 mV für  $\text{CD4}^+$  T-Zellen) konnte der Kalziumeinstrom initiiert werden.



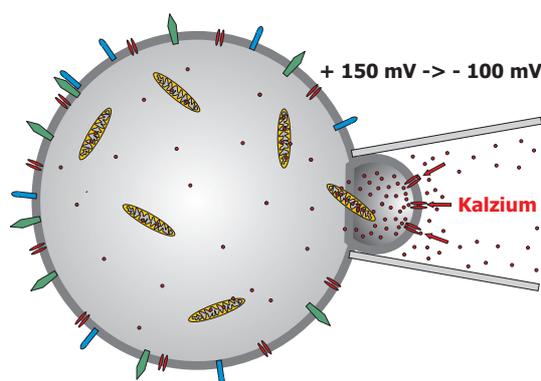
**Abb. 6: Kombiniertes Imaging/Patch-Clamp-Messplatz:** Das linke Bild zeigt eine Übersicht über den selbstgebauten Messplatz. Das rechte Bild zeigt eine Nahaufnahme der Messkammer und den beiden Mikropipetten, die für die Kalzium-Applikation und die Bead-Manipulation eingesetzt werden.

#### 5.4.1 Lokale Kalzium-Applikation mittels Patch-Clamp Technik

In dieser Experimentreihe wurde Kalzium durch eine Patchpipette lokal an einem Bereich der T-Zell Membran appliziert, um den Einfluss der mitochondrialen Lokalisation auf die intrazellulären Kalziumsignale zu untersuchen. Hierzu wurden die T-Zellen mit  $2 \mu\text{M}$  Fura-2/AM und  $200 \text{ nm}$  MitoTracker Green FM für  $30 \text{ min}$  bei RT in RPMI/HEPES-Medium beladen, um später im Versuch gleichzeitig die Lokalisation der Mitochondrien und die Veränderungen der zytosolischen Kalziumkonzentrationen ermitteln zu können. Vor dem Versuchsbeginn wurden die Zellen für  $3 \text{ min}$  mit  $1 \mu\text{M}$  Thapsigargin ( $0 \text{ mM}$   $\text{CaCl}_2$ -Lösung mit  $1 \mu\text{M}$  Thapsigargin) vorbehandelt, um eine Entleerung der intrazellulären Kalziumspeicher zu bewirken und die Öffnung der speichergesteuerten Kalziumkanäle in der Plasmamembran der T-Zellen zu bewirken. Thapsigargin ist ein spezifischer Blocker der SERCA und verhindert ein Wiederauffüllen der Kalziumspeicher, welche sich durch passive Transporterscheinungen über die Zeit entleeren.

Bei Versuchsbeginn wurde die cell-attached Patch Konfiguration hergestellt und ein Membranpotential von  $+150$  (Jurkat-Zellen) bzw.  $+60 \text{ mV}$  ( $\text{CD4}^+$  T-Zellen) eingestellt, um einen vorzeitigen Kalziumeinstrom zu unterbinden (siehe Abb. 7).  $20 \text{ s}$  nach Beginn der Messungen wurde das Membranpotential sprunghaft auf  $-100$  bzw.  $-60 \text{ mV}$  gewechselt und somit der Kalziumeinstrom gestartet. Während der Messung wurden die Zellen jede Sekunde abwechselnd mit Licht der Wellenlänge  $340$  und  $380 \text{ nm}$  (für jeweils  $20 \text{ ms}$ ),

490 nm (100 ms) und Infrarotlicht (20 ms) belichtet, um die Zellmorphologie zu überprüfen. Die Infrarot- und Fluoreszenzbilder wurden mit einer CCD-Kamera (TILL Imago) detektiert. Als Mikroskop wurde ein Olympus IX70 mit einem 60x UPlanFL Objektiv (N.A.=1,25) und einem dichroischen Spiegel DCLP 500 (UV) mit einem LP 515 als Emissionsfilter verwendet. Alle Messungen wurden mit dem Programm TILL Vision (TILL Photonics) aufgenommen und anschließend mit diesem und mit IGOR pro (Wavemetrics) ausgewertet.



**Abb. 7: Lokale Kalzium-Applikation durch Cell-attached Patch:** Die T-Zelle wird mittels einer Glasmikropipette in der cell-attached Patch Konfiguration gepatcht und der Kalziumstrom über den gepatchten Membranbereich durch Änderung des Membranpotentials gesteuert. Die Badlösung ist frei von Kalzium, sodass Kalzium nur durch die Pipette in die Zelle eindringen kann. Die Pipette wurde vorher mit einer 1 mM  $\text{CaCl}_2$ -Lösung befüllt.

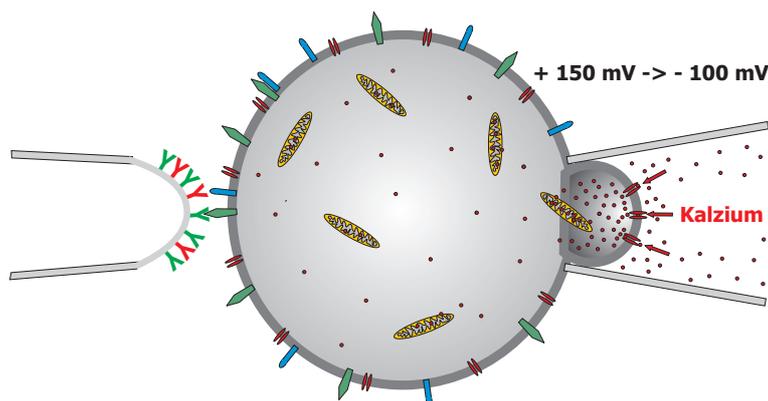
#### 5.4.2 Kombination aus lokaler Kalzium-Applikation und fokaler Stimulation von T-Zellen

Neben der Aktivierung der T-Zellen durch Thapsigargin wurden die Zellen auch lokal durch verschiedene Methoden stimuliert. Zum einen wurden aCD3-FITC-Antikörper zusammen mit einer 1 mM  $\text{CaCl}_2$ -Lösung zum Befüllen der Mikropipette benutzt. Zum anderen wurden aCD3/aCD28-beschichtete Beads verwendet, die mittels Mikromanipulator an die gewünschte Stelle an der Plasmamembran der T-Zellen platziert wurden. Zudem wurden aCD3/aCD28-Antikörper direkt auf eine Mikropipette aus Sodaglas gebunden und diese beschichtete Pipette mittels Mikromanipulator an die T-Zelle gefahren. Gleichzeitig wurde Kalzium lokal an der gegenüberliegenden Seite der Zelle appliziert und die Mitochondrienlokalisation und Kalziumkonzentration gemessen, wie in Abschnitt 5.4.1 beschrieben wurde.

### Stimulation durch aCD3/aCD28 -antikörperbeschichtete Pipette

Um die Glaspipetten (Sodaglas, Hilgenberg) mit Antikörpern zu beschichten, waren mehrere Vorbehandlungsschritte notwendig. Zuerst wurden die Glasrohlinge mit Hilfe eines Pullers (Sutter Instruments) zu Mikropipetten ausgezogen und anschließend die Spitzen mittels eines Glühdrahts (Eigenbau) rund geschmolzen, sodass die Spitze die Form einer Kugel bekam (Durchmesser ca.  $6 \mu\text{m}$ ). Danach wurden die Pipetten mit 0,01 % Poly-L-Lysin für 15 min bei RT gecoatet und anschließend für 30 min bei  $60 \text{ }^\circ\text{C}$  im Trockenschrank getrocknet. Die Antikörperbeschichtung mit aCD3/aCD28-Antikörpern wurde mit einer Antikörperverdünnung von 1:10 in PBS für 2 h bei  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  im Inkubator durchgeführt.

In den eigentlichen Experimenten wurden diese beschichteten Pipetten dann an die bereits gepatchte T-Zelle herangeführt und die Experimente im Anschluss, wie in Abschnitt 5.4.1 dargestellt, durchgeführt. Abb. 8 zeigt den schematischen Aufbau dieser Experimente.

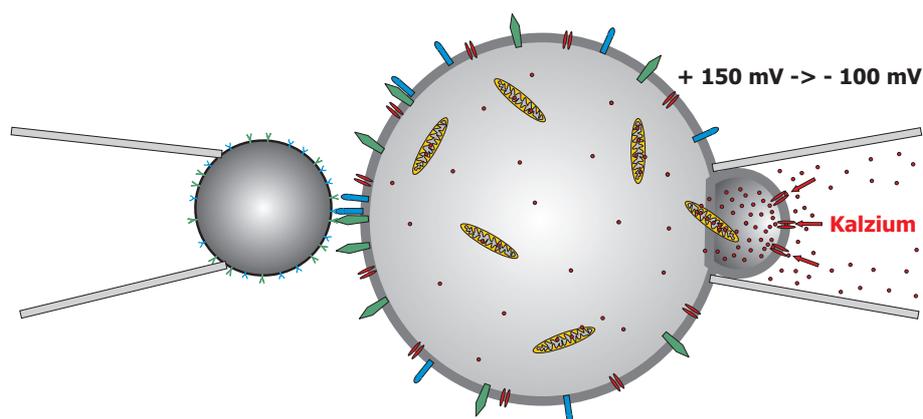


**Abb. 8: Kombination aus lokaler Kalzium-Applikation und fokaler Stimulation über antikörperbeschichtete Pipette:** Eine T-Zelle wird in der cell-attached Patch Konfiguration, wie in Abschnitt 5.4.1 beschrieben, gepatcht. Diese Pipette enthält 1 mM  $\text{CaCl}_2$ -Lösung und dient der lokalen Kalzium-Applikation. Auf der linken Seite ist die aCD3/aCD28-Antikörperbeschichtete Pipette dargestellt, deren Spitze zu einer runden Form geschmolzen wurde. Diese Pipette dient der fokalen Stimulation der T-Zelle. Der Kalziumeinstrom wird durch Änderung des Membranpotentials initiiert.

**Stimulation durch aCD3/aCD28-beschichtete Beads** Ein anderes Verfahren die T-Zellen an einem genau definierten Bereich der Plasmamembran zu stimulieren stellte der Einsatz von aCD3/aCD28-beschichteten Beads dar. Diese wurden mit Hilfe eines zweiten Mikromanipulators punktgenau an

der der lokalen Kalzium-Applikation gegenüberliegenden Seite der Zelle platziert (siehe Abb. 9). Die Beads wurden dazu im Vorfeld mit Antikörpern beschichtet, wie in Abschnitt 5.2.4 erläutert wurde. Vor den eigentlichen Experimenten wurden die Beads 2 x mit PBS gewaschen und im Anschluss in 0 mM  $\text{CaCl}_2$ -Lösung resuspendiert. Die T-Zellen, die sich ebenfalls in einer 0 mM  $\text{CaCl}_2$ -Lösung befanden, wurden zunächst wieder in der cell-attached Patch Konfiguration gepatcht und die Beads in die Badlösung gegeben. Nach einer Wartezeit von ca. 1 min waren die Beads soweit abgesunken, dass sie durch eine leere Mikropipette mittels Kapillarwirkung aufgenommen werden konnten. Danach konnten sie behutsam mit Hilfe eines Mikromanipulators an die gepatchte Zelle gefahren werden. An der gepatchten Zelle wurde während der ganzen Zeit ein Membranpotential von + 150 mV angelegt, um einen vorzeitigen Kalziumeinstrom zu inhibieren.

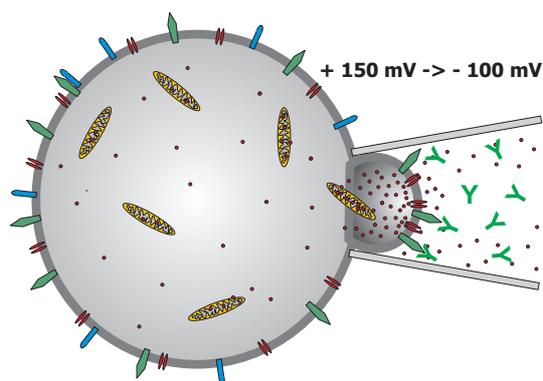
Im Folgenden wurden alle 30 s Bilder bei 340, 380, 490 nm und Infrarotbereich über insgesamt 1 h aufgenommen. Die Auswertung und verwendete Hardware war genau dieselbe, wie in Abschnitt 5.4.1 beschrieben.



**Abb. 9: Kombination aus lokaler Kalzium-Applikation und fokaler Stimulation über antikörperbeschichtete Beads:** Kalzium wird über den cell-attached Patch lokal an der Plasmamembran der T-Zelle appliziert (rechte Seite). Auf der linken Seite wird ein aCD3/aCD28-beschichteter Bead mittels Mikropipette an die Zelle gefahren, um an dieser Stelle die Zelle fokal über den T-Zell Rezeptor zu stimulieren.

**Stimulation durch aCD3-FITC Antikörper in der Mikropipette** Eine weitere Möglichkeit die T-Zellen fokal zu stimulieren bestand darin, die Pipette zur lokalen Kalzium-Applikation gleichzeitig mit aCD3-FITC-Antikörpern zu beladen (Dako, Klon: UCHT1, Verhältnis 1:20). Dadurch wurde sichergestellt, dass die Antikörper nur an einem kleinen, definierten Bereich

mit den CD3-Molekülkomplexen auf der Membran der T-Zellen reagieren konnten und so die Signalkaskade zur T-Zell-Aktivierung vom Patch aus initiiert wurde (siehe Abb. 10). Auch in diesen Experimenten wurden die T-Zellen zunächst in die Messkammer zusammen mit 0 mM  $\text{CaCl}_2$ -Lösung gegeben und im Anschluss die cell-attached Patch Konfiguration hergestellt. Die Experimentdurchführung, Bildaufnahme und Auswertung wurde gemäß den Experimenten in Abschnitt 5.4.1 durchgeführt. Hierbei sind Lokalisation der IS und Lokalisation des Kalzium Einstroms identisch.



**Abb. 10: Kombination aus lokaler Kalzium-Applikation und fokaler Stimulation über antikörperbefüllte Pipette:** Eine T-Zelle wird in der cell-attached Patch Konfiguration, wie in Abschnitt 5.4.1 beschrieben, gepatcht. In der Pipette befinden sich neben der 1 mM  $\text{CaCl}_2$ -Lösung noch zusätzlich aCD3-FITC Antikörper, um die T-Zelle fokal über den Patch zu stimulieren. Der Kalziumeinstrom wird durch Änderung des Membranpotentials gesteuert.

## 6 Ergebnisse

### 6.1 Arbeitshypothese

Unsere Arbeitsgruppe hat in früheren Untersuchungen festgestellt, dass die Mitochondrien maßgeblich an der T-Zell Aktivierung beteiligt sind. So konnten wir zeigen, dass die Mitochondrien nach Kalzium-Einstrom über die CRAC-Kanäle zur Plasmamembran wandern und dort als Kalzium-Puffer dienen, um die kalziumabhängige Inaktivierung der CRAC-Kanäle zu verhindern (Quintana *et al.*, 2006). Durch diese gerichtete Bewegung und Kalziumaufnahme der Mitochondrien kann mehr Kalzium in die T-Zellen strömen und so zu einer effizienteren T-Zell Aktivierung führen.

Im Folgenden waren wir daran interessiert, ob eine Translokation von Organellen insbesondere Mitochondrien festzustellen ist, wenn die T-Zellen fokal über eine IS stimuliert werden. Wir konnten in unseren Experimenten mit T-Zellen eine zielgerichtete und zytoskelettabhängige mitochondriale Bewegung zur IS hin beobachten (Quintana *et al.*, 2007). Die Mitochondrien näherten sich der IS auf Abstände unter  $< 200$  nm, wie wir mit Hilfe von TIRF-Mikroskopie Experimenten herausgefunden haben. Die Umverteilung von Mitochondrien zur IS war notwendig, um den Kalzium-Einstrom über die Plasmamembran und kalziumabhängige T-Zell Aktivierung aufrecht zu erhalten.

Es blieben jedoch mehrere Fragen offen:

1. Wie sieht die Kinetik der Mitochondrienbewegung zur IS über einen längeren Zeitraum (z.B.: 1 h) aus?
2. Wie beeinflussen Mitochondrien lokale Kalziumsignale in T-Zellen?
3. Was veranlasst die Mitochondrien zur IS zu wandern? Ein erhöhter Kalziumeinstrom im Bereich der IS oder die Bildung der IS selbst mit der einhergehenden Reorganisation des Zytoskeletts?

Diese Fragen sollten in der vorliegenden Arbeit untersucht und beantwortet werden.

### 6.2 Kalziumabhängige mitochondriale Bewegung zur Immunologischen Synapse

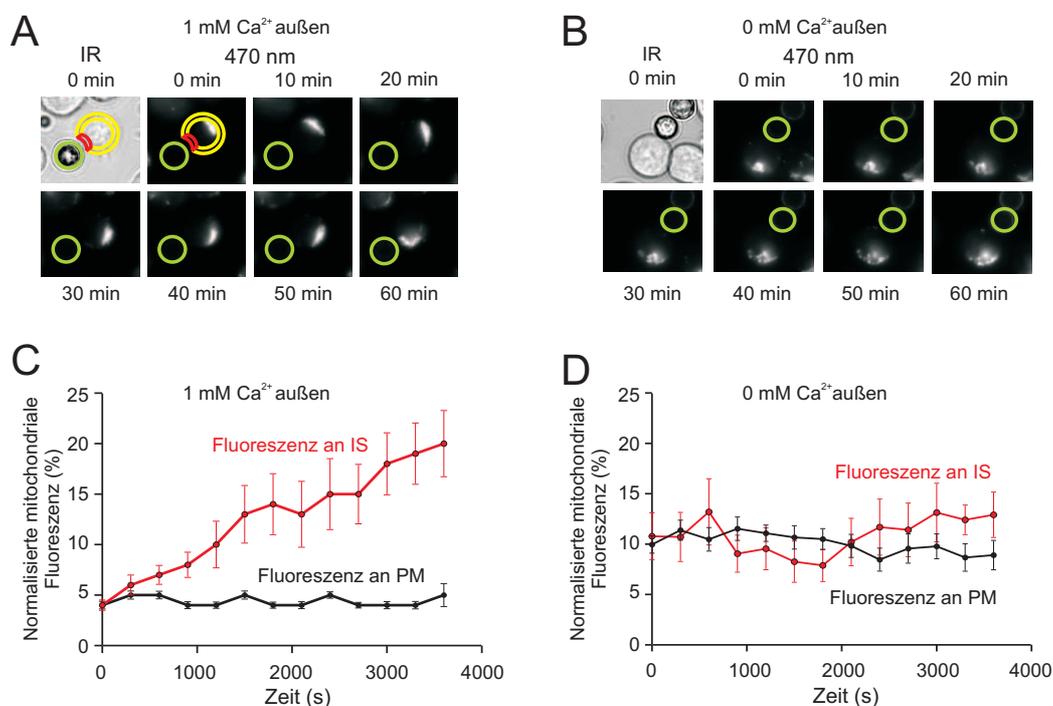
Um die Kinetik der Mitochondrienbewegungen in T-Zellen nach Bildung der IS zu analysieren, wurden die Mitochondrien in Jurkat T-Zellen mit MitoTracker Green FM angefärbt und die Zellen mit Hilfe von aCD3/aCD28-beschichteten Beads fokal stimuliert. Abb. 11 (A) und (B) zeigen jeweils die

Lokalisation von Mitochondrien in Jurkat T-Zellen nach Stimulation mit einem Bead unter kalziumanwesenden und kalziumfreien Bedingungen im zeitlichen Verlauf. Wenn Kalzium extrazellulär vorhanden war, so bewegten sich die Mitochondrien im Verlauf einer Stunde zielgerichtet zur IS. Ohne externe Kalziumzugabe veränderten die Mitochondrien ihre Lage kaum, es waren keine gerichtete Bewegungen zur IS festzustellen.

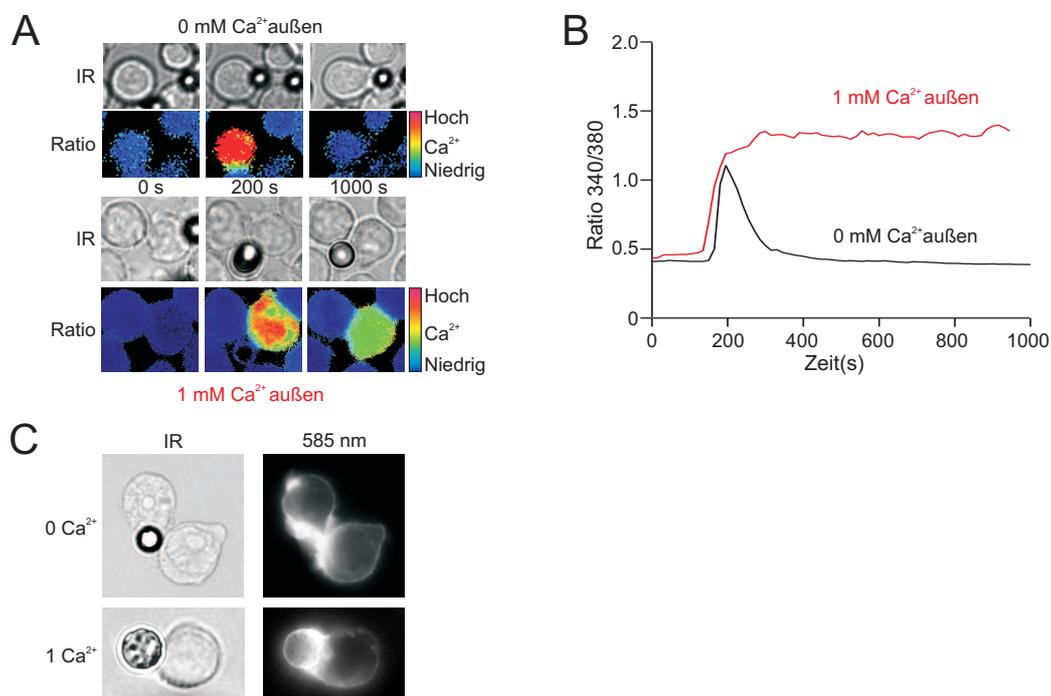
Für die Analyse dieser mitochondrialen Bewegungen wurden die Fluoreszenzintensitäten im Bereich der IS (rote Markierung in Abb. 11 (A)) über die Zeit in Bezug zur mitochondrialen Fluoreszenz im restlichen Bereich unter der T-Zell Plasmamembran (gelbe Markierung in Abb. 11 (A)) ausgewertet. Im IS-Bereich kann man bei Anwesenheit von externem Kalzium eine konstante nahezu lineare Zunahme der mitochondrialen Fluoreszenz über einen Zeitraum von einer Stunde beobachten (Abb. 11 (C), rote Linie). Im übrigen Bereich unter der Plasmamembran der T-Zellen bleibt die mitochondriale Fluoreszenz unverändert (Abb. 11 (C), schwarze Linie). Unter kalziumfreien Bedingungen gibt es im Verlauf einer Stunde keine signifikanten Unterschiede der mitochondrialen Fluoreszenzintensitäten zwischen IS-Bereich und übrigen Bereich unter der Plasmamembran (Abb. 11 (D)).

Daraus folgt, dass die Mitochondrien in Jurkat T-Zellen einen Kalziumeinstrom über die Plasmamembran benötigen, um sich in den Bereich der IS zu bewegen. Diese Bewegung findet dann konstant über einen Zeitraum von mindestens einer Stunde statt. Ohne Kalziumeinstrom verändert sich die Lokalisation der Mitochondrien kaum.

Um zu überprüfen, ob es unter den Bedingungen der fokalen Stimulation mit antikörperbeschichteten Beads überhaupt zur Bildung einer IS und nachfolgendem Kalziumeinstrom über die Plasmamembran in Jurkat T-Zellen kommt, wurden Kalzium-Imaging Experimente und Fluoreszenzfärbungen des Aktin-Zytoskeletts mit und ohne extrazellulärem Kalzium durchgeführt. Abb. 12 (B) zeigt die gemittelten Fura-2 Ratio Werte von Jurkat T-Zellen, die mit beschichteten Beads stimuliert wurden. Sowohl mit als auch ohne externes Kalzium findet eine IS-vermittelte Entleerung der intrazellulären Kalziumspeicher statt, doch nur bei externer 1 mM  $\text{CaCl}_2$ -Lösung kommt zusätzlich zu einem Kalziumeinstrom über die Plasmamembran. Die IS bildet sich also unabhängig von der Anwesenheit von externem Kalzium aus. Zur weiteren Kontrolle dieser Ergebnisse wurde zusätzlich noch die Reorganisation des Aktin-Zytoskeletts observiert, welche für die Ausbildung einer IS notwendig ist (Dustin and Cooper, 2000; Qi *et al.*, 2001). Hierzu wurden die T-Zellen wie üblich mit den Beads für 30 min in der Messkammer inkubiert und anschließend fixiert. Es erfolgte eine Färbung des Aktin-Zytoskeletts mit Texas Red gekoppeltem Phalloidin, dem aktinstabilisierenden Gift des Knollenblätterpilzes. Abb. 12 (C) zeigt zwei Beispiele der Aktin-Akkumulation im



**Abb. 11: Die Translokation von Mitochondrien zur IS benötigt Kalziumeinstrom über die Plasmamembran:** (A) Infrarot und Fluoreszenzbilder einer einzelnen MitoTracker Green/AM beladenen Jurkat T-Zelle in einer 1 mM CaCl<sub>2</sub>-Lösung. Die Zelle wird durch einen aCD3/aCD28 beschichteten Bead stimuliert. Die Mitochondrien bewegen sich über die Zeit zum Kontaktbereich zwischen Bead und Zelle (IS, durch rote Linie hervorgehoben). (B) Gleiche Versuchsbedingungen wie in (A) aber in 0 mM CaCl<sub>2</sub>-Lösung. Man kann keine signifikanten Mitochondrienbewegungen erkennen. (C) Statistische Auswertung der Mitochondrienlokalisierung unter der Plasmamembran ( $\leq 0,99 \mu\text{m}$  unter der PM) in Jurkat T-Zellen ( $n = 13$ ;  $\pm$  SEM) nach aCD3/aCD28 Bead-Stimulation in 1 mM CaCl<sub>2</sub>-Lösung. Die rote Linie entspricht der Mitochondrienfluoreszenz an der IS und die schwarze Linie zeigt die Fluoreszenz unter der PM ohne den IS-Bereich. Die Fluoreszenz wurde auf die Größe der einzelnen Auswertebereiche normalisiert (hervorgehoben in (A)). (D) Statistische Auswertung der mitochondrialen Fluoreszenz unter der PM in Jurkat T-Zellen ( $n = 9$ ;  $\pm$  SEM) unter kalziumfreien Bedingungen.



**Abb. 12: Die Bildung der IS ist unabhängig vom Kalziumeinstrom:** (A) Infrarot- und Fura-2 Ratio-Bilder von Jurkat T-Zellen in 1 mM  $\text{CaCl}_2$ -Lösung und 0 mM  $\text{CaCl}_2$ -Lösung, die mit aCD3/aCD28 Beads stimuliert wurden. (B) Gemittelte Fura-2 Ratio Werte von Jurkat T-Zellen in 1 mM  $\text{CaCl}_2$ -Lösung (rote Linie;  $n = 56$ ) und 0 mM  $\text{CaCl}_2$ -Lösung (schwarze Linie;  $n = 103$ ), die mit aCD3/aCD28 Beads stimuliert wurden. (C) Infrarot- und Fluoreszenzbilder von einzelnen Jurkat T-Zellen, in denen das Aktin-Zytoskelett mit Phalloidin/Texas Red gefärbt wurde, nachdem die Zellen für 30 min mit aCD3/aCD28 Beads in 1 mM  $\text{CaCl}_2$ -Lösung oder 0 mM  $\text{CaCl}_2$ -Lösung stimuliert wurden.

Zell-Bead-Kontaktbereich mit und ohne extrazellulärem Kalzium. Bei beiden Bedingungen kommt es zur Aktin-Akkumulation und Bildung einer IS. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Bildung der IS in T-Zellen unabhängig vom Kalziumeinstrom über die Plasmamembran ist, die Bewegung der Mitochondrien zur IS jedoch kalziumabhängig ist.

### 6.3 Intrazelluläre Kalziumsignale in T-Zellen werden durch die mitochondriale Lokalisation beeinflusst

Da Mitochondrien in T-Zellen neben der Energiegewinnung auch regulierend in den Mechanismus des Kalzium-Signalwegs eingreifen, wurden diese Funktionen durch neuartige Kombination von elektrophysiologischen und Imaging Techniken näher untersucht. Ziel dieser Experimente war es, durch lokale Kalzium-Applikation an einer definierten Stelle der T-Zell Plasmamembran unter Berücksichtigung der mitochondrialen Lokalisation die intrazellulären Kalzium-Signale zu messen. Zunächst musste hierfür jedoch ein Kalzium-Imaging Messplatz mit einem portablen elektrophysiologischen Messplatz ausgestattet und die Kombination aus beiden Techniken eingehend getestet werden (siehe Abschnitt 5.4).

#### 6.3.1 Kontrollierte lokale Kalzium-Applikation durch cell-attached Patch Technik

Zu Beginn dieser Experimentreihe musste zuerst überprüft werden, ob es mit Hilfe der cell-attached Patch Technik möglich ist, während Kalzium-Imaging Versuchen Kalzium lokal an den T-Zell Membranen zu applizieren. Mit dieser lokalen Kalziumzugabe sollte sichergestellt werden, dass der Kalziumeinstrom nur an diesem kleinen Bereich der T-Zell Oberfläche erfolgen kann, um dann zu untersuchen, wie die Mitochondrien diese Kalziumausbreitung beeinflussen. Der experimentelle Aufbau und Ablauf dieser Experimente wurde bereits in Abschnitt 5.4.1 dargestellt.

Abb. 13 (A) zeigt die Fura-2 Ratio Werte einer Jurkat T-Zelle nach TG Behandlung und Kalzium-Applikation mittels cell-attached Patch Technik. Der Kalziumeinstrom über die Kanäle im Membranpatch erfolgte erst nach dem Wechsel des Membranpotentials nach 100 s von + 150 mV auf - 100 mV. Der erneute Potentialwechsel nach 150 s auf + 150 mV beendete den Kalziumeinstrom nahezu unverzüglich. Somit war es nun möglich durch Änderung des Membranpotentials durch den Patch-Clamp Verstärker die treibende elektrochemische Kraft für Kalzium zu manipulieren und so den Kalziumeinstrom über den Patch gezielt steuern zu können. Abb. 13 (B) verdeutlicht noch einmal den genauen experimentellen Aufbau. In Abb. 13 (C) ist die räumliche Ausbreitung des Kalziumeinstroms in einer Jurkat T-Zelle gezeigt. Nach TG Stimulation und Änderung des Membranpotentials verteilt sich das einströmende Kalzium vom Patch ausgehend. Bereiche, in denen Mitochondrien liegen, weisen niedrigere Kalziumkonzentrationen auf. Abb 13 (D) verdeutlicht, dass die Kalziumkonzentrationen nach Änderung des Membranpotentials von - 100 mV auf + 150 mV durch die Technik des cell-attached Patch auch wieder

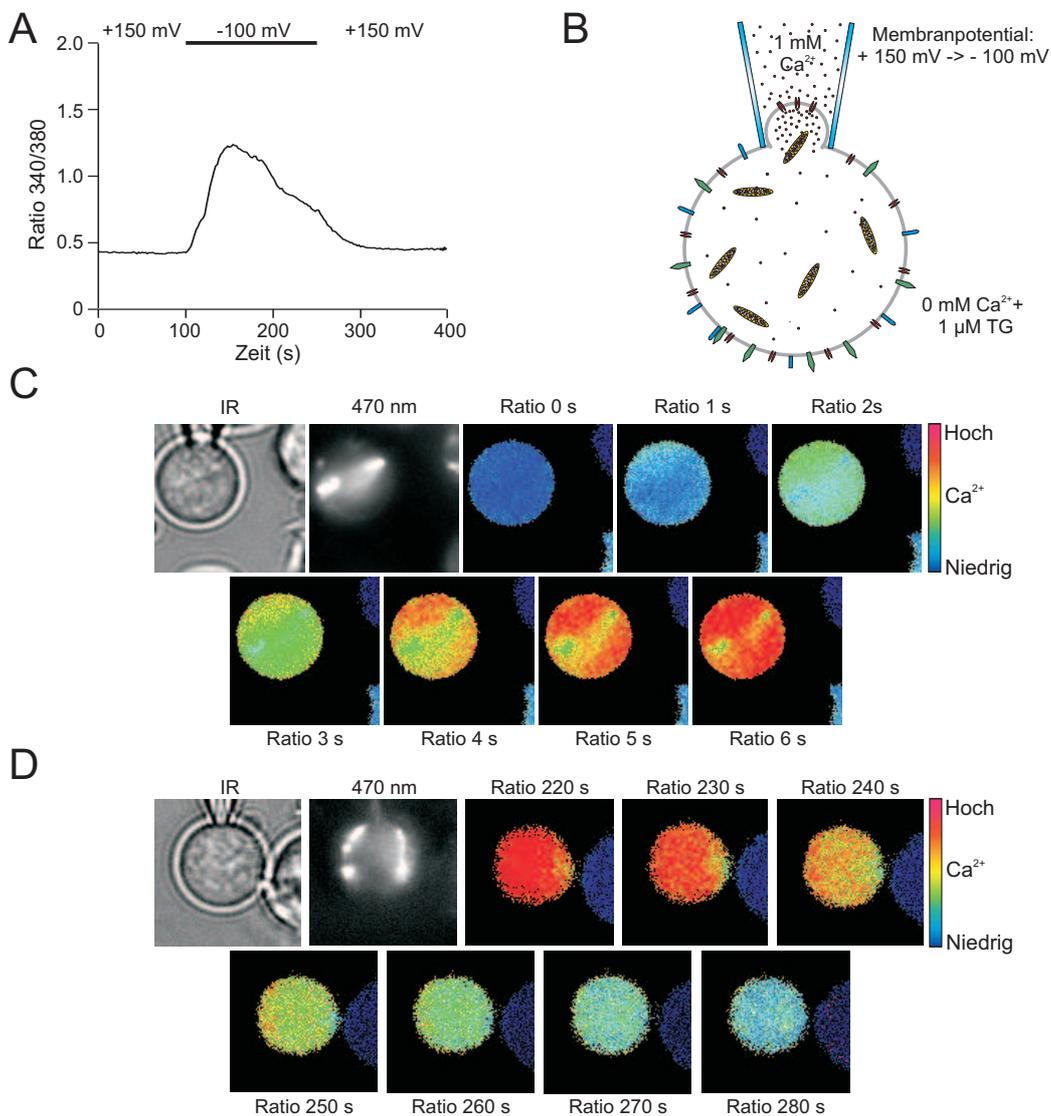
erniedrigt werden können. Somit kann der Kalziumeinstrom reversibel aus- und angeschaltet werden.

### 6.3.2 Einfluss der Mitochondrien-Lokalisation auf Kalziumsignale in Jurkat T-Zellen

Nach Optimierung der Methoden wurden nun Jurkat T-Zellen nach TG Behandlung hinsichtlich des Kalziumeinstroms über den Patch und die Lokalisation der Mitochondrien bezüglich des Kalziumeinstrombereichs untersucht (Versuchsbedingungen siehe Abschnitt 5.4.1). Zur Analyse der Kalziumsignale in Abhängigkeit vom Aufenthaltsort der Mitochondrien wurden die T-Zellen in 2 Populationen eingeteilt: T-Zellen mit Mitochondrien nah am Kalziumeinstrom und T-Zellen mit Mitochondrien entfernt vom Kalziumeinstrom (Beispiele siehe Abb. 14 (A)). Die Ergebnisse dieser Analyse der Fura-2 Ratio Werte ist in Abb. 14 (B) gezeigt. T-Zellen, in denen Mitochondrien nah am Kalziumeinstrom/Patch vorhanden sind, zeigen höhere intrazelluläre Kalziumkonzentrationen als T-Zellen ohne Mitochondrien in der Nähe des Patch. Der Unterschied bezüglich der Kalziumkonzentrationen zwischen den beiden Zellpopulationen ist kurz nach Änderung des Membranpotentials und damit dem Beginn des Kalziumeinstroms am stärksten ausgeprägt. Um diesen Unterschied zu verdeutlichen wurden die Änderungen der Fura-2 Ratio Werte zwischen 200 - 500 s gemittelt und in Abb. 14 (C)) angegeben. Somit sind die Änderungen der Ratio-Werte von Jurkat T-Zellen mit Mitochondrien nah am Kalziumeinstrom mehr als doppelt so hoch wie in Zellen ohne Mitochondrien am Einstrombereich.

Um festzustellen, ob diese Unterschiede wirklich durch die mitochondriale Kalziumaufnahme verursacht wurden, blockierten wir die mitochondriale Kalziumaufnahme durch Inkubation der Jurkat T-Zellen mit 1  $\mu$ M CCCP. CCCP ist ein  $H^+$ -Ionophor und ein Entkoppler der oxidativen Phosphorylierung. Durch diese Eigenschaften bricht der elektrochemische Gradient in Mitochondrien für Protonen zusammen und die mitochondriale Kalziumaufnahme wird verhindert (Peng *et al.*, 1998).

In Abb. 14 (D) sind die gemittelten Fura-2 Ratio Werte der beiden T-Zell Populationen nach CCCP Behandlung gezeigt. Nur zu Beginn des Kalziumeinstroms ist ein Unterschied zwischen den Zellpopulationen zu erkennen, wobei die Zellen ohne Mitochondrien am Patch höhere Kalziumkonzentrationen erreichen. Diese Unterschiede verschwinden nach ca. 110 s und die Kalziumkonzentrationen in den beiden Zellpopulationen gleichen sich im weiteren Verlauf der Experimente an. Die mittleren Änderungen der Fura-2 Ratio Werte zwischen 200 - 500 s zeigen fast keine Unterschiede zwischen den beiden Zellpopulationen (Abb. 14 (E)).



**Abb. 13: Lokale Kalzium-Applikation mit Hilfe der cell-attached Patch Technik:** (A) Fura-2 Ratio Werte einer Jurkat T-Zelle bei verschiedenen Membranpotentialen (+ 150 mV und - 100 mV), nach Zugabe von 1  $\mu$ M Thapsigargin (TG). Der Kalziueinstrom kann durch Änderungen des Membranpotentials mit Hilfe der cell-attached Patch Technik gesteuert werden. Rechts ist ein Modell des experimentellen Aufbaus gezeigt. Kalzium kann nur durch die Patch-Pipette (gefüllt mit 1 mM  $\text{CaCl}_2$ -Lösung) in die Zelle eindringen, da als externe Lösung eine 0 mM  $\text{CaCl}_2$ -Lösung verwendet wird. (B) Schema des experimentellen Aufbaus. (C) Kalzium Gradient in einer Jurkat T-Zelle nach Stimulation mit TG und Änderung des Membranpotentials von + 150 mV auf - 100 mV. Das Bild bei 470 nm zeigt die mitochondriale Lokalisation in der Zelle. Die Ausbreitung des Kalziums erfolgt vom cell-attached Patch aus (siehe IR Bild). (D) Abfallen der zytosolischen Kalziumkonzentrationen der Jurkat T-Zelle aus (A) nach Stimulation mit TG und Änderung des Membranpotentials von - 100 mV auf + 150 mV. Das Bild bei 470 nm zeigt die mitochondriale Lokalisation in der Zelle.

Somit wurde eindeutig gezeigt, dass die mitochondriale Kalziumaufnahme und Anordnung von Mitochondrien in T-Zellen die intrazellulären Kalziumsignale beeinflussen können. Dabei erreichen T-Zellen mit Mitochondrien nah am Bereich des Kalziumeinstroms höhere intrazelluläre Kalziumkonzentrationen als Zellen ohne Mitochondrien in diesem Bereich.

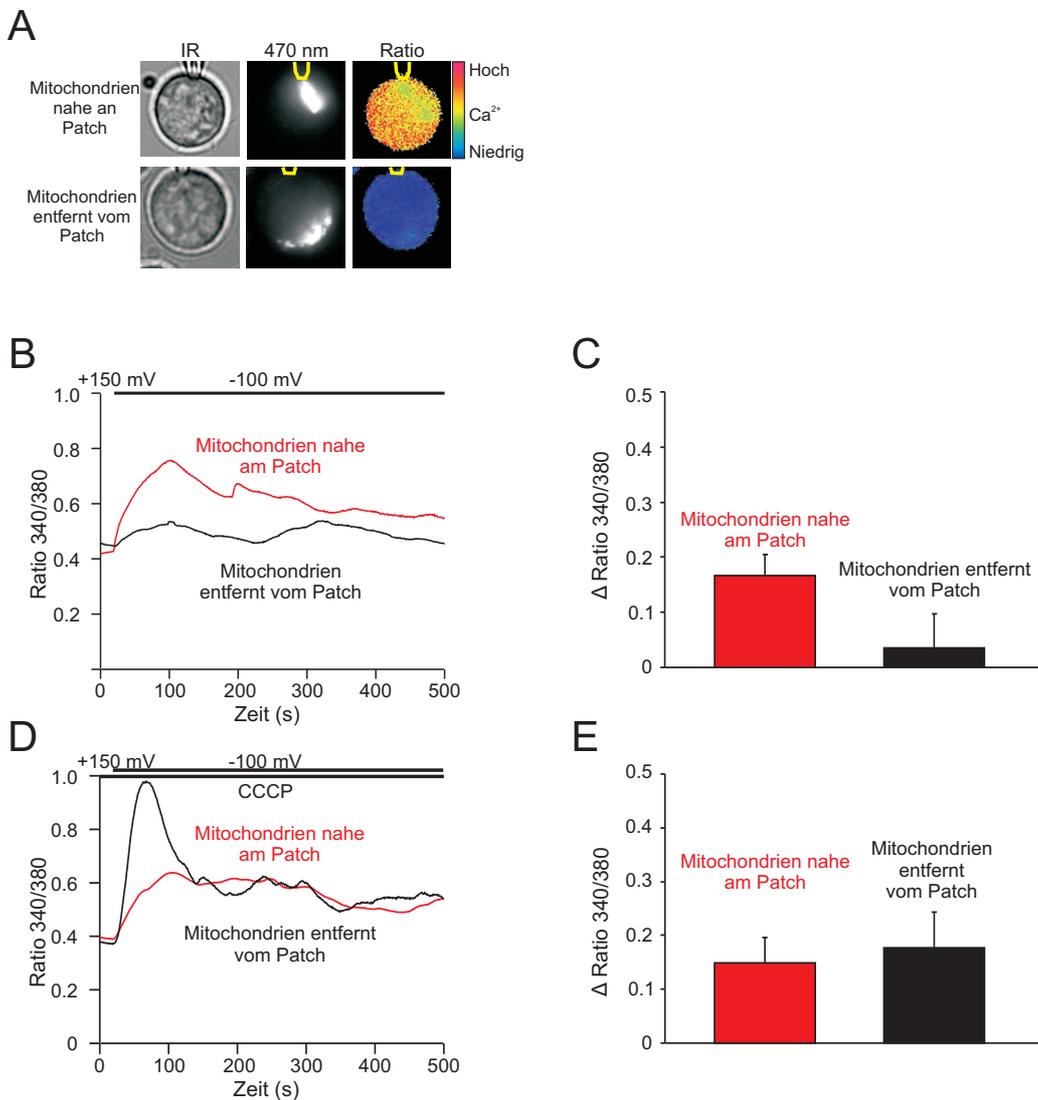
### 6.3.3 Einfluss der Mitochondrien-Lokalisation auf Kalziumsignale in CD4<sup>+</sup> T-Zellen

Da es sich bei Jurkat T-Zellen um eine immortalisierte Zelllinie handelt und diese sich von naïven humanen CD4<sup>+</sup> T-Zellen in vielerlei Hinsicht unterscheiden (z. B. Größe, Chromosomenzahl) (Gillis und Watson, 1980), wurden die Experimente, die in Abschnitt 6.3.2 beschrieben wurden, auch in humanen CD4<sup>+</sup> T-Zellen durchgeführt. Dadurch sollte geklärt werden, ob die Beeinflussung der Kalziumsignale durch die Lokalisation von Mitochondrien auch in T-Zellen zu finden ist, die direkt aus Spendern isoliert wurden (siehe Abschnitt 5.2.2).

Abb. 15 (A) zeigt Beispiele von zwei CD4<sup>+</sup> T-Zellen, deren Mitochondrien auch mit MitoTracker Green FM gefärbt und Kalzium durch den Indikator Fura-2/AM visualisiert wurden. Im Vergleich zu Jurkat T-Zellen waren die naïven CD4<sup>+</sup> T-Zellen nur etwa halb so groß (Durchmesser ca. 6  $\mu\text{m}$ ), wodurch die technische Ausführung der Experimente wesentlich anspruchsvoller wurde (siehe Abschnitt 5.4.1). Diese Zellen tolerierten auch den großen Membranpotentialwechsel von + 150 mV auf - 100 mV nicht, da bei diesen großen Potentialänderungen die Verbindungen zwischen Pipette und Zelle zerstört wurden. Daher wurde in dieser Experimentreihe das Membranpotential nur von + 60 mV auf - 60 mV geändert.

So konnten wir in CD4<sup>+</sup> T-Zellen einen größeren Unterschied der intrazellulären Kalziumkonzentrationen zwischen Zellen mit und ohne mitochondrialer Lokalisation in der Nähe des Kalziumeinstroms zeigen. Abb. 15 (B) zeigt die gemittelten Fura-2 Ratio Werte von CD4<sup>+</sup> T-Zellen mit Mitochondrien nahe und entfernt vom Kalziumeinstrom. Diese Zellen erreichen auch wesentlich höhere intrazelluläre Kalziumkonzentrationen als Jurkat T-Zellen, wenn Kalzium durch den cell-attached Patch zugegeben wurde. Zudem sind auch die mittleren Kalziumkonzentrationsänderungen im Verhältnis zur Ruhekonzentration höher als in Jurkat T-Zellen, wie Abb. 15 (C) verdeutlicht. Dabei sind die mittleren Konzentrationsänderungen in Zellen mit Mitochondrien am Patch nahezu dreimal so hoch wie in Zellen ohne Mitochondrien am Patch.

In menschlichen CD4<sup>+</sup> T-Zellen hat die mitochondriale Lokalisation bezüglich des Kalziumeinstroms noch größeren Einfluss auf die intrazellulären Kal-



**Abb. 14: Intrazelluläre Kalziumsignale werden durch die Lokalisation der Mitochondrien in Bezug zu den Kalziumkanälen in der Plasmamembran beeinflusst:** (A) Beispiele von zwei Jurkat T-Zellen beladen mit Fura-2/AM und MitoTracker Green FM bei verschiedenen Membranpotentialen (+ 150 mV und - 100 mV; nach 20 s gewechselt) nach Zugabe von 1  $\mu$ M TG in 0 mM CaCl<sub>2</sub>-Lösung. Kalzium wurde durch die Patch-Pipette appliziert (1 mM CaCl<sub>2</sub>-Lösung). Die obere Reihe zeigt eine Zelle, deren Mitochondrien nah am Patch lokalisiert sind (470 nm Bild). Die untere Reihe zeigt eine Zelle, deren Mitochondrien entfernt vom Patch liegen. (B) Gemittelte Fura-2 Ratio Werte von Jurkat T-Zellen unter den gleichen Bedingungen wie in (A). Die rote Linie zeigt die Ratio-Werte von Zellen mit Mitochondrien nah am Patch (n = 19) und die schwarze Linie Zellen mit Mitochondrien entfernt vom Patch (n = 12). (C) Durchschnitt der Fura-2 Ratio Wertänderungen zwischen 200 - 500 s derselben Zellen wie in (B) ( $\pm$  SEM; p = 0,31 (T-Test)). (D) Gleiche Bedingungen wie in (A) nach Inkubation der Jurkat T-Zellen mit 1  $\mu$ M CCCP. Die rote Linie zeigt Fura-2 Ratios von T-Zellen mit Mitochondrien nah am Patch (n = 15) und die schwarze Linie Zellen mit Mitochondrien entfernt von der Patch-Pipette (n = 3). (E) Durchschnittliche Fura-2 Ratio Werteänderungen zwischen 200 - 500 s derselben Zellen wie in (D) ( $\pm$  SEM; p = 0,91 (T-Test)).

ziumsignale als in T-Zelllinien.

### 6.3.4 Analyse intramitochondrialer Kalziumsignale nach lokaler Kalzium-Applikation

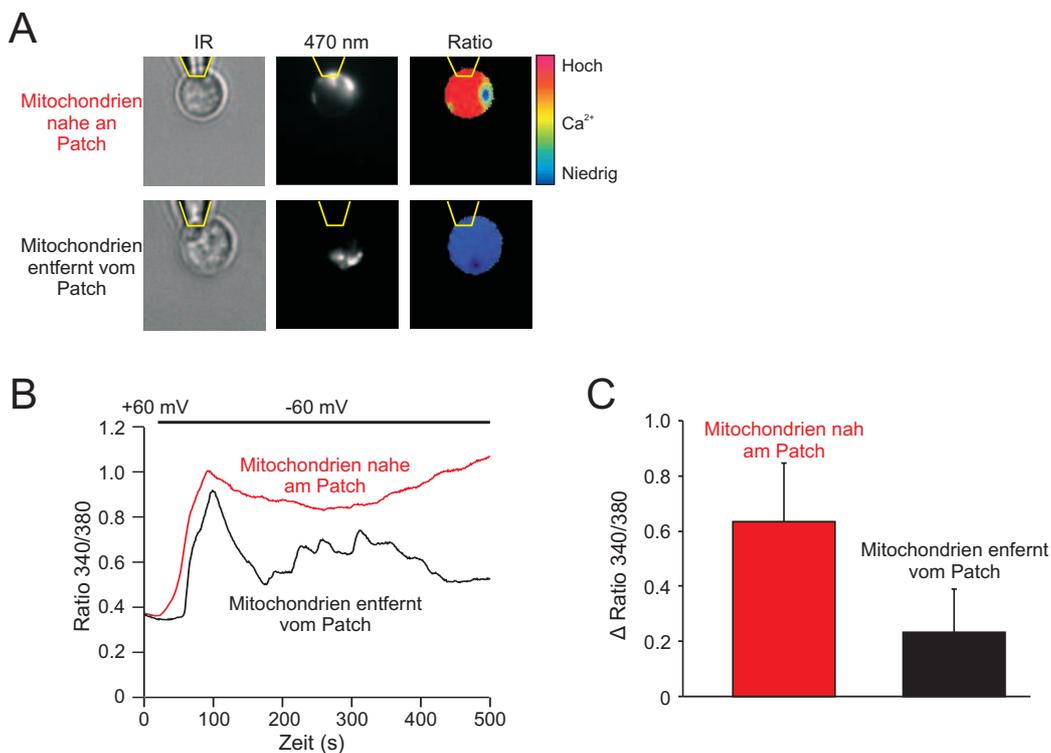
Um intramitochondriale Kalziumkonzentrationen in T-Zellen nach lokaler Kalziumapplikation zu messen, bedienten wir uns des Kalziumindikators Rhod-2 (siehe Abschnitt 5.3.4). Abb. 16 (A) zeigt eine Jurkat T-Zelle, die mit Rhod-2 beladen und danach in der cell-attached Konfiguration gepatcht wurde. Die Zelle wurde mit TG stimuliert und der Kalziumeinstrom durch Änderung des Membranpotentials von + 150 mV auf - 100 mV gestartet. Zu Beginn des Experiments zeigt sich nur eine geringe Rhod-2 Fluoreszenz. Mit Beginn des Kalziumeinstroms steigt die Fluoreszenzintensität aber rasch an und fällt nach ca. 130 s ab. Nur die linken Bereiche in der Zelle zeigen die Fluoreszenz von intramitochondrialem Rhod-2. Die großen Bereiche in der Mitte der Zelle, die erst nach dem Kalziumeinstrom erscheinen, stellen Rhod-2 Fluoreszenz im Zytosol dar und wurden für die Analyse nicht berücksichtigt. Auffällig ist, dass die Rhod-2 Fluoreszenz von Mitochondrien nahe am Patch eine höhere Intensität zeigen, als entfernt vom Patch.

Die Ergebnisse der Analyse von Kalziumsignalen in Mitochondrienclustern in Jurkat T-Zellen nah und entfernt vom Kalziumeinstrom sind in Abb. 16 (B) aufgezeigt. Nach dem Wechsel des Membranpotentials fiel die Rhod-2 Fluoreszenz Intensitäten zunächst noch ab. Nach kurzer Zeit stiegen die Fluoreszenzintensitäten jedoch an, wobei dieser Anstieg in Mitochondrien nah am Patch wesentlich schneller und höher vonstatten ging als in Mitochondrien entfernt vom Kalziumeinstrom.

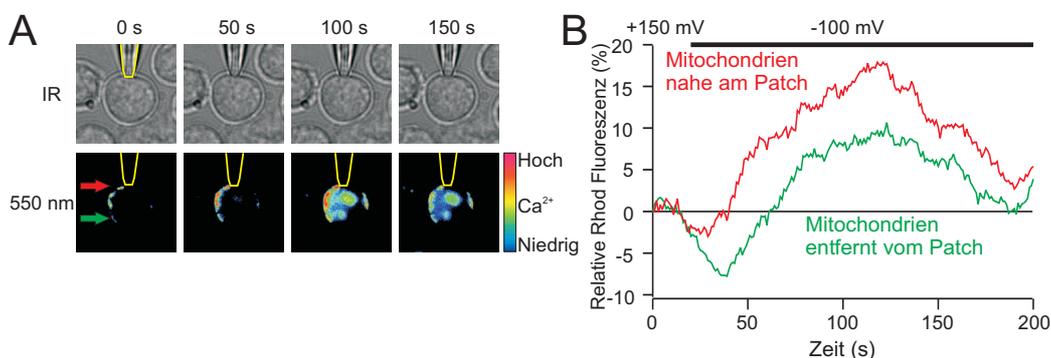
Zusammenfassend lässt sich also sagen, dass Mitochondrien in Jurkat T-Zellen, die nahe am Kalziumeinstrom lokalisiert sind, wesentlich schneller und mehr Kalzium durch ihren Uniporter aufnehmen, als Mitochondrien, die sich entfernt vom Kalziumeinstrom befinden.

### 6.3.5 Effekte von 2-APB und BTP-2 auf Kalziumsignale nach cell-attached Patch Applikation

Um zu klären, ob es sich bei den im Abschnitt 6.3.2 beschriebenen Kalziumsignalen wirklich um Einstrom über den CRAC-Kanal handelt, wurde die Wirkung von CRAC-Kanal Inhibitoren auf diesen lokalen Kalziumeinstrom hin untersucht. Der experimentelle Aufbau und Ablauf war der gleiche wie in Abschnitt 5.4.1 beschrieben wurde. Zusätzlich wurde zu allen verwendeten Lösungen 100  $\mu$ M 2-APB oder 1  $\mu$ M BTP-2 (24 h Vorinkubation) zugegeben. Beide Substanzen sind bekannte Inhibitoren des IP<sub>3</sub>-induzierten Kalzi-



**Abb. 15: Einfluss der mitochondrialen Lokalisation auf intrazelluläre Kalziumsignale in CD4<sup>+</sup> T-Zellen:** (A) Beispiele von zwei humanen CD4<sup>+</sup> T-Zellen beladen mit Fura-2/AM und MitoTracker Green FM bei verschiedenen Membranpotentialen (+ 60 mV und - 60 mV; nach 20 s gewechselt) nach Zugabe von 1  $\mu$ M TG in 0 mM CaCl<sub>2</sub>-Lösung. Kalzium wurde durch die Patch-Pipette appliziert (1 mM CaCl<sub>2</sub>-Lösung). Die obere Reihe zeigt eine Zelle, deren Mitochondrien nah am Patch lokalisiert sind (470 nm Bild). Die untere Reihe zeigt eine Zelle, deren Mitochondrien entfernt vom Patch liegen. (B) Durchschnittliche Fura-2 Ratio Werte von CD4<sup>+</sup> T-Zellen (gleiche Bedingungen wie in (A)). Das Membranpotential wurde nach 20 s von + 60 mV auf - 60 mV geändert. Die rote Linie entspricht den Zellen mit Mitochondrien nah am Patch (n = 10) und die schwarze Linie den Zellen mit Mitochondrien entfernt vom Patch (n = 3). (C) Durchschnittliche Fura-2 Ratio Wertänderungen zwischen 200 - 500 s derselben Zellen wie in (B) ( $\pm$  SEM; p = 0,1 (T-Test)).



**Abb. 16: Die mitochondriale Kalziumaufnahme ist abhängig von der Lokalisation der Mitochondrien in Bezug zur Kalziumeinstromquelle:** (A) Infrarot- und Rhod-2 Fluoreszenzbilder einer Jurkat T-Zelle, die mit  $1 \mu\text{M}$  Thapsigargin stimuliert wurde. Die Zelle wurde in der cell-attached Patch Konfiguration gepatcht und das Membranpotential nach 20 s von  $+150 \text{ mV}$  auf  $-100 \text{ mV}$  geändert. Der rote Pfeil weist auf die Position eines Mitochondrienclusters nah an der Patch-Pipette hin; der grüne Pfeil deutet auf Mitochondrien entfernt von der Kalziumeinstromquelle. (B) Zeitlicher Verlauf der normalisierten Rhod-2 Fluoreszenzen von Mitochondrien, die sich entweder nah (rote Linie;  $n = 9$ ) oder weiter entfernt von der Kalziumquelle (grüne Linie;  $n = 7$ ) befanden unter den gleichen experimentellen Bedingungen wie in (A).

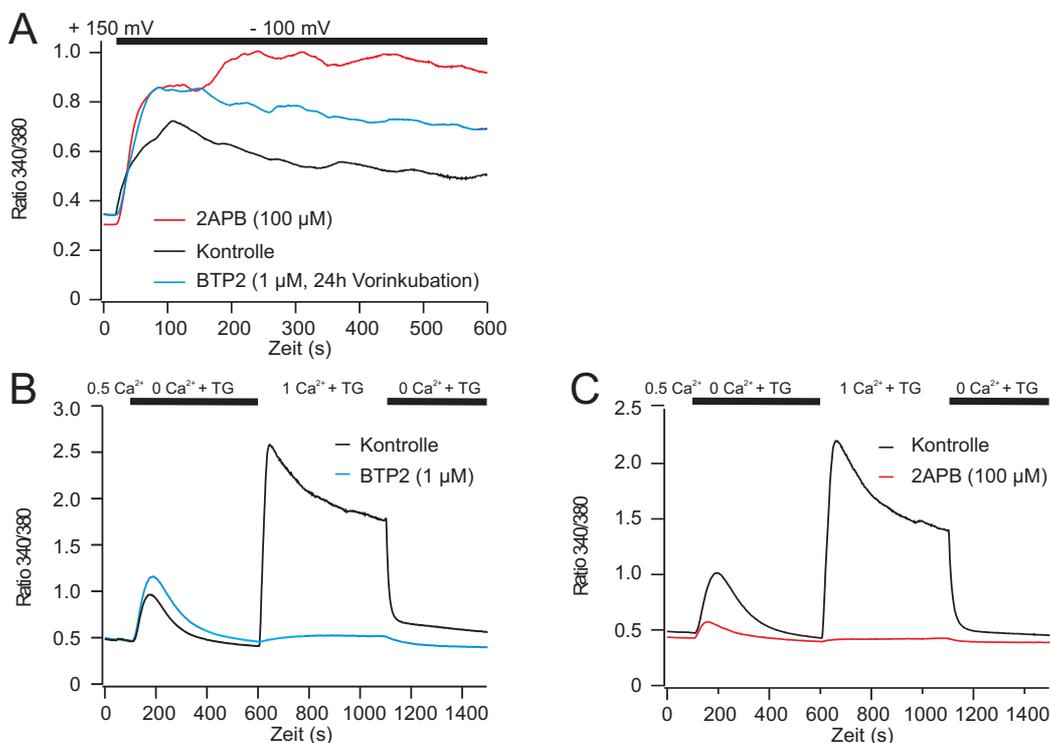
umeinstroms über CRAC-Kanäle in der Plasmamembran (Zitt *et al.*, 2004; Maruyama *et al.*, 1997).

In Abb. 17 (A) ist die Wirkung dieser Substanzen auf Jurkat T-Zellen nach TG Stimulation und Kalzium-Applikation über den cell-attached Patch abgebildet. Die beiden Substanzen inhibieren den Kalziumeinstrom nach dem Wechsel des Membranpotentials nicht. Im Gegenteil beide Substanzen verstärken sogar den Einstrom, wobei dieser Effekt mit 2-APB stärker ausgeprägt ist, als bei BTP-2. Nach 2-APB Behandlung zeigen die Zellen doppelt so hohe intrazelluläre Kalziumkonzentrationen als unter Kontrollbedingungen (2-APB freie Bedingungen). Der Kalziumeinstrom zeigt auch nach 2-APB Behandlung einen biphasischen Verlauf, wobei der zweite Kalziumanstieg nach 100 s verzögert eintritt. Mit BTP-2 kommt es ebenfalls zu einer Verstärkung des Kalziumeinstroms, der jedoch nicht so stark ausgeprägt ist, wie bei 2-APB und auch keinen biphasischen Verlauf zeigt.

Um zu testen, wie die beiden Substanzen unter Bedingungen ohne cell-attached Patch Technik wirken, wurden Kalzium-Imaging Experimente durchgeführt und die T-Zellen mit den gleichen Substanzkonzentrationen umspült. Abb. 17 (B) zeigt die Wirkung von  $1 \mu\text{M}$  BTP-2 auf den Kalziumeinstrom in Jurkat T-Zellen (Versuchsdurchführung siehe auch Abschnitt 5.3.3). Nach

dem ersten Lösungswechsel von 0,5 mM  $\text{CaCl}_2$ -Lösung auf 0 mM  $\text{CaCl}_2$ -Lösung mit 1  $\mu\text{M}$  TG (+ 1  $\mu\text{M}$  BTP-2) ist kein Effekt von BTP-2 auf die Kalziumfreisetzung aus dem ER erkennbar. Im Gegenteil diese Speicherentleerung wurde durch BTP-2 sogar noch etwas verstärkt. Um nun den Kalziumeinstrom über die CRAC-Kanäle zu untersuchen, wurde 1 mM  $\text{CaCl}_2$ -Lösung mit 1  $\mu\text{M}$  TG (+ 1  $\mu\text{M}$  BTP-2) appliziert. Hier zeigen Messungen mit BTP-2 den inhibitorischen Effekt. Der Kalziumeinstrom über die CRAC-Kanäle wird fast komplett unterdrückt. Beim erneuten Wechsel auf 0 mM  $\text{CaCl}_2$ -Lösung mit 1  $\mu\text{M}$  TG (+ 1  $\mu\text{M}$  BTP-2) weisen die intrazellulären Kalziumkonzentrationen bei BTP-2 behandelten Zellen höhere Werte auf als bei Kontrollzellen. Dies kommt durch die stärkere Entleerung der Kalziumspeicher und das nachfolgende Fehlen des Kaliumeinstroms zum Wiederauffüllen der Speicher zu Stande.

Die Wirkungen von 2-APB (100  $\mu\text{M}$ ) wurden analog zu den BTP-2 Imaging Experimenten untersucht (Abb. 17 (C)). Unter diesen Bedingungen zeigte sich bereits ein Effekt auf die Speicherentleerung, die bei 2-APB Behandlung nicht so effizient war wie unter Kontrollbedingungen. Der nachfolgende Kalziumeinstrom war ebenfalls bei 2-APB fast vollständig blockiert. Nach dem letzten Lösungswechsel sind die Kalziumkonzentrationen zwischen 2-APB und unbehandelten Zellen gleich.



**Abb. 17: 2-APB und BTP-2 verstärken den Kalziumeinstrom in T-Zellen über den cell-attached Patch, unterdrücken diesen Kalziumeinstrom aber in der Ganzzell-Applikation:** (A) Durchschnittliche Fura-2 Ratio Werte von Jurkat T-Zellen ( $n = 27$ ) mit Mitochondrien nah am Kalziumeinstrom nach Zugabe von 1  $\mu$ M Thapsigargin (TG). Extern wurde 0 mM CaCl<sub>2</sub>-Lösung verwendet, in die entweder 2-APB (100  $\mu$ M;  $n = 8$ ) oder BTP-2 (1  $\mu$ M; 24 h Vorinkubation;  $n = 14$ ) gegeben wurde. Nach 20 s wurde das Membranpotential von + 150 mV auf - 100 mV eingestellt. Kalzium wurde durch den cell-attached Patch appliziert. (B) Gemittelte Fura-2 Ratio Werte von Jurkat T-Zellen ( $n = 89$ ; Kontrolle:  $n = 154$ ), die mit folgenden Lösungen komplett umspült wurden: 0,5 mM CaCl<sub>2</sub>-Lösung (0 - 100 s), 0 mM CaCl<sub>2</sub>-Lösung + 1  $\mu$ M TG (+ 1  $\mu$ M BTP-2, 24 h Vorinkubation; 100 - 600 s; 1100 - 1500 s) und 1 mM CaCl<sub>2</sub>-Lösung + 1  $\mu$ M TG (+ 1  $\mu$ M BTP-2; 600 - 1100 s). (C) Gemittelte Fura-2 Ratio Werte von Jurkat T-Zellen ( $n = 186$ ; Kontrolle:  $n = 63$ ) unter den gleichen Versuchsbedingungen wie in (B), jedoch anstelle von BTP-2 wurden 100  $\mu$ M 2-APB zu den Lösungen beigefügt.

## 6.4 Mitochondrien wandern zur Immunologischen Synapse und nicht zum Bereich des Kalziumeinstroms

Wir haben in den vorangegangenen Studien festgestellt, dass die Mitochondrien in T-Zellen nach Bildung der IS in diesen IS-Bereich translozieren. Desweiteren haben wir herausgefunden, dass diese mitochondrialen Bewegungen kalziumabhängig sind. Unbekannt ist allerdings, was die Mitochondrien veranlasst in diesen Bereich einzuwandern. Mit den folgenden Untersuchungen sollte analysiert werden, ob sich die Mitochondrien zu einem verstärkten Kalziumeinstrom im Bereich der IS bewegen oder ob das Ziel dieser Bewegungen die Bildung der IS selbst mit der einhergehenden Umorientierung des Zytoskeletts ist. Aus diesem Grund entwickelten wir verschiedene experimentelle Bedingungen, in denen wir die IS-Bildung und den Kalziumeinstrom in den T-Zellen an der gleichen Stelle der Plasmamembran oder räumlich getrennt voneinander auslösen konnten. Um einen lokalen Kalziumeinstrom zu erreichen, verwendeten wir die Technik des cell-attached Patch, die in Abschnitt 5.4 erläutert wurde. Die Bildung der IS induzierten wir mit verschiedenen Methoden an der gegenüberliegenden Seite der Zellen (siehe Abschnitt 5.4.2).

### 6.4.1 Lokale Kalzium-Applikation und fokale Stimulation durch antikörperbeladene Pipette

In dieser Experimentreihe wurden die Jurkat T-Zellen durch eine Mikropipette stimuliert, die mit aCD3-Antikörpern befüllt war und gleichzeitig als Kalziumquelle diente (siehe Abschnitt 5.4.2 und Abb. 18 (D)). Dadurch sollte untersucht werden, wie die Lokalisation von Mitochondrien die intrazellulären Kalziumsignale beeinflusst, wenn der Kalziumeinstrom direkt an der IS stattfindet.

Die Auswertung der Fura-2 Ratio Werte erfolgte analog zu den Auswertung in Abschnitt 6.3.2. Abb. 18 (A) zeigt die gemittelten Fura-2 Ratio Werte der beiden Zellpopulationen, die sich durch ihre mitochondrialen Lokalisationen in Bezug zum Patch unterscheiden. Auch unter diesen experimentellen Bedingungen zeigen die Zellen, deren Mitochondrien nah am gepatchten Bereich liegen nach dem Wechsel des Membranpotentials im Mittel die höheren Kalziumkonzentrationen. Die Kalziumkonzentrationen von Zellen mit Mitochondrien entfernt vom Patch sind im Durchschnitt geringer, jedoch zeigen sich zwei Ratio-Peaks kurz nach Membranpotentialwechsel und nach ca. 400 s. Diese beiden Peaks sind allerdings nur von kurzer Dauer. Mittelt man die Fura-2 Ratio Änderungen der beiden Zellpopulationen zwischen 500 und 1800 s, so zeigt sich der Unterschied in den Kalziumkonzentrationen deutli-

cher (Abb. 18 (B)). Die durchschnittlichen Ratio-Wertänderungen von Zellen mit Mitochondrien nah am Patch sind fast doppelt so groß wie in der anderen Zellgruppe.

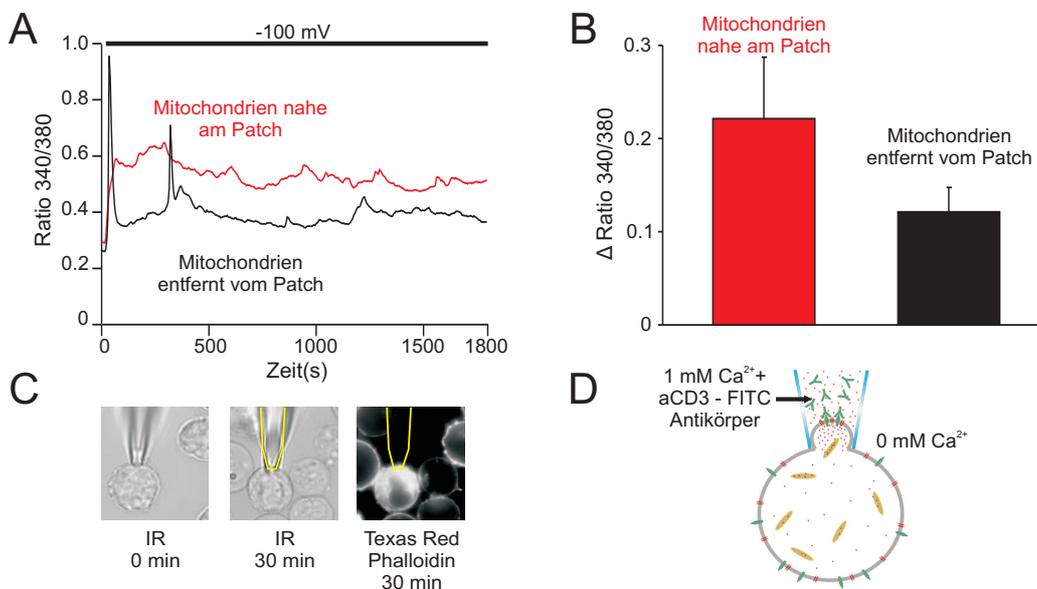
Abschließend wurde noch getestet, ob sich unter diesen Versuchsbedingungen eine IS ausbildet, indem wiederum das Aktin-Zytoskelett nach Fixierung der T-Zellen fluoreszenzmarkiert wurde (siehe auch Abschnitt 5.3.2). So konnten wir ebenfalls in mehreren unabhängigen Experimenten eine Akkumulation des Aktin-Zytoskeletts im Bereich des Patches detektieren (siehe Abb. 18 (C)). Somit bildet sich auch eine IS aus, wenn aCD3-Antikörper nur an einer kleinen Stelle auf der T-Zell-Oberfläche binden, ohne dass diese Antikörper ihrerseits vorher an eine feste Oberfläche gebunden sind.

#### **6.4.2 Lokale Kalzium-Applikation und fokale Stimulation von T-Zellen durch antikörperbeschichtete Pipetten**

Bei diesen Experimenten wurde eine aCD3/aCD28-beschichtete Pipette benutzt (siehe Abb. 19 (E)), um damit eine IS an einer Seite der T-Zelle zu induzieren (siehe Abschnitt 5.4.2). Gleichzeitig wurde Kalzium durch die cell-attached Patch Technik lokal an einem kleinen Bereich der gegenüberliegenden T-Zell-Oberfläche appliziert, um damit eine räumliche Trennung zwischen IS und Kalziumeinstrom sicherzustellen (Schema siehe Abb. 19 (D)). Abb. 19 (A) zeigt eine Jurkat T-Zelle, die mit einer antikörperbeschichteten Pipette stimuliert und Kalzium durch den cell-attached Patch an der anderen Zellseite lokal appliziert wurde. Die Zelle wurde vorher simultan mit Fura-2 und MitoTracker Green FM beladen (siehe Abschnitt 5.4.2). Die Kalziumkonzentration ist nach 60 min angestiegen, die Lokalisation der Mitochondrien aber nahezu unverändert geblieben.

Abb. 19 (B) zeigt die gemittelten Fura-2 Ratio Werte von Jurkat T-Zellen, die mit dieser Methode gemessen wurden. Kurz nach dem Wechsel des Membranpotentials kommt es zu einem starken Anstieg der Ratio-Werte und im weiteren Verlauf der Experimente zu Oszillationen der intrazellulären Kalziumkonzentrationen, d.h. dass man mit dieser Methode einen Kalziumeinstrom über die Plasmamembran erreichen kann.

In Abb. 19 (C) wurden die mitochondrialen Fluoreszenzintensitäten im Bereich der IS (roter Bereich in Abb. 19 (A)) und Bereich des Kalziumeinstroms (grüner Bereich in Abb. 19 (A)) analysiert. Die Mitochondrienfluoreszenzen im Kalziumeinstrombereich blieben im zeitlichen Verlauf konstant. Im Bereich der IS konnte nach 60 min ein leichter Anstieg der mitochondrialen Fluoreszenzintensität detektiert werden. Diese mitochondrialen Bewegungen waren aber nicht so groß, wie in den Versuchen mit Bead-Stimulation von T-Zellen (vergleiche Abschnitt 6.2). Aus diesem Grund wurde nun anschließend



**Abb. 18:** Die Bildung einer IS mit Hilfe einer aCD3-antikörperbeladenen Pipette und gleichzeitiger Kalzium-Applikation durch die Pipette zeigt, wie wichtig die mitochondriale Lokalisation für die Beeinflussung intrazellulärer Kalzium-Signale ist: (A) Mittelwerte der Fura-2 Ratios von Jurkat T-Zellen, die mit einer Pipette gepatcht wurden, die aCD3-FITC Antikörper und eine 1 mM  $\text{CaCl}_2$ -Lösung enthielt (extern: 0 mM  $\text{CaCl}_2$ -Lösung). Das Membranpotential wurde nach 20 s von +150 mV auf -100 mV geändert. Die rote Linie korrespondiert mit den Zellen, deren Mitochondrien nah am Patch lokalisiert waren ( $n = 15$ ), die schwarze Linie zeigt die Zellen mit Mitochondrien entfernt vom Patch ( $n = 3$ ). (B) Statistische Analyse der Fura-2 Ratio Wert Änderungen zwischen 500 und 1800 s der Experimente aus (A) (+ SEM). Zellen, deren Mitochondrien näher am Patch liegen, zeigen höhere intrazelluläre Kalzium Signale. (C) Infrarot- und Fluoreszenzbilder einer einzelnen Jurkat T-Zelle, deren Aktin-Zytoskelett nach 30 min nach Stimulation mit der aCD3 antikörperbeladenen Patch-Pipette mit Phalloidin/Texas Red angefärbt wurde. Das Membranpotential wurde nach den ersten 20 s von +150 mV auf -100 mV gewechselt. (D) Schematischer Aufbau des Experiments.

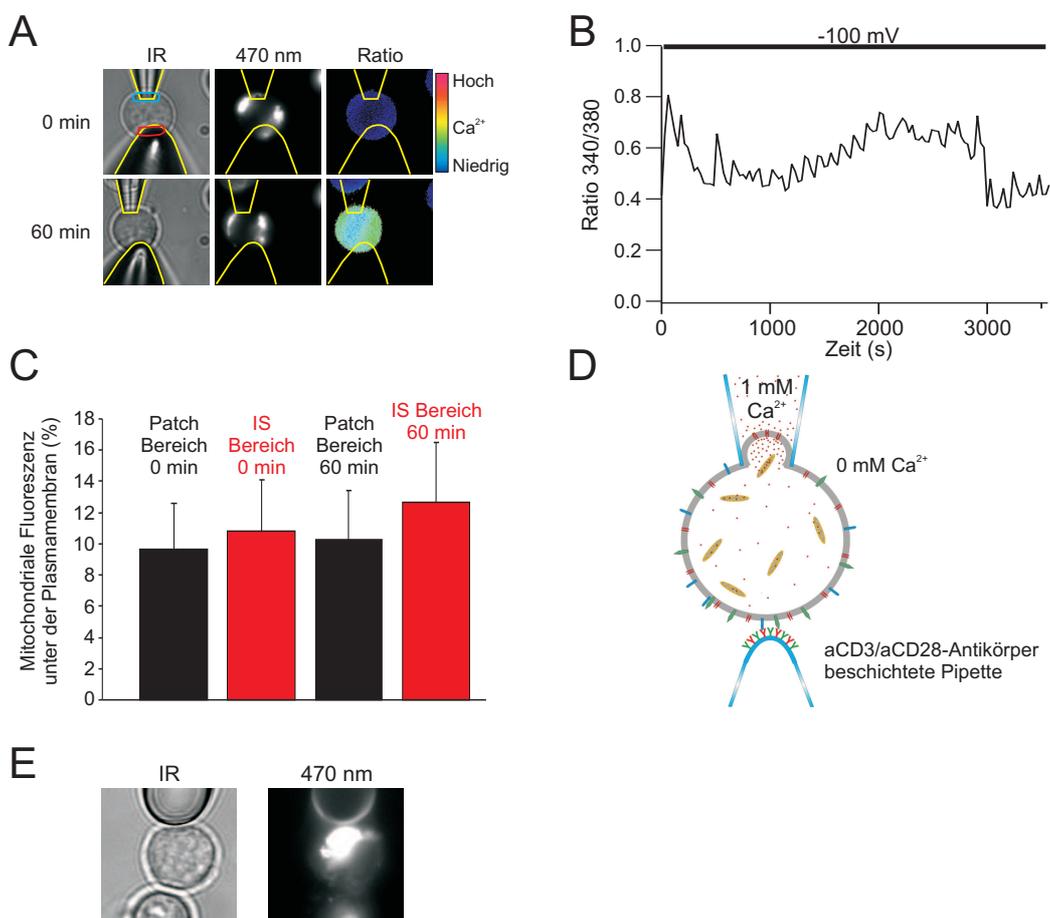
überprüft, ob sich bei Stimulation mit der antikörperbeschichteten Pipette eine IS in T-Zellen ausbildet.

Hierzu wurden Jurkat T-Zellen mit DNA transfiziert, die für YFP-gekoppeltes Aktin codiert, um die Reorganisation des Aktin-Zytoskeletts nach IS-Bildung zu beobachten. Abb. 20 (A) zeigt die Infrarot- und Fluoreszenzbilder einer Jurkat T-Zelle, deren Aktin fluoreszierte und die mit einer aCD3/aCD28-antikörperbeschichteten Pipette berührt wurde (Badlösung: 1 mM CaCl<sub>2</sub>-Lösung). Unter diesen Bedingungen zeigte sich nach 60 min keine auffällige Aktin-Reorganisation im Fluoreszenzbild. Die quantitative Analyse der Aktin-Fluoreszenz im Pipetten-Zell-Kontaktbereich (roter Bereich in Abb. 20 (A)) von verschiedenen Jurkat T-Zellen ist in Abb. 20 (B) dargestellt. In diesem Bereich ist über den Zeitraum von 60 min nur eine leichte Zunahme der Aktin-Fluoreszenz festzustellen. Die Bildung einer wirksamen IS mit dieser Methode ist also unwahrscheinlich.

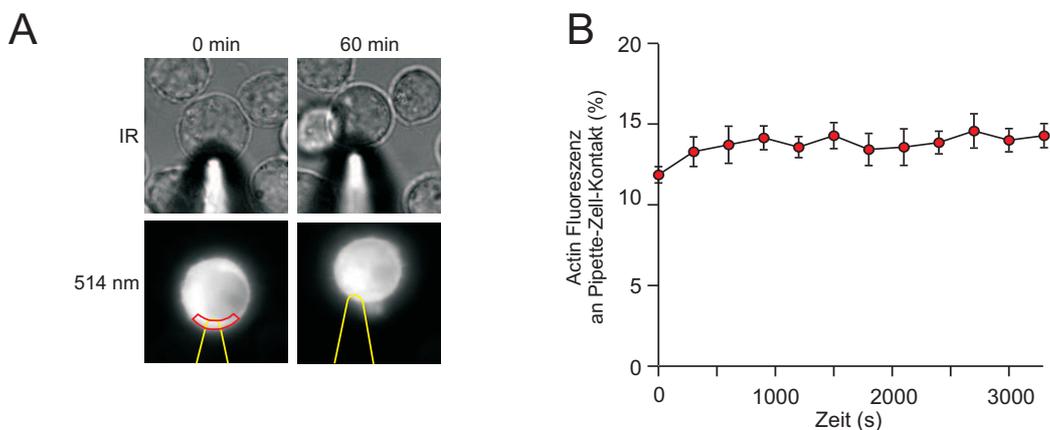
#### 6.4.3 Lokale Kalzium-Applikation und fokale Stimulation von T-Zellen durch antikörperbeschichtete Beads

In Abschnitt 6.2 wurde gezeigt, dass sich bei der Stimulation von T-Zellen mit antikörperbeschichteten Beads eine IS ausbildet, Kalzium einströmt und eine Translokation von Mitochondrien zur IS stattfindet. Das bedeutet, dass die fokale Stimulation mit den Beads sehr effizient ist und sich auch für die räumlich getrennte Untersuchung von IS-Bildung und Kalziumeinstrom eignet. Das Problem die Beads an einem genau definierten Bereich auf der T-Zell-Oberfläche zu präsentieren wurde durch die Verwendung eines zweiten Mikromanipulators gelöst, an dem eine Pipette ohne Befüllung befestigt war. Mit dieser Pipette wurde durch Kapillarwirkung ein Bead eingefangen und anschließend kontrolliert mit der T-Zelle in Kontakt gebracht (siehe Abschnitt 5.4.2). Gleichzeitig wurde an der gegenüberliegenden Seite der T-Zelle Kalzium mittels cell-attached Patch zugegeben. Durch diese Versuchsanordnung konnte die Bildung der IS und der Kalziumeinstrom räumlich getrennt werden und die Kalziumsignale und mitochondrialen Bewegungen unabhängig untersucht werden (Abb. 21 (B)).

Abb. 21 (A) zeigt Infrarot-, Fluoreszenz- und Fura-2 Ratio Bilder einer Jurkat T-Zelle im zeitlichen Verlauf, die mit dieser Methode gemessen wurde. Man erkennt in den Infrarotbildern die starke Formveränderung, die die T-Zelle nach Bead-Kontakt vollzogen hat. Dies ist ein klares Anzeichen für die Bildung einer IS, wie in früheren Studien gezeigt wurde (Quintana *et al.*, 2008). Die Fluoreszenzbilder zeigen die MitoTracker Green gefärbte Mitochondrien, die im Verlauf einer Stunde zielgerichtet zum Zell-Bead-Kontaktbereich und nicht zum Kalziumeinstrom wanderten. Die Fura-2 Ratio Werte zeigten



**Abb. 19: Stimulation von T-Zellen mit aCD3/aCD28-antikörperbeschichteten Pipetten und gleichzeitiger lokaler Kalzium-Applikation:** (A) Infrarot-, Fluoreszenz- und Fura-2 Ratio-Bilder einer einzelnen Jurkat T-Zelle, deren Mitochondrien mit MitoTracker Green/AM angefärbt wurden, zu Beginn der Experimente und nach 60 min. Die Zelle wurde in der cell-attached Patch Konfiguration gepatcht (Pipettenlösung: 1 mM CaCl<sub>2</sub>-Lösung; externe Lösung: 0 mM CaCl<sub>2</sub>-Lösung). Eine mit aCD3- und aCD28-Antikörpern beschichtete Pipette wird an der gegenüberliegenden Seite der Zelle platziert, um dort eine fokale Stimulation der T-Zelle zu erreichen. Das Membranpotential wurde nach 20 s von + 150 mV auf - 100 mV gewechselt. Es lässt sich keine signifikante Bewegung der Mitochondrien unter diesen Bedingungen feststellen. (B) Durchschnitt der Fura-2 Ratio Werte von Jurkat T-Zellen unter den Bedingungen wie in (A) beschrieben (n = 11). (C) Vergleich der prozentualen Anteile mitochondrialer Fluoreszenz an der Stelle der fokalen Stimulation (siehe (A), Bereich durch rote Linie umrandet; p = 0,11 (T-Test)) und an der Kalzium-Einstrom-Quelle (blauer Bereich in (A); p = 0,53 (T-Test)) in Jurkat T-Zellen (n = 11; + SEM). Die Zellen wurden mit aCD3/aCD28-antikörperbeschichteten Mikropipetten stimuliert und das Membranpotential nach 20 s von + 150 mV auf - 100 mV geändert. (D) Schematischer Aufbau des Experiments. (E) Infrarot- und Fluoreszenzbild einer Jurkat T-Zelle, die mit einer aCD3-FITC antikörperbeschichteten Pipette in Kontakt steht.



**Abb. 20: Keine IS-Bildung nach Stimulation mit aCD3/aCD28-antikörperbeschichteten Pipetten:** (A) Infrarot- und Fluoreszenzbilder einer einzelnen Jurkat T-Zelle, die mit TagYFP-bAktin transfiziert wurde und mit einer aCD3/aCD28-beschichteten Sodaglas-Pipette in Kontakt stand. Die Bilder wurden zu Beginn und nach 60 min aufgenommen. Als externe Lösung wurde eine 1 mM CaCl<sub>2</sub>-Lösung verwendet. (B) Analyse der Aktin-YFP Fluoreszenz (normalisiert auf Gesamtfluoreszenz) im Kontaktbereich zwischen Antikörper-beschichteter Pipette und T-Zelle (n = 7; roter Bereich in (A) gekennzeichnet;  $\pm$  SEM). Gleiche Bedingungen wie in (A).

einen schwachen Kalziumeinstrom, der nach 30 min sein Maximum erreicht hat. Am Ende des Experiments zeigte sich im Bereich der Mitochondrien eine höhere Kalziumkonzentration als im Rest der T-Zelle.

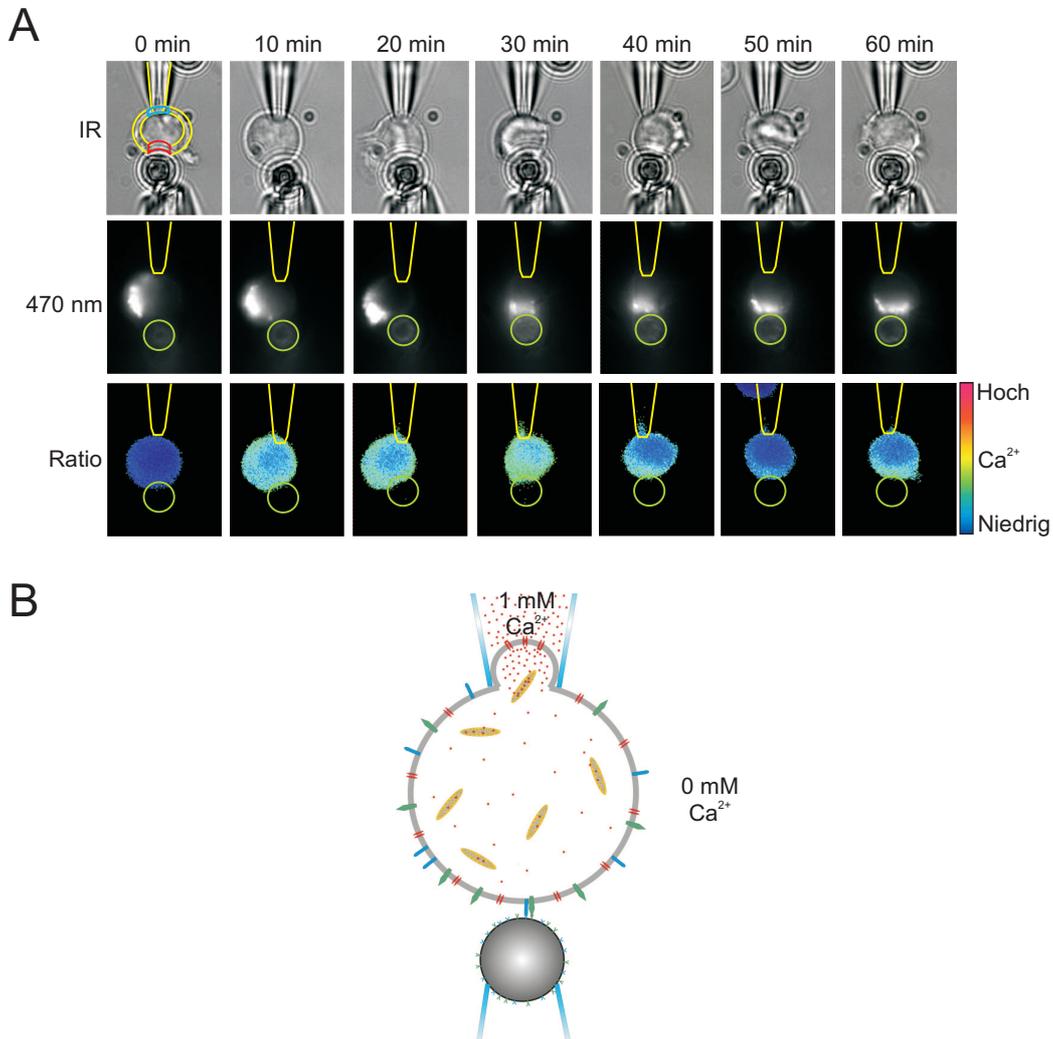
Die Fura-2 Ratio Werte von verschiedenen Experimenten wurden gemittelt und in Abb. 22 (A) aufgetragen. Nach Ausbildung des Zell-Bead-Kontakts und Änderung des Membranpotentials zeigte sich initial ein starker Anstieg der Fura-2 Ratio Werte, der aber nur 120 s anhielt. Danach fielen die Ratio-Werte ab und blieben stabil in einem Bereich unter 0,6.

Unter diesen experimentellen Bedingungen zeigte sich eine deutliche mitochondriale Translokation zur IS und nicht zur Quelle des Kalziumeinstroms (Abb. 22 (B)). Analysiert wurden die mitochondrialen Fluoreszenzintensitäten im Bereich der IS (roter Bereich in Abb. 21 (A)) und im Bereich des Kalziumeinstroms (grüner Bereich in Abb. 21 (A)) zu Beginn der Experimente und nach 60 min. Die Fluoreszenzintensitäten änderten sich im Bereich des Patches im Verlauf einer Stunde nicht. Im Bereich der IS erkennt man jedoch nach einer Stunde eine signifikante Zunahme der mitochondrialen Fluoreszenz. Das Ziel der Mitochondrienbewegungen war daher die IS und nicht die Quelle des Kalziumeinstroms.

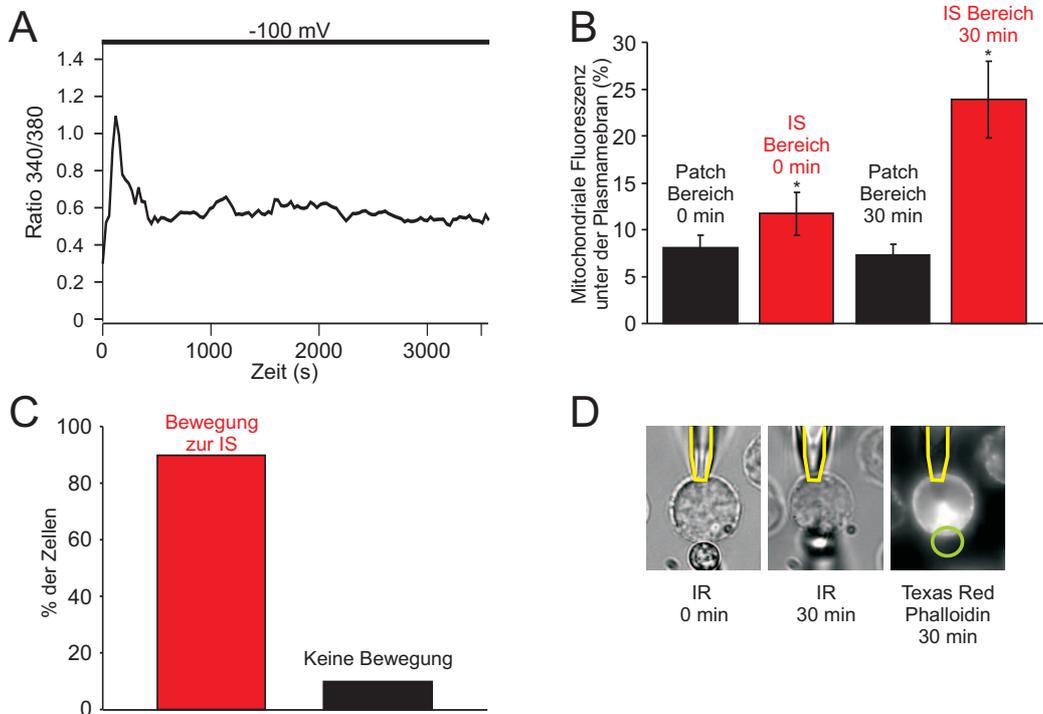
Im Anschluss wurde noch der Prozentsatz von Jurkat T-Zellen ermittelt,

welche diese Mitochondrienbewegung zur IS zeigen. In 90 % der Zellen wanderten die Mitochondrien zur IS, in den restlichen 10 % wurden überhaupt keine mitochondrialen Bewegungen detektiert (Abb. 22 (C)).

Abschließend wurde noch ermittelt, ob unter diesen Versuchsbedingungen eine Umorganisation des Aktin-Zytoskeletts und damit die Bildung einer funktionellen IS stattfindet. Die Zellen wurden hierfür gepatcht und mit Beads in Kontakt gebracht, fixiert und anschließend das Aktin-Zytoskelett angefärbt (siehe Abschnitt 5.3.2). Abb. 22 (D) zeigt exemplarisch eine Jurkat T-Zelle vor und nach Beginn der Experimente im Infrarotbild. Man erkennt oberhalb der Zelle die Pipette für die Kalziumapplikation und unterhalb den Bead zur Bildung der IS. Nach der Fixierung und Fluoreszenzmarkierung des Zytoskeletts sieht man eine deutliche Akkumulation von Aktin im Bereich des Zell-Bead-Konaktes. Diese Aktinakkumulation wurde in verschiedenen Experimenten beobachtet (Daten nicht gezeigt).



**Abb. 21: Beispiel für Kombination aus lokaler Kalzium-Applikation und fokaler Stimulation von T-Zellen:** (A) Infrarot-, Fluoreszenz- und Fura-2 Ratio-Bilder einer einzelnen Jurkat T-Zelle, die mit MitoTracker Green/FM und Fura-2/AM beladen wurden, im zeitlichen Verlauf. Die Zelle wurde in der cell-attached Patch Konfiguration gepatcht (Pipettenlösung: 1 mM CaCl<sub>2</sub>-Lösung; externe Lösung: 0 mM CaCl<sub>2</sub>-Lösung). Ein aCD3/aCD28 Antikörper beschichteter Bead wird an die Zelle gefahren, um an dieser Stelle die Bildung einer IS zu induzieren. Das Membranpotential wurde nach 20 s von + 150 mV auf - 100 mV gewechselt. Die Mitochondrien bewegen sich zur IS und nicht zum Kalziumeinstrom, der durch den cell-attached Patch vermittelt wird. (B) Schematischer Aufbau des Experiments.



**Abb. 22: Die Mitochondrien bewegen sich zur IS und nicht zur Kalziumeinstromquelle:** (A) Durchschnitt der Fura-2 Ratio Werte von Jurkat T-Zellen ( $n = 8$ ) bei lokaler Kalzium-Applikation über die Patch-Pipette und fokaler Stimulation über aCD3/aCD28-antikörperbeschichtete Beads. Das Membranpotential wurde nach 20 s von + 150 mV auf - 100 mV geändert. (B) Vergleich der prozentualen Anteile mitochondrialer Fluoreszenz an der IS (siehe Abb. 21 (A), Bereich durch rote Linie umrandet;  $p = 0,0096$  (T-Test)) und an der Kalziumeinstromquelle (blauer Bereich in Abb. 21 (A);  $p = 0,65$  (T-Test)) in Jurkat T-Zellen ( $n = 8$ ;  $\pm$  SEM). Gleiche Zellen wie in (A). (C) Prozentuale Anteile von Zellen, die eine Bewegung von Mitochondrien zur IS hin zeigen im Vergleich zu den Zellen, deren Mitochondrien sich nicht bewegen (gleiche Bedingungen wie in (B)). (D) Infrarot- und Fluoreszenzbilder einer einzelnen Jurkat T-Zelle, deren Aktin-Zytoskelett mit Phalloidin/Texas Red 30 min nach Stimulation mit aCD3/aCD28 antikörperbeschichteten Beads angefärbt wurde. Die Zelle wurde in der cell-attached Patch Konfiguration gepatcht (Pipettenlösung: 1 mM  $\text{CaCl}_2$ -Lösung; externe Lösung: 0 mM  $\text{CaCl}_2$ -Lösung) und das Membranpotential nach 20 s von + 150 mV auf - 100 mV geändert. Danach wurde die Zelle fixiert und angefärbt. Der grüne Kreis im Fluoreszenzbild deutet auf die Lage des Beads hin.

## 7 Diskussion

### 7.1 Mitochondriale Translokation zur IS

Die Aktivierung von T-Zellen ist ein komplexer Vorgang, der durch verschiedene Signalkaskaden und Interaktionen gekennzeichnet ist. Kalzium stellt in diesem Zusammenhang einen wichtigen Botenstoff dar, denn die Erhöhung der zytosolischen Kalziumkonzentration ist eine wichtige Voraussetzung für die erfolgreiche Aktivierung der T-Zellen (Crabtree and Clipstone, 1994). Wir haben in früheren Studien gezeigt, dass eine effiziente kalziumabhängige T-Zell Aktivierung und anschließende klonale Expansion der T-Zellen eine Interaktion zwischen Mitochondrien und IS benötigen (Quintana *et al.*, 2007). Die Bildung einer ausgereiften IS verursacht nicht nur eine anhaltende T-Zell Rezeptorstimulation durch die räumlich sehr begrenzte Lokalisation von T-Zell Rezeptoren und MHC-Antigen Komplexen an der IS (Qi *et al.*, 2001; Dustin und Cooper, 2000), sondern initiiert auch die Umverteilung von Mitochondrien zur IS (Quintana *et al.*, 2007). Beide Prozesse sind notwendig, um den Kalziumeinstrom über CRAC/Orai-Kanäle aufrecht zu erhalten, was wiederum zu einer effizienten Zytokinproduktion führt, die über Stunden andauert (Grakoui *et al.*, 1999; Lee *et al.*, 2003).

Im ersten Teil dieser Arbeit wurde die Kinetik der mitochondrialen Lokalisation zur IS hin untersucht und gleichzeitig überprüft, ob dieser Vorgang einen Kalziumeinstrom über die CRAC/Orai-Kanäle benötigt. Wir haben festgestellt, dass sich die Mitochondrien nach fokaler Stimulation durch aCD3/aCD28-Antikörper beschichtete Beads kontinuierlich über einen Zeitraum von mehr als einer Stunde zur IS bewegen. Für diese mitochondrialen Bewegungen war ein Kalziumeinstrom über die Plasmamembran notwendig, da in den Experimenten ohne Kalziumeinstrom keine signifikanten Bewegungen der Mitochondrien zur IS hin festzustellen waren.

Nach diesen Ergebnissen stellte sich die Frage, ob sich ohne Kalziumeinstrom über die Membran der T-Zellen überhaupt eine IS ausbildet. Um diese Frage zu beantworten, wurde die Aktin-Translokation nach IS-Bildung in Experimenten mit und ohne Kalziumeinstrom untersucht. In früheren Studien wurde gezeigt, dass nach IS-Bildung eine Umorganisation des Zytoskeletts auftritt, daher konnten wir diese Umorganisation als Beweis für die Bildung einer IS unter den gegebenen Bedingungen einsetzen (Dustin and Cooper, 2000; Qi *et al.*, 2001). Zusätzlich überprüften wir, ob nach der Bindung eines Beads an eine T-Zelle eine Entleerung der intrazellulären Kalziumspeicher auftrat, was für eine Aktivierung der T-Zell Rezeptoren und anschließende IP<sub>3</sub>-abhängige Signalkaskade sprechen würde. Unter diesen Bedingungen konnten wir eine Entleerung der intrazellulären Kalziumspeicher detektie-

ren und somit von einer IS-Bildung ausgehen. Damit wurde gezeigt, dass die IS-Bildung unabhängig vom Kalziumeinstrom über die T-Zellmembran stattfindet.

Quintana *et al.* (2007) haben herausgefunden, dass die mitochondrialen Translokationen zur IS durch das Aktin-Zytoskelett und nicht durch Mikrotubuli unterstützt werden. Die Behandlung von T-Zellen mit Nocodazol, einem Blocker der Mikrotubulisyntese, verhinderten weder die Bewegungen der Mitochondrien zur IS, noch die Akkumulation von Aktin an der IS. In einer früheren Studie (Quintana *et al.*, 2006) wurde jedoch gezeigt, dass sich die Mitochondrien in T-Zellen nach Thapsigargin Behandlung entlang der Mikrotubuli zur Plasmamembran bewegen, um dort die Inaktivierung der CRAC/Orai-Kanäle durch ihre Kalziumpufferfunktion zu verhindern (Glitsch *et al.*, 2002; Hoth *et al.*, 2000; Lewis, 2001; Parekh and Putney, 2005). Diese offensichtliche Diskrepanz bezüglich der unterschiedlichen Zytoskelettkomponenten, an denen sich die Mitochondrien entlang bewegen, begründeten Quintana *et al.* damit, dass sich die Mitochondrien so lange mit Hilfe von Kinesin- und Dynein-Motorproteinen an den Mikrotubuli entlang bewegen, bis sie die Plasmamembran und das kortikale Aktin-Netzwerk erreicht haben. Dort angekommen binden sie an das Aktin-Netzwerk und werden durch Dynactin-Motorproteine zur IS weiter transportiert.

Dass die mitochondrialen Bewegungen von Mikrotubuli und Mikrofilamenten abhängig sind, wurde schon in vielen verschiedenen Zelltypen gezeigt (Ball and Singer, 1982; Knowles *et al.*, 2002; Morris and Hollenbeck, 1995; Varadi *et al.*, 2004; Yi *et al.*, 2004). Es wurde eine ganze Reihe von Proteinen entdeckt, die an der Fission, Fusion und Translokation von Mitochondrien beteiligt sind (Yoon, 2005; Yaffe, 2003; Vale, 2003), aber die treibende Kraft für die mitochondrialen Bewegungen ist immer noch nicht vollständig entschlüsselt (Yoon, 2005). Im Jahr 2004 wurden von Yi *et al.* in kardialen Myoblasten ebenfalls mitochondriale Bewegungen entdeckt, die von intrazellulären Kalziumkonzentrationen abhängig sind. In dieser Studie haben die Autoren beobachtet, dass die mitochondrialen Bewegungen unter Ruhekalziumkonzentrationen (ca. 100 nM) am stärksten waren, minimal ausgeprägt bei ansteigenden Kalziumkonzentrationen und bei abfallenden Konzentrationen wieder teilweise anstiegen. In T-Zellen verhält es sich genau anders herum: hier zeigen die Mitochondrien ihre größten Bewegungen, wenn die intrazellulären Kalziumkonzentrationen hoch sind ( $> 500$  nM). Diese starken zielgerichteten Bewegungen traten in der Regel kurz nach Erhöhung der Kalziumkonzentrationen auf und dauerten bei der Bewegung zur IS hin über eine Stunde an. Die in dieser Arbeit gewonnenen Daten weisen daher auf eine unterschiedliche Beziehung zwischen Mitochondrien und Kalziumkonzentrationen in verschiedenen Zelltypen hin.

Unsere Ergebnisse lassen vermuten, dass es einen gut kontrollierten Kalzium-abhängigen Aktivierungsmechanismus von Kinesin-, Dynein- und Dynactin-Motorproteinen in T-Zellen gibt, der die Lokalisation von Mitochondrien zur Plasmamembran bzw. IS kontrolliert, um die CRAC/Orai-Kanäle über einen langen Zeitraum offen zu halten. Mögliche Proteine, die in diesem Zusammenhang eine Rolle spielen könnten, sind eine Untergruppe von Rho GTP-asen mit dem Namen Miro. Sie besitzen zwei kalziumbindende EF-Hand Motive und wurden schon im Zusammenhang mit der Ausprägung der mitochondrialen Morphologie (Fransson *et al.*, 2003; Frederick *et al.*, 2004) und des mitochondrialen Transports entlang von *Drosophila* Axonen (Guo *et al.*, 2005) beschrieben. Miro ist durch das Adapterprotein Milo an Kinesin-1 gekoppelt und vermittelt so den anterograden Transport von Mitochondrien (Wang and Schwarz, 2009). Die Autoren dieser Studie haben auch herausgefunden, dass Kinesin in allen axonalen Mitochondrien in Neuronen gefunden werden kann, unabhängig davon, ob die Mitochondrien sich retrograd oder überhaupt nicht bewegen. Miro vermittelt auch das kalziumabhängige Stoppen der mitochondrialen Bewegungen und die regulatorischen Mechanismen: in diesem Fall dissoziiert Kinesin-1 nicht von den Mitochondrien, sondern die Kalziumbindung erlaubt es Miro direkt mit den Kinesinen zu interagieren und so die Interaktionen zwischen Motorproteinen und Mikrotubuli zu verhindern. Kinesin-1 wechselt also von einem aktiven Zustand, in dem es nur über Milton an Miro gebunden ist, in einen inaktiven Zustand, in dem es direkt an Miro gebunden ist und so die Interaktion mit den Mikrotubuli verhindert. Saotome *et al.* (2008) haben desweiteren herausgefunden, dass unter Ruhekalziumbedingungen die Bewegungen von Mitochondrien durch Überexpression von Miro unabhängig vom EF-Hand Motiv verstärkt werden. Miro verstärkte weiterhin die Fusion von Mitochondrien unter Ruhekalziumbedingungen und vermittelte eine Fragmentierung der Mitochondrien bei höheren intrazellulären Kalziumkonzentrationen. Diese Effekte von Miro auf die Morphologie von Mitochondrien scheint mit der Aktivierung und Suppression von Drp1 (dynamamin related protein 1) zusammenzuhängen. In primären Neuronen vermittelt Miro zusätzlich eine Zunahme der dendritischen mitochondrialen Masse und steigert die mitochondriale Kalziumsignalübertragung. Zusammenfassend lässt sich also sagen, dass das Protein Miro als kalziumsensitiver Schalter und bifunktionaler Regulator für die Bewegungen und die Fusions- und Fissionsdynamik von Mitochondrien fungiert.

Zusätzlich zu diesen mitochondrialen Translokationen konnte nach Bildung der IS eine Formveränderung der T-Zellen beobachtet werden (siehe Abb. 12 (A)). Diese vom Aktin-Zytoskelett abhängigen Formveränderungen führen zu Verlängerungen oder zum Abflachen der T-Zellen. Der Abstand von Mitochondrien zur Plasmamembran und den darin enthaltenen CRAC/Orai-

Kanälen wird durch diesen Mechanismus verringert, da sich die Höhe der T-Zellen (in z-Dimension) ändert. Diese durch die Formveränderung bedingte Annäherung der Mitochondrien an die Zellmembran korreliert mit einem Anstieg der Kalziumamplituden (Quintana *et al.*, 2008). Sogar T-Zellen, in denen die mitochondrialen Bewegungen zur Plasmamembran durch Dynein Motorproteine komplett blockiert wurden, zeigen durch die Formveränderung keine Inhibierung des kalziumabhängigen CRAC-Kanals. Natürlich erleichtert diese Formveränderung der T-Zellen auch die Interaktion von T-Zelle mit APC, da so eine größere Fläche zur Verfügung steht, an der sich eine IS bilden kann. Diese Ergebnisse zeigen, wie wichtig diese Formveränderungen für die T-Zell Aktivierung nach IS-Bildung sind.

Die hohen intrazellulären Kalziumkonzentrationen, die nach der Bildung der IS, der unterstützenden Wirkung der mitochondrialen Kalziumpufferfunktion und Translokationen erreicht werden, haben mehrere Auswirkungen für die T-Zellen. Sie verlängern nicht nur die Interaktionszeiten zwischen T-Zelle und APC durch das Beenden der T-Zell Migration und der damit einhergehenden Verstärkung der Gentranskription, die zu einer positiven Selektion führt (Bahkta *et al.*, 2005). Die hohen Kalziumkonzentrationen induzieren auch die T-Zell Anergie durch anhaltende Calcineurin Aktivierung, wenn eine positive Kostimulation nicht simultan stattfindet (Heissmeyer *et al.*, 2004). In diesem Fall induzieren die Kalziumsignale die Aktivierung von NFAT Proteinen, jedoch ohne gleichzeitige Aktivierung von AP-1 (Macian, 2005; Macian *et al.*, 2002), was zu einem Wechsel des Genexpressionsprofils führt.

## 7.2 Kontrolle der intrazellulären Kalziumsignale durch die mitochondriale Lokalisation

Im zweiten Teil dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob und wie die mitochondriale Lokalisation Einfluss auf die Ausbreitung von lokalen Kalziumsignalen in T-Zellen nehmen kann. Hierzu wurde die cell-attached Patch Technik eingesetzt, um Kalzium lokal an der T-Zellmembran zu applizieren. Mogami *et al.* haben im Jahr 1997 diese Technik zum ersten Mal eingesetzt, um in Azinuszellen die Ausbreitung von Kalzium innerhalb des Endoplasmatischen Reticulums („Kalzium-Tunnelling“) näher zu untersuchen.

Um den Einsatz dieser Technik in unserem experimentellen System zu evaluieren, wurden zunächst folgende Vorversuche durchgeführt. Nach TG-Stimulation und Änderung des Membranpotentials wurde ein fokaler Kalziumeinstrom nur über den gepatchten Bereich der Zellmembran erzeugt. Zusätzlich konnten wir auch über Membranpotentialänderungen den Kalziumeinstrom reversibel aus- und wieder einschalten (Daten nicht gezeigt). Mit dieser Tech-

nik wurden daraufhin die intrazellulären Kalziumkonzentrationen in verschiedenen T-Zellarten gemessen, die sich hinsichtlich ihrer (zufälligen) mitochondrialen Lokalisationen zu Beginn der Experimente unterschieden. Wir stellten fest, dass in Zellen mit Mitochondrien nahe der Kalziumeinstromquelle höhere Kalziumkonzentrationen innerhalb kürzerer Zeit nach TG Stimulation und Membranpotentialänderungen erreicht wurden, als in Zellen ohne Mitochondrien in diesem Bereich. Diese Ergebnisse zeigen erneut, wie wichtig die Mitochondrien für die Aktivität der CRAC/Orai-Kanäle sind. Sind die Mitochondrien direkt an der Kalziumeinstromquelle lokalisiert, können sie dort durch ihre Pufferfunktion effektiver die kalziumabhängige Inaktivierung der CRAC/Orai-Kanäle verhindern. Dadurch werden in den T-Zellen höhere intrazelluläre Kalziumkonzentrationen erreicht, die für die anschließenden Vorgänge während der T-Zell Aktivierung von entscheidender Bedeutung sind (Grakoui *et al.*, 1999; Lee *et al.*, 2003). Sind die Mitochondrien weiter entfernt vom Kalziumeinstrom und den darin involvierten CRAC/Orai-Kanälen werden diese durch die Kalziumakkumulation in der Mikrodomäne unter dem Eingang der Kanäle schneller inhibiert (Glitsch *et al.*, 2002; Hoth *et al.*, 2000; Lewis, 2001; Parekh and Putney, 2005).

Zusätzlich zu dieser Kalziumaufnahme durch die Mitochondrien, trägt noch ein weiterer Effekt dazu bei die CRAC/Orai-Kanäle über längere Zeiträume offen zu halten. Bakowski und Parekh haben im Jahr 2007 herausgefunden, dass Pyruvat die schnelle Inaktivierung dieser Kanäle verhindert (Bakowski and Parekh, 2007). Dieser Effekt des Pyruvats kommt nicht durch einen gesteigerten mitochondrialen Metabolismus, gesteigertem ATP oder verstärkter zytoplasmatischer Kalziumpufferaktivität zu Stande. Vielmehr scheint Pyruvat einen direkten Effekt auf die CRAC-Inhibierung zu haben, indem es die Kalzium-abhängige Inaktivierung direkt an der Kalziummikrodomäne oder in der Pore selbst beeinflusst. Die Regulation des CRAC/Orai-Kanals durch den Zwischenmetabolit Pyruvat koppelt die Kalziumsignalübertragung an den zellulären Energiemetabolismus und kann so viele physiologische Prozesse beeinflussen. Desweiteren sollte eine Steigerung des Kalziumeinstroms durch SOC's zu einer gesteigerten Kalziumaufnahme durch die Mitochondrien führen und nachfolgend eine höhere Umsatzrate von Pyruvat zu Acetyl-CoA zur Folge haben. Diese Vorgänge würden die Glukose-Oxidation und ATP Produktion steigern.

Auffallend war an unseren Ergebnissen, dass in CD4<sup>+</sup> T-Zellen größere Unterschiede bezüglich der intrazellulären Kalziumkonzentrationen in Abhängigkeit von der mitochondrialen Lokalisation auftraten und die Kalziumkonzentrationen auch insgesamt um den Faktor 2 größer waren, als in parentalen Jurkat T-Zellen. Zusätzlich war die treibende elektrochemische Kraft für den Kalziumeinstrom in CD4<sup>+</sup> T-Zellen geringer, da hier nur eine Potentialän-

derung von + 60 mV auf - 60 mV durchgeführt wurde (bei Jurkat T-Zellen +150 mV auf - 100 mV). Eine mögliche Erklärung für diese Ergebnisse könnte in einer höheren CRAC/Orai-Kanal Dichte in der Membran der CD4<sup>+</sup> T-Zellen liegen. Dadurch könnte insgesamt mehr Kalzium in die Zellen fließen, als dies in Jurkat T-Zellen der Fall war. Offensichtlich inaktivierten auch die CRAC/Orai-Kanäle in CD4<sup>+</sup> T-Zellen mit mitochondrialer Lokalisation entfernt vom Kalziumeinstrom nicht so stark, wie dies in Jurkat T-Zellen der Fall war. Hier könnte die mögliche Ursache in der unterschiedlichen Zellgröße liegen: parentale Jurkat T-Zellen haben einen Durchmesser von ca. 10  $\mu\text{m}$ , der Durchmesser von CD4<sup>+</sup> T-Zellen liegt bei ca. 6  $\mu\text{m}$ . Daher gelangt das einströmende Kalzium unter Bedingungen, in denen die Mitochondrien entfernt von der Einstromquelle liegen in CD4<sup>+</sup> T-Zellen viel schneller in Bereiche mit Mitochondrien, als in Jurkat T-Zellen. Dadurch können die Mitochondrien in CD4<sup>+</sup> T-Zellen durch die Kalziumaufnahme über ihren Uniporter effektiver die CRAC-Inaktivierung verhindern (Glitsch *et al.*, 2002; Hoth *et al.*, 2000; Lewis, 2001; Parekh and Putney, 2005).

Weiterhin wurde überprüft, ob die beobachteten unterschiedlichen Kalziumkonzentrationen wirklich aufgrund der verschiedenen mitochondrialen Lokalisationen relativ zur Kalziumeinstromquelle zu Stande kamen, indem die mitochondriale Kalziumaufnahme in Jurkat T-Zellen durch CCCP blockiert wurde. In diesem Fall würde man davon ausgehen, dass die Kalziumkonzentrationen sowohl in Zellen mit Mitochondrien nahe an der Kalziumeinstromquelle, als auch entfernt davon die gleichen Werte annehmen würden, da die Mitochondrien die kalziumabhängige CRAC-Inaktivierung nicht mehr verhindern würden und die CRAC/Orai-Kanäle unabhängig von der mitochondrialen Lokalisation zum gleichen Zeitpunkt schließen würden. In unseren Experimenten zeigte sich, dass sich die Kalziumkonzentrationen in den beiden Zellpopulationen tatsächlich nach einer Zeit von 150 s bis zum Ende der Experimente keine Unterschiede mehr aufwiesen. Jedoch zu Beginn der Experimente, als der Kalziumeinstrom durch Änderung des Membranpotentials initiiert wurde, gab es einen deutlichen Unterschied zwischen Zellen mit unterschiedlichen mitochondrialen Lokalisationen. So zeigten Jurkat T-Zellen, in denen Mitochondrien und Kalziumeinstromquelle räumlich getrennt waren, nach Membranpotentialänderung einen hohen transienten Kalziumkonzentrationsanstieg, wohingegen die andere Zellpopulation, bei der keine räumliche Trennung vorlag, einen langsameren und deutlich niedrigeren Konzentrationsanstieg aufwies. Der Grund hierfür könnte in einer Behinderung der Kalziumdiffusion in Zellen mit Mitochondrien am Kalziumeinstrombereich sein. Dadurch, dass die Mitochondrien kein Kalzium mehr aufnehmen, kann sich unter diesen Bedingungen das einströmende Kalzium nicht mehr uneingeschränkt im Zytosol verteilen (Barrierefunktion der Mitochondrien) und

es kommt im Vergleich zu der anderen Zellpopulation zu einer schnelleren Inhibierung der CRAC/Orai-Kanäle.

Durch den Einsatz des kalziumsensitiven Farbstoffes Rhod-2 waren wir in der Lage, die intramitochondrialen Kalziumkonzentrationen in unserem experimentellen System zu messen, um herauszufinden, ob es Unterschiede in den Kalziumsignalen in Abhängigkeit von der mitochondrialen Lokalisation relativ zur Kalziumeinstromquelle gibt. Wir konnten zeigen, dass in Mitochondrien, die nahe am cell-attached Patch lagen, nach dem Wechsel des Membranpotentials innerhalb kürzerer Zeit höhere intramitochondriale Kalziumkonzentrationen erreicht wurden. Diese Mitochondrien befanden sich in der Nähe der Kalziummikrodomäne, die durch die Öffnung der CRAC/Orai-Kanäle nach TG-Behandlung entstanden ist (Parekh, 2008). Dadurch konnten die Uniporter in der Membran der Mitochondrien mehr Kalzium aufnehmen (Rizzuto *et al.*, 2000), als dies weiter entfernt vom Kalziumeinstrom möglich war. Je weiter die Mitochondrien entfernt vom Patch lokalisiert waren, desto länger dauerte es, bis Kalzium durch Diffusion in diesen Zellbereichen angekommen war. Desweiteren war in diesen Zellbereichen auch zu Beginn eine geringere Kalziumkonzentration messbar, da entweder Mitochondrien nahe am Patch schon einen Teil des eingeströmten Kalziums aufgenommen haben oder die Kalziumkonzentration durch den längeren Diffusionsweg im Vergleich zur Mikrodomäne in der Nähe der CRAC/Orai-Kanäle abgenommen hat. Quintana *et al.* haben gezeigt, dass es ebenfalls Unterschiede in den intramitochondrialen Kalziumkonzentrationen in Abhängigkeit von der Lokalisation in Bezug zur IS gibt (Quintana *et al.*, 2007). Mitochondrien, die nahe an der IS lokalisiert waren, zeigten in dieser Studie auch höhere intramitochondriale Kalziumkonzentrationen. Ebenso stiegen diese Kalziumsignale im Vergleich zu denen in Mitochondrien entfernt von der IS auch innerhalb kürzerer Zeit an. Die Autoren erklärten diese Ergebnisse ebenfalls durch die unterschiedlichen Abständen zu Kalziummikrodomänen, die sich in der Nähe der IS und den dort lokalisierten CRAC/Orai-Kanälen bildeten. In den obigen Experimenten sind wir immer von einem Kalziumeinstrom über CRAC/Orai-Kanäle in den Membranen der T-Zellen ausgegangen. Um zu untersuchen, ob der Kalziumeinstrom in unseren experimentellen Aufbau ausschließlich über CRAC/Orai-Kanäle erfolgt, wurden die bekannten CRAC-Kanal Blocker BTP-2 und 2-APB eingesetzt (Zitt *et al.*, 2004; Maryama *et al.*, 1997). Nachdem Jurkat T-Zellen mit diesen Substanzen behandelt wurden, zeigte sich nach TG-Stimulation und Änderung des Membranpotentials jedoch ein verstärkter Kalziumeinstrom über den cell-attached Patch im Vergleich zu unbehandelten Kontrollzellen. Hierbei zeigten 2-APB behandelte Zellen höhere intrazelluläre Kalziumkonzentrationen als BTP-2 behandelte Zellen. In Kalzium-Imaging Experimenten ohne lokale Kalzium-Applikation

mittels cell-attached Patch zeigten die beiden Substanzen die übliche Inhibition des Kalziumeinstroms über die CRAC/Orai Kanäle nach TG Stimulation. Beide Substanzen zeigten in diesen Experimenten jedoch unterschiedliche Wirkungen auf die Kalziumfreisetzung aus TG-sensitiven Speichern. Hierbei zeigte BTP-2 eine Verstärkung und 2-APB eine Verminderung der Kalziumfreisetzung im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollzellen.

Für die beobachteten Effekte in den Experimenten mit lokaler Kalzium-Applikation könnte es verschiedene Erklärungen geben. Zum einen könnten die Effekte der 2-APB behandelten Zellen durch die Ergebnisse von Peinelt *et al.* erklärt werden (Peinelt *et al.*, 2008). Die Autoren zeigten, dass 2-APB verschiedene Wirkungen auf die unterschiedlichen CRAC/Orai-Kanal Subtypen hat. So zeigte sich in ihrer Studie, dass 2-APB auf den Orai3-Kanal (CRACM3) aktivierende Wirkung hat. So könnten unsere Ergebnisse damit erklärt werden, dass die heteromeren CRAC-Kanäle (Lis *et al.*, 2007; Gross *et al.*, 2007) in Jurkat T-Zellen zu einem großen Anteil aus Orai3-Untereinheiten aufgebaut sein könnten. Allerdings haben Versuche mit einer Überexpression von Orai3 in diesem Zelltyp zu keinem signifikanten Anstieg des 2-APB Effekts geführt (Daten nicht gezeigt). Zum anderen wäre es auch möglich, dass nach 2-APB- bzw. BTP-2 Behandlung die positiven und negativen Rückkopplungsprozesse auf die unterschiedlichen Orai-Subtypen verändert werden, wenn nur eine kleiner Teil der Kanäle aktiv ist (Zweifach and Lewis, 1995). Die Autoren dieser Studie haben festgestellt, dass es mindestens zwei verschiedene Inaktivierungsprozesse für die CRAC/Orai-Kanäle gibt und diese könnten durch die Behandlung mit 2-APB bzw. BTP-2 unterschiedlich beeinflusst werden.

Die verstärkenden Effekte des Kalziumeinstroms, die mit BTP-2 in Jurkat T-Zellen nach Kalzium-Applikation über den cell-attached Patch erzielt wurden, lassen sich nicht ohne weiteres durch unspezifische Wirkungen von BTP-2 erklären. Zitt *et al.* haben in ihrer Publikation zu BTP-2 gezeigt, dass BTP-2 nicht mit Kalziumpumpen, mitochondrialer Kalziumaufnahme, Kalziumfreisetzung aus dem ER oder Kalziumkanälen interagiert (Zitt *et al.*, 2004). Desweiteren zeigten sie, dass die Inhibition der Kalziumsignale durch BTP-2 in T-Zellen unabhängig von der Stimulationsmethode der T-Zellen ist (a-CD3 Antikörper, TG, IP<sub>3</sub>).

Grundsätzlich lässt sich sagen, dass die beobachteten Unterschiede der Kalziumkonzentrationen nach 2-APB- bzw. BTP-2- Behandlung durch lokalen bzw. globalen Kalziumeinstrom in den T-Zellen verursacht werden. Wird Kalzium nur lokal durch den cell-attached Patch appliziert, so sind auch nur wenige CRAC/Orai-Kanäle am Kalziumeinstrom beteiligt. Hier könnten die Substanzen anders auf die Feedback-Mechanismen wirken, als bei der Beteiligung von vielen CRAC/Orai-Clustern am Kalziumeinstrom. Im Falle des

globalen Kalziumeinstroms werden die CRAC/Orai-Kanäle fast vollständig inhibiert und positive Feedback-Mechanismen spielen unter diesen Bedingungen keine Rolle. Im Falle eines lokalen Kalziumeinstroms könnten allerdings positive Feedback-Mechanismen gegen die Wirkung von 2-APB bzw. BTP-2 arbeiten und so zu einer Aktivierung der CRAC/Orai-Kanäle führen. Es ist allerdings sehr fraglich, ob diese Aktivierung wirklich stärker wäre, als unter den Bedingungen ohne Substanzzugabe. Zur Klärung dieser Phänomene bedarf es noch weiterer Experimente, damit man die Zusammenhänge zwischen lokalem Kalziumeinstrom, Änderung des Membranpotentials und CRAC-Kanal Blocker mechanistisch noch besser versteht.

### 7.3 Aufklärung des Ziels mitochondrialer Bewegungen

Im letzten Teil dieser Doktorarbeit sollte die Frage geklärt werden, was das Ziel der mitochondrialen Bewegungen zur IS ist: eine Kalziumeinstromquelle im Bereich der IS oder die Bildung der IS selbst mit einhergehender Reorganisation des Zytoskeletts. Hierzu wurde an einer Stelle der T-Zell Membran Kalzium durch die cell-attached Patch Technik lokal appliziert und an der gegenüberliegenden Seite der Membran mit unterschiedlichen Methoden versucht, eine IS-Bildung zu induzieren. Durch die räumliche Trennung von Kalziumeinstrom und IS-Bildung mit simultaner Analyse der mitochondrialen Bewegungen konnte das Ziel dieser Bewegungen aufgeklärt werden.

In der ersten Experimentreihe wurde versucht, die Bildung einer IS mit Hilfe einer aCD3/aCD28-antikörperbeschichteten Pipette zu erreichen. Da schon in vielen vorangegangenen Publikationen gezeigt wurde, dass man mit Hilfe von antikörperbeschichteten Beads die Bildung einer IS und damit eine Aktivierung der T-Zellen erreichen kann (Schwarz *et al.*, 2007; Quintana *et al.*, 2007), entwickelte sich die Idee, eine Glaspipette an der Spitze kugelförmig zu schmelzen und darauf die gleichen Antikörper zu binden, wie sie bei der Beadbeschichtung verwendet wurden. Nach mehreren Vorversuchen mit verschiedenen Glassorten und fluoreszierenden Antikörpern, waren wir in der Lage die Antikörper stabil auf die Oberflächen der Pipetten zu binden. Dies wurde durch die Messung der Antikörperfluoreszenz auf der Glasoberfläche überprüft.

Mit Hilfe dieser beschichteten Pipetten und der gleichzeitigen lokalen Applikation von Kalzium über den cell-attached Patch konnte ein Kalziumeinstrom in Jurkat T-Zellen nach Änderung des Membranpotentials ausgelöst werden. Der Kalziumeinstrom in diesem experimentellen Aufbau fluktuierte stark über den Zeitraum einer Stunde im Vergleich zur Beadstimulation von Jurkat T-Zellen (hierbei wurde Kalzium global appliziert). Die Analyse der mitochondrialen Fluoreszenzintensitäten über den Zeitraum von einer Stun-

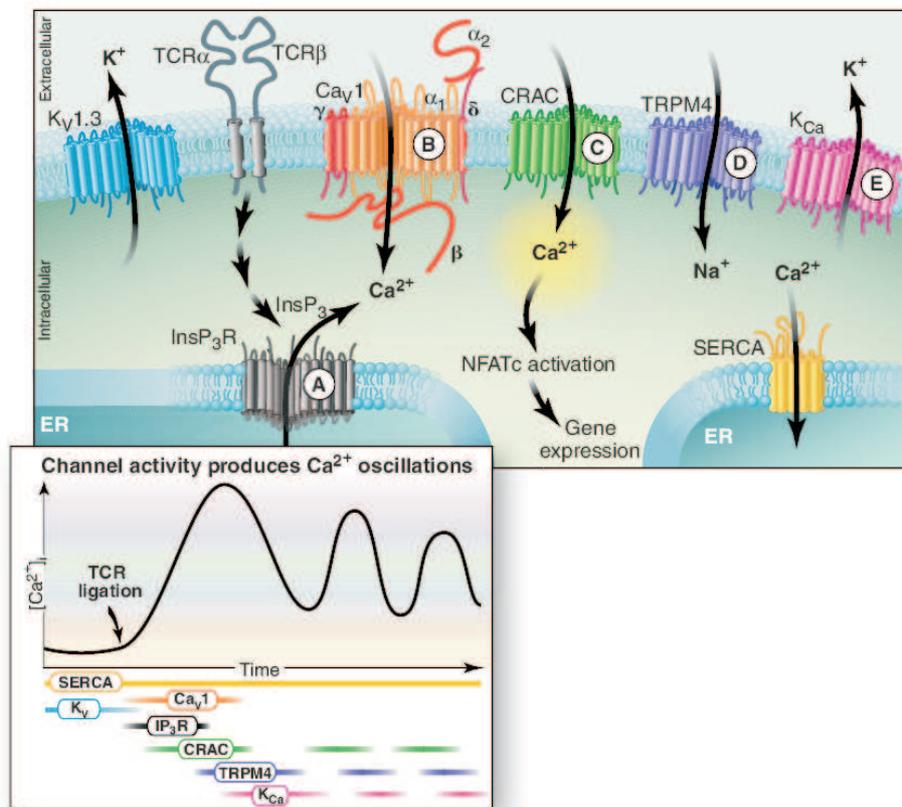
de im Bereich des Kalziumeinstroms und des Berührungsbereichs zwischen antikörperbeschichteter Pipette und T-Zelle zeigte jedoch keine signifikanten Präferenzen für die Mitochondrien, sich in einen der beiden Bereiche zu bewegen. Daher stellte sich die Frage, ob man mit diesen beschichteten Pipetten überhaupt die Bildung einer IS induzieren kann. Zur Beantwortung dieser Frage wurde die Aktin-Translokation nach Kontaktherstellung überprüft. Dustin und Cooper haben gezeigt, dass nach IS-Bildung eine Umorganisation des Zytoskeletts auftritt, daher konnten wir diese Umorganisation als Beweis für die Bildung einer IS unter den gegebenen Bedingungen einsetzen (Dustin and Cooper, 2000; Qi *et al.*, 2001). Eine Analyse der Fluoreszenzintensitäten von TagYFP-bActin transfizierten Jurkat T-Zellen im Pipetten-Zell-Kontaktbereich zeigte keine starke Erhöhung der Aktinfluoreszenz über den beobachteten Zeitraum. Ebenso konnten wir keine Formveränderung der T-Zellen nach Pipetten-Kontakt erkennen, wie sie bei Bead-Stimulation der T-Zellen auftritt (Quintana *et al.*, 2008). Daher kann man davon ausgehen, dass die Methode mit antikörperbeschichteten Glaspipetten nicht geeignet ist, die Bildung einer IS auszulösen. Der Grund hierfür könnte in der unterschiedlichen Oberflächenbeschaffenheit von Beads und Sodaglaspipette liegen. Möglicherweise sind die stimulierenden AK's auf den Beads in einer höheren Dichte gebunden und können so effizienter die Bildung einer IS auslösen. Vielleicht gibt es auch Unterschiede bezüglich der Bindungsaffinitäten zwischen Glas- bzw. Polystyrenoerfläche und den zu bindenden AK's. Sollte die Bindung auf der Glasoberfläche nicht stark genug sein, so könnten die AK's beim Eintauchen der beschichteten Pipette in die Messlösung weggespült werden.

Trotz der Tatsache, dass mit diesem experimentellen Aufbau anscheinend keine IS-Bildung erreicht wurde und die Zellen auch nicht durch TG aktiviert wurden, konnte ein Kalziumeinstrom in den Jurkat T-Zellen beobachtet werden. Das lässt die Frage aufkommen, ob es neben den CRAC/Orai-Kanälen noch andere Ionenkanäle in der Membran der T-Zellen gibt, die für den Anstieg der Kalziumkonzentrationen verantwortlich sein könnten. Abb. 23 zeigt einen Überblick über die Ionenkanäle in Lymphozyten und ihre Funktionen im Rahmen der Kalziumsignalübertragungswege. So gab es in der Vergangenheit kontroverse Diskussionen, ob auch spannungsaktivierte Kalziumkanäle während der T-Zell-Aktivierung eine Rolle spielen (Kotturi *et al.*, 2003; Winslow und Crabtree, 2005). Wir konnten ebenfalls einen leichten Kalziumeinstrom nach Änderung des Membranpotentials in Jurkat T-Zellen beobachten, wenn die Zellen nicht mit TG behandelt wurden und auch keine anderweitige Stimulation der Zellen erfolgt ist (Daten nicht gezeigt). Möglicherweise induziert die Änderung des Membranpotentials durch den cell-attached Patch noch andere Mechanismen in den Zellen, die zu einem CRAC/Orai-

unabhängigen Kalziueinstrom führen. Diese Fragestellung wurde jedoch im Rahmen dieser Doktorarbeit nicht näher untersucht.

Wie oben dargestellt, wurde in früheren Arbeiten gezeigt, dass die fokale Stimulation mit antikörperbeschichteten Beads die Bildung einer IS und nachfolgende Aktivierung der T-Zellen auslöst (Schwarz *et al.*, 2007; Quintana *et al.*, 2007). Daher war es naheliegend, für die räumlich kontrollierte IS-Bildung in unserem experimentellen System aCD3/aCD28-antikörperbeschichtete Beads zu benutzen, die dann mit Hilfe einer Pipette exakt an die dem Kalziueinstrom gegenüberliegende Membranseite positioniert wurden. Unter diesen experimentellen Bedingungen konnten wir sowohl eine Aktin-Akkumulation im Zell-Bead-Kontaktbereich identifizieren, als auch starke Formveränderungen nach Zell-Bead-Kontakt beobachten. Daher kann man davon ausgehen, dass sich unter diesen Bedingungen wirklich eine funktionelle IS ausgebildet hat (Dustin and Cooper, 2000; Qi *et al.*, 2001; Quintana *et al.*, 2008). Zugleich konnten wir auch hier eine Kalziumkonzentrationsänderung beobachten, die nach der Änderung des Membranpotentials ihr Maximum erreicht hat und dann innerhalb von ca. 500 s auf ein gleichbleibendes Niveau abfällt. Hier waren allerdings keine ausgeprägten Fluktuationen der Kalziumkonzentration (Fura-2 Ratio Werte) wie in den Experimenten mit Antikörperbeschichteten Pipetten zu erkennen. Zugleich war auch der Kalziueinstrom insgesamt höher als in den vorangegangenen Experimenten mit antikörperbeschichteten Pipetten.

Die Analyse der mitochondrialen Fluoreszenzintensitäten im Bereich des Kalziueinstroms und im Zell-Bead-Kontaktbereich zeigte nach einer Stunde eine signifikante Erhöhung der Fluoreszenzsignale im Bereich der IS, wohingegen im Bereich des Kalziueinstroms die Fluoreszenzintensitäten im Vergleich zu den Anfangsbedingungen etwas vermindert waren. Dies ist ein deutliches Ergebnis, das für die Bewegung der Mitochondrien zur IS spricht, unabhängig davon, wo sich die Quelle des Kalziueinstroms in den T-Zellen befindet. Aus den gewonnenen Ergebnissen kann man nun folgern, dass die Mitochondrien während der T-Zell Aktivierung Kalzium für ihre Bewegungen brauchen, das Ziel dieser Bewegungen aber nicht die Quelle des Kalziueinstroms, sondern die IS selbst ist. Desweiteren kann man die oben erwähnte Hypothese von Quintana *et al.* bestätigen bzw. erweitern, die besagt, dass die Mitochondrien zu Beginn der T-Zell Aktivierung zuerst entlang der Mikrotubuli in Richtung Plasmamembran und dann entlang des Aktin-Zytoskeletts zur IS wandern. Dort angekommen unterstützen die Mitochondrien die CRAC/Orai Aktivität durch Kalziumaufnahme und Verminderung der kalziumabhängigen Inaktivierung der CRAC/Orai-Kanäle, was für die nachfolgende Aktivierung von Transkriptionsfaktoren und korrekte  $T_H$ -Zell Funktion notwendig ist (Übersicht über T-Zell Aktivierung siehe Abb. 24).



**Abb. 23: Ionenkanäle, die an der kalziumabhängigen Signaltransduktion in T-Zellen beteiligt sind:** Ionenkanäle, die an der Initiierung und Modulation von Kalziumsignalen in T-Zellen beteiligt sind, nachdem ein Ligand am T-Zell Rezeptor gebunden hat und die T-Zell Aktivierung gestartet wurde. In ruhenden Lymphozyten transportieren  $K_V1.3$ -Kanäle Kalium aus der Zelle und die SERCA pumpt Kalzium wieder in die Speicher des ER-Lumens zurück. Das resultierende Ruhepotential liegt bei  $-65$  mV. Die Stimulation des T-Zell Rezeptors führt zur Aktivierung der Phospholipase C- $\gamma$  (PLC- $\gamma$ ) und nachfolgender Produktion des second messengers  $IP_3$ .  $IP_3$  bindet an  $IP_3$ -Rezeptoren (A) in der ER-Membran und Kalzium wird intrazellulär freigesetzt.  $Ca_V1$ -Kanäle (B) werden durch einen unbekanntem Mechanismus nach T-Zell Rezeptorstimulation aktiviert und sind möglicherweise am initialen Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration beteiligt. Nach Stimulation des T-Zell Rezeptors öffnen sich die CRAC-Kanäle (C) und extrazelluläres Kalzium fließt in die Zelle. Wenn die Kalziumkonzentration einen Schwellenwert erreicht, wird TRPM4 (D) aktiviert und die CRAC-Kanäle inhibiert. TRPM4 Aktivierung führt zu einem Natriumstrom in die Zelle, wodurch der Kalziumeinstrom durch die Depolarisation der Membran reduziert wird. Kalziumaktivierte  $K_{Ca}$ -Kanäle werden ebenso aktiviert, was die Zellen repolarisiert und zu einem nachfolgenden Kalziumspike führt. Das untere Bild zeigt das typische intrazelluläre Kalziumkonzentrationsprofil nach T-Zell Rezeptorstimulation (Pfeil). Die Kanäle, die während jeder Phase aktiviert werden, sind unter dem Profil aufgezeigt (aus Winslow und Crabtree, 2005).

Daher sind CRAC/Orai-Kanäle, die an der IS lokalisiert sind, länger aktiv als solche, die weiter entfernt von diesem Bereich sind. Diese Vorhersage wird durch die Ergebnisse von Quintana *et al.* (2007) unterstützt, die zeigen, dass Mitochondrien, die nahe an der IS liegen, signifikant mehr Kalzium aufnehmen, als solche, die in anderen Zellbereichen lokalisiert sind. Zusätzlich wurde 2008 von Lioudyno *et al.* gezeigt, dass es eine Akkumulation von Stim1 und Orai1 an der IS gibt und diese Moleküle dort mit T-Zell Rezeptoren und kostimulatorischen Molekülen kolokalisiert sind. Auch Barr *et al.* zeigten 2008, dass Stim1 und Orai1 in „Punctae“ an der IS kolokalisieren. Die Autoren dieser Studie fanden jedoch eine zusätzliche Orai1/Stim1 Akkumulation am gegenüberliegenden Ende der Zelle („Cap-Struktur“). Diese Cap-Strukturen waren sehr dynamisch und dienen möglicherweise dazu, vorgefertigte Kalziumkanal-Komponenten an bestehende oder neu entstehende IS zu liefern. Eine Akkumulation von CRAC/Orai-Kanälen an der IS würde funktionell eine lang andauernde Aktivität dieser Kanäle und somit eine effiziente Reduktion ihrer kalziumabhängigen Inhibierung erlauben, die nur durch die mitochondriale Kalziumaufnahme in unmittelbarer Nähe dieser Kanäle bewerkstelligt werden kann. Quintana *et al.* konnten in ihrer Studie 2007 mit Hilfe von TIRF-Mikroskopie Experimenten zeigen, dass die Mitochondrien näher als 200 nm zur IS translozieren. In Experimenten unserer Arbeitsgruppe, in denen Jurkat T-Zellen mit GFP-markiertem Orai1 transfiziert und mit Hilfe von aCD3/aCD28-Antikörper beschichteten Beads stimuliert wurden, konnte allerdings weder eine Orai1 Akkumulation an der IS noch die Bildung einer Cap-Struktur gezeigt werden (Daten nicht gezeigt). Die mitochondrialen Bewegungen zur IS in unserem experimentellen System, mit räumlich getrennter IS und Kalziumeinstrom wurden im Großteil aller untersuchten Zellen gefunden. 90 % aller untersuchten T-Zellen zeigten dieses Verhalten, wohingegen die restlichen 10 % der Zellen überhaupt keine mitochondrialen Bewegungen aufwiesen. Diese Ergebnisse zeigen, wie wichtig die Bewegungen der Mitochondrien zur IS für die T-Zell Aktivierung sind.

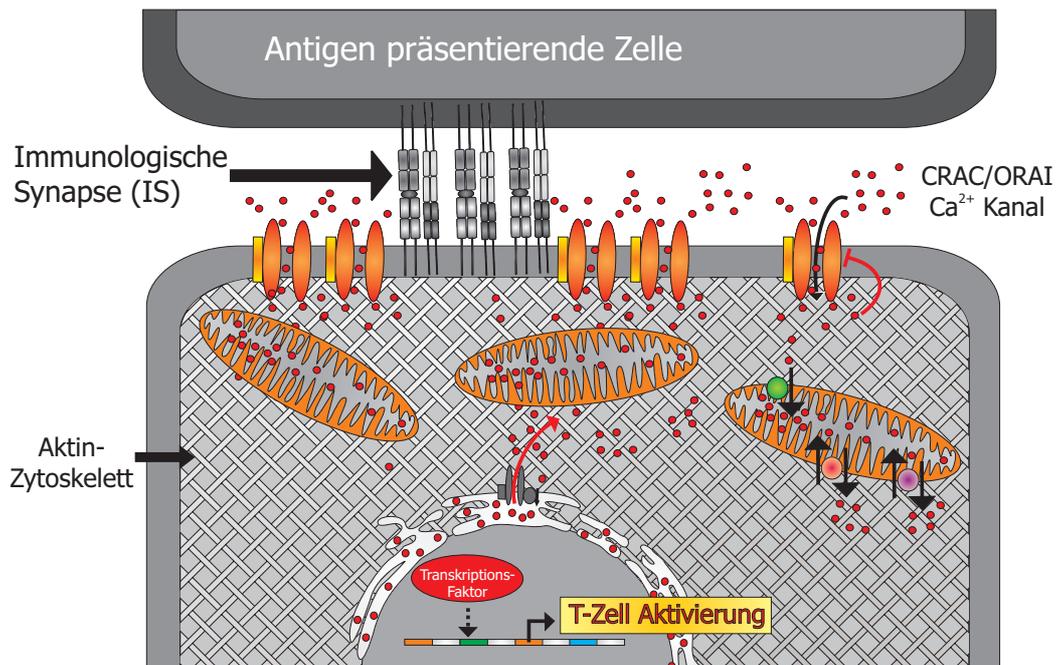
Im letzten experimentellen Teil dieser Doktorarbeit wurde untersucht, welchen Einfluss die mitochondriale Lokalisation auf die intrazellulären Kalziumsignale hat, wenn der lokale Kalziumeinstrom direkt an der IS stattfindet. Hierzu wurde die Pipette, mit der der cell-attached Patch durchgeführt wurde, nicht nur mit 1 mM CaCl<sub>2</sub>-Lösung befüllt, sondern zusätzlich mit aCD3-Antikörper beladen. Die Bildung einer IS wurde auch in diesen Experimenten durch Überprüfung der Aktin-Akkumulation im Bereich des Patches bewiesen. Zur Analyse der intrazellulären Kalziumsignale wurden die Jurkat T-Zellen wieder in zwei Populationen aufgeteilt: Zellen mit Mitochondrien nah an der IS/Kalziumeinstrom und Zellen mit Mitochondrien entfernt von diesem Bereich. Die Ergebnisse zeigen erneut, wie wichtig die mitochon-

driale Lokalisation an der IS für die Aufrechterhaltung hoher intrazellulärer Kalziumkonzentrationen ist: Zellen mit Mitochondrien an der IS zeigen im zeitlichen Verlauf höhere Kalziumsignale als Zellen ohne Mitochondrien in diesem Zellbereich.

Auffallend waren die beiden Spikes der Fura-2 Ratio Werte von Zellen mit Mitochondrien entfernt vom Patch. Diese Spikes wurden von einer einzelnen Jurkat T-Zelle produziert und fallen durch den geringen Stichprobenumfang ( $n = 3$ ) in den gemittelten Werten stark auf. Der geringe Stichprobenumfang in dieser Zellpopulation kommt durch die Tatsache zu Stande, dass durch die Bildung der IS in den meisten Zellen die Mitochondrien zum Patch-Bereich gewandert sind und kaum Zellen ohne Mitochondrien in diesem Bereich analysiert werden konnten.

Abb. 24 zeigt noch einmal die Funktionen von Mitochondrien während der T-Zell Aktivierung. Dieses Modell fasst die neuesten Erkenntnisse zusammen, die auf dem Gebiet der Kalziumsignalwege im Bereich der T-Zellen erzielt wurden und für diese Arbeit relevant waren bzw. durch diese Arbeit entstanden sind.

Ziel dieser Arbeit war, die Funktionen von Mitochondrien während der T-Zell Aktivierung näher aufzuklären. So konnten wir zeigen, dass die mitochondrialen Bewegungen zur IS kontinuierlich über einen Zeitraum von mindestens einer Stunde erfolgen und für diese Bewegungen ein Kalziumeinstrom über die Plasmamembran von T-Zellen essentiell ist. Desweiteren wurde gezeigt, dass die intrazellulären Kalziumkonzentrationen von der mitochondrialen Lokalisation relativ zu den Kalziumkanälen in der Plasmamembran abhängig sind. Dieser Effekt hat in humanen  $CD4^+$  T-Zellen noch stärkere Auswirkungen als in der T-Zelllinie Jurkat. Die wichtigste Ergebnis dieser Arbeit ist die Beantwortung folgender Frage: Was ist das eigentliche Ziel dieser mitochondrialen Bewegungen: die IS oder die Quelle des Kalziumeinstroms? Mit Hilfe einer neuen Methode konnte diese Frage beantwortet werden: Die Mitochondrien wandern entlang des Aktin-Zytoskeletts zur IS, unabhängig davon, wo der Kalziumeinstrom in der T-Zelle lokalisiert ist. Mit dieser neu entwickelten Methode können in der Zukunft auch viele andere Fragestellungen im Bereich der Kalzium-Signalübertragung in Zellen des Immunsystems beantwortet werden.



**Abb. 24: Modell der T-Zell-Aktivierung:** Nach der Bildung der IS kommt es zu einer Umordnung des Zytoskeletts und der IP<sub>3</sub>-induzierten Entleerung der intrazellulären Kalziumspeicher. Diese Speicherentleerung löst die Verlagerung des ER-membranständigen und kalziumbindenden Moleküls STIM1 zur Plasmamembran hin aus. Dort interagiert es mit ORAI-Molekülen, die die Untereinheiten des CRAC-Kanals bilden und diesen aktivieren bzw. öffnen. Es kommt zum Kalziumeinstrom in die T-Zelle und der nachfolgenden Aktivierung. Mitochondrien wandern entlang des Aktin-Zytoskeletts zur IS und verhindern dort durch ihre Kalziumpufferfunktion die kalziumabhängige Inaktivierung der CRAC-Kanäle. Durch diese Verlagerung und Kalziumaufnahme der Mitochondrien kann mehr Kalzium in die T-Zelle fließen und eine effiziente Aktivierung der T-Zelle induzieren.

## 8 Anhang

### 8.1 Literaturverzeichnis

1. **Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. and Watson, J.D.** (1994). *Molecular biology of the cell*. Third edition.
2. **Bakowski, D., and Parekh, A.B.** (2007). Regulation of store-operated calcium channels by the intermediary metabolite pyruvic acid. *Curr. Biol.* 17,1076-1081.
3. **Baldwin, A. S., Jr.** (1996). The NF-kappa B and I kappa B proteins: new discoveries and insights. *Annu Rev Immunol* 14, 649-683.
4. **Ball, E.H. and Singer, S.J.** (1982). Mitochondria are associated with microtubules and not with intermediate filaments in cultured fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci USA* 79, 123 - 6.
5. **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.* 2008 Jul;19(7):2802-17.
6. **Beeson, C., Rabinowitz, J., Tate, K., Gutgemann, I., Chien, Y. H., Jones, P. P., Davis, M. M., and McConnell, H. M.** (1996). Early biochemical signals arise from low affinity TCR-ligand reactions at the cell-cell interface. *J Exp Med* 184, 777-782.
7. **Bhakta, N. R., Oh, D. Y., and Lewis, R. S.** (2005). Calcium oscillations regulate thymocyte motility during positive selection in the three-dimensional thymic environment. *Nat Immunol* 6, 143-151.
8. **Cahalan, M.D., S.L. Zhang, A.V. Yeromin, K. Ohlsen, J. Roos, and K.A. Stauderman.** (2007). Molecular basis of the CRAC channel. *Cell Calcium.*
9. **Collins, T.J., Berridge, M.J., Lipp, P. and Bootman, M.D.** (2002). Mitochondria are morphologically and functionally heterogeneous within cells. *EMBO J* 21, 1616 - 1627.
10. **Crabtree, G. R., and Clipstone, N. A.** (1994). Signal transmission between the plasma membrane and nucleus of T lymphocytes. *Annu Rev Biochem* 63, 1045-1083.
11. **Duchen, M. R.** (2000). Mitochondria and calcium: from cell signalling to cell death. *J Physiol* 529 Pt 1, 57 - 68

12. **Dustin ML, Cooper JA.** (2000). The immunological synapse and the actin cytoskeleton: molecular hardware for T cell signaling. *Nat Immunol.* 2000 Jul;1(1):23-9.
13. **Feske, S., Giltneane, J., Dolmetsch, R., Staudt, L. M., and Rao, A.** (2001). Gene regulation mediated by calcium signals in T lymphocytes. *Nat Immunol* 2, 316-324.
14. **Feske, S., M. Prakriya, A. Rao, and R.S. Lewis.** (2005). A severe defect in CRAC Ca<sup>2+</sup> channel activation and altered K<sup>+</sup> channel gating in T cells from immunodeficient patients. *J Exp Med.* 202:651-62.
15. **Feske, S., Y. Gwack, M. Prakriya, S. Srikanth, S.H. Puppel, B. Tanasa, P.G. Hogan, R.S. Lewis, M. Daly, and A. Rao.** (2006). A mutation in Orai1 causes immune deficiency by abrogating CRAC channel function. *Nature.*
16. **Feske, S.** (2007). Calcium signalling in lymphocyte activation and disease. *Nat Rev Immunol* 7(9),690-702
17. **Flanagan, W. M., Corthesy, B., Bram, R. J., and Crabtree, G. R.** (1991). Nuclear association of a T-cell transcription factor blocked by FK-506 and cyclosporin A. *Nature* 352, 803-807.
18. **Fransson, A., Ruusala, A., and Aspenstrom, P.** (2003). Atypical Rho GTPases have roles in mitochondrial homeostasis and apoptosis. *J Biol Chem* 278, 6495-6502.
19. **Frederick, R. L., McCaffery, J. M., Cunningham, K. W., Okamoto, K., and Shaw, J. M.** (2004). Yeast Miro GTPase, Gem1p, regulates mitochondrial morphology via a novel pathway. *J Cell Biol* 167, 87-98.
20. **Friedl, P., den Boer, A. T., and Gunzer, M.** (2005). Tuning immune responses: diversity and adaptation of the immunological synapse. *Nat Rev Immunol* 5, 532-545.
21. **Gardner, P.** (1989). Calcium and T lymphocyte activation. *Cell* 59, 15-20.
22. **Gillis S, Watson J.** (1980). Biochemical and biological characterization of lymphocyte regulatory molecules. V. Identification of an interleukin 2-producing human leukemia T cell line. *J Exp Med.* 1980 Dec 1;152(6):1709-19. [Click here to read](#)
23. **Glitsch, M. D., Bakowski, D., and Parekh, A. B.** (2002). Store-operated Ca<sup>2+</sup> entry depends on mitochondrial Ca<sup>2+</sup> uptake. *Embo J* 21, 6744-6754.

24. **Goldsmith, M. A., and Weiss, A.** (1988). Early signal transduction by the antigen receptor without commitment to T cell activation. *Science* 240, 1029-1031.
25. **Grakoui, A., Bromley, S. K., Sumen, C., Davis, M. M., Shaw, A. S., Allen, P. M., and Dustin, M. L.** (1999). The immunological synapse: a molecular machine controlling T cell activation. *Science* 285, 221-227.
26. **Gross, S.A., Wissenbach, U., Philipp, S.E., Freichel, M., Cavalie, A., and Flockerzi, V.** (2007). Murine ORAI2 splice variants form functional CRAC channels. *J. Biol. Chem.* 282, 19375-19384.
27. **Guo X, Macleod GT, Wellington A, Hu F, Panchumarthi S, Schoenfield M, Marin L, Charlton MP, Atwood HL, Zinsmaier KE.** (2005). The GTPase dMiro is required for axonal transport of mitochondria to *Drosophila* synapses. *Neuron*. 2005 Aug 4;47(3):379-93.
28. **Guse, A. H.** (2004). Regulation of calcium signaling by the second messenger cyclic adenosine diphosphoribose (cADPR). *Curr Mol Med* 4, 239-248.
29. **Habermann, A., Schroer, T.A., Griffiths, G. and Burkhardt, J.K.** (2001). Immunolocalization of cytoplasmic dynein and dynAktin subunits in cultured macrophages: enrichment on early endocytic organelles. *J Cell Sci* 114, 229 - 240.
30. **Heissmeyer, V., Macian, F., Im, S. H., Varma, R., Feske, S., Venuprasad, K., Gu, H., Liu, Y. C., Dustin, M. L., and Rao, A.** (2004). Calcineurin imposes T cell unresponsiveness through targeted proteolysis of signaling proteins. *Nat Immunol* 5, 255-265.
31. **Hogan, P.G., Chen, L., Nardone, J. and Rao, A.** (2003). Transcriptional regulation by calcium, calcineurin and NFAT. *Genes Dev* 17: 2205 - 2232.
32. **Hoth, M., and Penner, R.** (1992). Depletion of intracellular calcium stores activates a calcium current in mast cells. *Nature* 355, 353-356.
33. **Hoth, M., and R. Penner.** (1993). Calcium release-activated calcium current in rat mast cells. *J Physiol.* 465:359-86.
34. **Hoth, M., Button, D.C. and Lewis, R.S.** (2000). Mitochondrial control of calcium-channel gating: a mechanism for sustained signalling and transcriptional activation in T lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 97, 10607 - 12.

35. **Hoth, M., Fanger, C. M., and Lewis, R. S.** (1997). Mitochondrial regulation of store-operated calcium signaling in T lymphocytes. *J Cell Biol* 137, 633-648.
36. **Huppa, J.B., and M.M. Davis.** (2003). T-cell-antigen recognition and the immunological synapse. *Nat Rev Immunol.* 3:973-83.
37. **Huser, J., Rechenmacher, C. and Blatter, L.** (1998). Imaging the permeability pore transition in single mitochondria. *Biophysical J* 74, 2129 - 2137.
38. **Jacobelli, J., Andres, P. G., Boisvert, J., and Krummel, M. F.** (2004). New views of the immunological synapse: variations in assembly and function. *Curr Opin Immunol* 16, 345-352.
39. **Janeway, C. A., Jr., Travers, P., Walport, M., and Shlomchik, M. J.** (2005). *Immunobiology, the immune system in health and disease*, Garland Science Publishing.
40. **Ji W, Xu P, Li Z, Lu J, Liu L, Zhan Y, Chen Y, Hille B, Xu T, Chen L.** (2008). Functional stoichiometry of the unitary calcium-release-activated calcium channel. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008 Sep 9;105(36):13668-73.
41. **Knowles, M. K., Guenza, M. G., Capaldi, R. A., and Marcus, A. H.** (2002). Cytoskeletal-assisted dynamics of the mitochondrial reticulum in living cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 14772-14777.
42. **Kotturi MF, Carlow DA, Lee JC, Ziltener HJ, Jefferies WA.** (2003). Identification and functional characterization of voltage-dependent calcium channels in T lymphocytes. *J Biol Chem.* 2003 Nov 21;278(47):46949-60.
43. **Le Deist, F., Hivroz, C., Partiseti, M., Thomas, C., Bue, H. A., Oleastro, M., Belohradsky, B., Choquet, D., and Fischer, A.** (1995). A primary T-cell immunodeficiency associated with defective transmembrane calcium influx. *Blood* 85, 1053-1062.
44. **Lee KH, Dinner AR, Tu C, Campi G, Raychaudhuri S, Varma R, Sims TN, Burack WR, Wu H, Wang J, Kanagawa O, Markiewicz M, Allen PM, Dustin ML, Chakraborty AK, Shaw AS.** (2003). The immunological synapse balances T cell receptor signaling and degradation. *Science.* 2003 Nov 14;302(5648):1218-22.
45. **Lewis, R. S.** (2001). Calcium signaling mechanisms in T lymphocytes. *Annu Rev Immunol* 19, 497-521.

46. **Liou, J., M.L. Kim, W. Do Heo, J.T. Jones, J.W. Myers, J.E. Ferrell, Jr., and T. Meyer.** (2005). STIM Is a Ca<sup>2+</sup> Sensor Essential for Ca<sup>2+</sup>-Store-Depletion-Triggered Ca<sup>2+</sup> Influx. *Curr Biol.* 15:1235-41.
47. **Lioudyno MI, Kozak JA, Penna A, Safrina O, Zhang SL, Sen D, Roos J, Stauderman KA, Cahalan MD.** (2008). Orai1 and STIM1 move to the immunological synapse and are up-regulated during T cell activation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008 Feb 12;105(6):2011-6.
48. **Lis A, Peinelt C, Beck A, Parvez S, Monteilh-Zoller M, Fleig A, Penner R.** (2007). CRACM1, CRACM2, and CRACM3 are store-operated Ca<sup>2+</sup> channels with distinct functional properties. *Curr Biol.* 17(9):794-800.
49. **Macian, F., Garcia-Cozar, F., Im, S. H., Horton, H. F., Byrne, M. C., and Rao, A.** (2002). Transcriptional mechanisms underlying lymphocyte tolerance. *Cell* 109, 719-731.
50. **Macian, F., Lopez-Rodriguez, C., and Rao, A.** (2001). Partners in transcription: NFAT and AP-1. *Oncogene* 20, 2476-2489.
51. **Maruyama T, Kanaji T, Nakade S, Kanno T, Mikoshiba K.** (1997). 2APB, 2-aminoethoxydiphenyl borate, a membrane-penetrable modulator of Ins(1,4,5)P<sub>3</sub>-induced Ca<sup>2+</sup> release. *J Biochem*, 122(3):498-505
52. **Mogami H, Nakano K, Tepikin AV, Petersen OH.** (1997). Ca<sup>2+</sup> flow via tunnels in polarized cells: recharging of apical Ca<sup>2+</sup> stores by focal Ca<sup>2+</sup> entry through basal membrane patch. *Cell.* 1997 Jan 10;88(1):49-55.
53. **Monks CR, Freiberg BA, Kupfer H, Sciaky N, Kupfer A.** (1998). Three-dimensional segregation of supramolecular activation clusters in T cells. *Nature.* 1998 Sep 3;395(6697):82-6.
54. **Morris, R.L. and Hollenbeck, P.J.** (1995). Axonal transport of mitochondria along microtubules and F-Aktin in living vertebrate neurons. *J Cell Biol* 131, 1315 - 26.
55. **Negulescu, P. A., Shastri, N., and Cahalan, M. D.** (1994). Intracellular calcium dependence of gene expression in single T lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 2873-2877.
56. **Oritani, K., and P.W. Kincade.** (1996). Identification of stromal cell products that interact with pre-B cells. *J Cell Biol.* 134:771-82.
57. **Parekh, A. B., and Putney, J. W., Jr.** (2005). Store-operated calcium channels. *Physiol Rev* 85, 757-810.

58. **Parekh, A. B.** (2008). Ca<sup>2+</sup> microdomains near plasma membrane Ca<sup>2+</sup> channels: impact on cell function. *J Physiol.* 2008 Jul 1;586(13):3043-54.
59. **Partiseti, M., Le Deist, F., Hivroz, C., Fischer, A., Korn, H., and Choquet, D.** (1994). The calcium current activated by T cell receptor and store depletion in human lymphocytes is absent in a primary immunodeficiency. *J Biol Chem* 269, 32327-32335.
60. **Peinelt C, Lis A, Beck A, Fleig A, Penner R.** (2008). 2-Aminoethoxydiphenyl borate directly facilitates and indirectly inhibits STIM1-dependent gating of CRAC channels. *J Physiol.* 2008 Jul 1;586(13):3061-73.
61. **Peinelt, C., M. Vig, D.L. Koomoa, A. Beck, M.J. Nadler, M. Koblan-Huberson, A. Lis, A. Fleig, R. Penner, and J.P. Kinet.** (2006). Amplification of CRAC current by STIM1 and CRACM1 (Orai1). *Nat Cell Biol.* 8:771-3.
62. **Peng, Y.Y.** (1998). Effects of mitochondrion on calcium transients at intact presynaptic terminals depend on frequency of nerve firing. *J. Neurophysiol.* 80, 186
63. **Penna A, Demuro A, Yeromin AV, Zhang SL, Safrina O, Parker I, Cahalan MD.** (2008). The CRAC channel consists of a tetramer formed by Stim-induced dimerization of Orai dimers. *Nature.* 2008 Nov 6;456(7218):116-20.
64. **Prakriya, M., and R.S. Lewis.** (2002). Separation and characterization of currents through store-operated CRAC channels and Mg<sup>2+</sup>-inhibited cation (MIC) channels. *J Gen Physiol.* 119:487-507.
65. **Prakriya, M., S. Feske, Y. Gwack, S. Srikanth, A. Rao, and P.G. Hogan.** (2006). Orai1 is an essential pore subunit of the CRAC channel. *Nature.*
66. **Putney, J. W., Jr.** (1990). Capacitative calcium entry revisited. *Cell Calcium* 11, 611-624.
67. **Qi SY, Groves JT, Chakraborty AK.** (2001). Synaptic pattern formation during cellular recognition. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001 Jun 5;98(12):6548-53.
68. **Quintana A, Kummerow C, Junker C, Becherer U, Hoth M.** (2008). Morphological changes of T cells following formation of the immunological synapse modulate intracellular calcium signals. *Cell Calcium.* 2008 Sep 11. [Epub ahead of print]

69. **Quintana A, Kummerow C, Junker C, Becherer U, Hoth M.** (2008). Morphological changes of T cells following formation of the immunological synapse modulate intracellular calcium signals. *Cell Calcium*. 2008 Sep 11. [Epub ahead of print]
70. **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.
71. **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. *PNAS*, 104(39):15171-2.
72. **Rao, A., Luo, C. and Hogan, P.G.** (1997). Transcription factors of the NFAT family: regulation and function. *Annu Rev Immunol* 15, 707 - 747.
73. **Rizzuto, R., Bernardi, P. and Pozzan, T.** (2000). Mitochondria as all-round players of the calcium game. *J Physiol* 529, 37 - 47.
74. **Rizzuto, R., Brini, M., Murgia, M. and Pozzan, T.** (1993). Microdomains with high  $\text{Ca}^{2+}$  close to  $\text{IP}_3$ -sensitive channels that are sensed by neighboring mitochondria. *Science* 262, 744 - 7.
75. **Roos, J., P.J. Digregorio, A.V. Yeromin, K. Ohlsen, M. Liudyno, S. Zhang, O. Safrina, J.A. Kozak, S.L. Wagner, M.D. Cahalan, G. Velicelebi, and K.A. Stauderman.** (2005). STIM1, an essential and conserved component of store-operated  $\text{Ca}^{2+}$  channel function. *J Cell Biol.* 169:435-45.
76. **Saotome M, Safiulina D, Szabadkai G, Das S, Fransson A, Aspenstrom P, Rizzuto R, Hajnóczky G.** (2008). Bidirectional  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent control of mitochondrial dynamics by the Miro GTPase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008 Dec 30;105(52):20728-33. Epub 2008 Dec 19.
77. **Schwarz A, Tutsch E, Ludwig B, Schwarz EC, Stallmach A, Hoth M** (2004).  $\text{Ca}^{2+}$  signaling in identified T-lymphocytes from human intestinal mucosa. Relation to hyporeactivity, proliferation, and inflammatory bowel disease. *J Biol Chem* 279, 5641 - 5647.
78. **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.* 2007 Oct;37(10):2723-33.
79. **Soboloff, J., M.A. Spassova, X.D. Tang, T. Hewavitharana, W. Xu, and D.L. Gill.** (2006b). Orai1 and STIM Reconstitute Store-operated Calcium Channel Function. *J Biol Chem.* 281:20661-5.

80. **Summerhayes, I.C., Wong, D. and Chen, L.B.** (1983). Effect of microtubules and intermediate filaments on mitochondrial distribution. *J Cell Sci* 61, 87 - 105.
81. **Turner H, Fleig A, Stokes A, Kinet JP, Penner R.** (2003). Discrimination of intracellular calcium store subcompartments using TRPV1 (transient receptor potential channel, vanilloid subfamily member 1) release channel activity. *Biochem J.* 2003 Apr 15;371(Pt 2):341-50.
82. **Ullman, K. S., Northrop, J. P., Verweij, C. L., and Crabtree, G. R.** (1990). Transmission of signals from the T lymphocyte antigen receptor to the genes responsible for cell proliferation and immune function: the missing link. *Annu Rev Immunol* 8, 421-452.
83. **Vale, R. D.** (2003). The molecular motor toolbox for intracellular transport. *Cell* 112, 467-480.
84. **Varadi, A., Johnson-Cadwell, L., Cirulli, V., Yoon, Y., Allan, V. and Rutter, G.** (2004). Cytoplasmic dynein regulates the subcellular distribution of mitochondria by controlling the recruitment of the fission factor dynamin-related protein-1. *J. of Cell Science* 117, 4389 - 4400
85. **Vig, M., A. Beck, J.M. Billingsley, A. Lis, S. Parvez, C. Peinelt, D.L. Koomoa, J. Soboloff, D.L. Gill, A. Fleig, J.P. Kinet, and R. Penner.** (2006a). CRACM1 multimers form the ion-selective pore of the CRAC channel. *Curr Biol.* 16:2073-9.
86. **Vig, M., C. Peinelt, A. Beck, D.L. Koomoa, D. Rabah, M. Koblan-Huberson, S. Kraft, H. Turner, A. Fleig, R. Penner, and J.P. Kinet.** (2006b). CRACM1 is a plasma membrane protein essential for store-operated Ca<sup>2+</sup> entry. *Science.* 312:1220-3.
87. **Wang X, Schwarz TL.** (2009). The mechanism of Ca<sup>2+</sup> -dependent regulation of kinesin-mediated mitochondrial motility. *Cell.* 2009 Jan 9;136(1):163-74.
88. **Winslow MM, Crabtree GR.** (2005). Immunology. Decoding calcium signaling. *Science.* 2005 Jan 7;307(5706):56-7.
89. **Wu, M.M., J. Buchanan, R.M. Luik, and R.S. Lewis.** (2006). Ca<sup>2+</sup> store depletion causes STIM1 to accumulate in ER regions closely associated with the plasma membrane. *J Cell Biol.* 174:803-13.
90. **Yaffe, M.P.** (2003). The cutting edge of mitochondrial fusion. *Nat Cell Biol* 5, 497 - 9.

91. **Yeromin, A.V., S.L. Zhang, W. Jiang, Y. Yu, O. Safrina, and M.D. Cahalan.** (2006). Molecular identification of the CRAC channel by altered ion selectivity in a mutant of Orai. *Nature*.
92. **Yi, M., Weaver, D. and Hajnocy, G.** (2004). Control of mitochondrial motility and distribution by the calcium signal: a homeostatic circuit. *J Cell Biol* 167, 661 - 72.
93. **Yoon, Y.** (2005). Regulation of mitochondrial dynamics: another process modulated by Ca<sup>2+</sup> signals? *Sci STKE* 2005, pe18.
94. **Zhang, S.L., A.V. Yeromin, X.H. Zhang, Y. Yu, O. Safrina, A. Penna, J. Roos, K.A. Stauderman, and M.D. Cahalan.** (2006). Genome-wide RNAi screen of Ca(2+) influx identifies genes that regulate Ca(2+) release-activated Ca(2+) channel activity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 103:9357-62.
95. **Zitt C, Strauss B, Schwarz EC, Spaeth N, Rast G, Hatzelmann A, Hoth M.** (2004). Potent inhibition of Ca<sup>2+</sup> release-activated Ca<sup>2+</sup> channels and T-lymphocyte activation by the pyrazole derivative BTP-2. *J Biol Chem*, 279(13):12427-37
96. **Zweifach, A., and R.S. Lewis.** (1993). Mitogen-regulated Ca<sup>2+</sup> current of T lymphocytes is activated by depletion of intracellular Ca<sup>2+</sup> stores. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 90:6295-9.
97. **Zweifach, A., and R.S. Lewis.** (1995). Slow calcium-dependent inactivation of depletion-activated calcium current. Store-dependent and -independent mechanisms. *J Biol Chem.* 1995 Jun 16;270(24):14445-51.

## 8.2 Danksagung

Herrn Prof. Dr. Hoth danke ich herzlich für die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe, die Bereitstellung des interessanten Themas, die Übernahme des Erstgutachtens und für die Möglichkeiten, die sich mir durch die Mitarbeit in diesem Labor aufgetan haben. Es war eine ausgezeichnete Zeit.

Herrn Prof. Dr. Zimmermann danke ich für die freundliche Übernahme des Zweitgutachtens.

Danken möchte ich auch allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Hoth für das freundliche Arbeitsklima und die stetige Hilfsbereitschaft, die mir zuteil wurde. Besonders danken möchte ich folgenden Personen: Ariel Quintana für die ausführliche Beantwortung meiner Fragen und die sehr produktive Zusammenarbeit; Eva Schwarz, Bettina Strauß und Anja Ludes für die optimale Kultivierung der Zellen und die Ordnung im Labor; Ute Legler und Regine Kaleja für die Erledigung organisatorischer Angelegenheiten; Jun.Prof. Dr. Christine Peinelt fürs zügige Korrekturlesen.

Ein besonderer Dank gilt auch den Mitarbeitern des „Krisenstabs“ (ehem. „Geschäftsführung“), Dr. Ivan Bogeski und Carsten Kummerow für die vielen Stunden des herzlichen Lachens.

Weiterhin möchte ich dem Graduiertenkolleg 845 „Molekulare, physiologische und pharmakologische Analyse von zellulärem Membrantransport“ für die Förderung und Ermöglichung von Dienstreisen und all meinen graduierten Kollegen danken. Insbesondere Frau Dr. Gabriele Amoroso gilt besonderer Dank für die Regelung sämtlicher Angelegenheiten und perfekter Organisation des GK 845.

Nicht zu vergessen sind meine Kollegen aus dem sonnigen Hawaii der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Andrea Fleig und Prof. Dr. Reinhold Penner. Mahalo. Hier möchte ich mich wieder ganz besonders bei Dr. Annette Lis, Markus Thiel und Dr. Andreas Beck für die schöne Zeit auf Oahu und Big Island bedanken. Aloha!

Danken möchte ich auch Familie Bannweg, die mir beim Korrekturlesen dieser Arbeit sehr geholfen hat (die neue deutsche Rechtschreibung...).

Zum Schluss danke ich ganz besonders meinen Eltern und Großeltern ohne deren Hilfe, Unterstützung und Erziehung ich nie so weit gekommen wäre.

Und ganz zum Schluss danke ich meiner Freundin Annemarie einfach für alles...

### 8.3 Unbedenklichkeitserklärung der Ethikkommission

In dieser Arbeit wurden Leukozyten-Reduktions-Filter von Vollblutspendern zur Aufreinigung der T-Zellen weiterverwendet. Dieses Vorgehen wurde von der Ethikkommission begutachtet und gestattet (Unbedenklichkeitserklärung vom 05.04.2005, Kenn-Nummer: Prof. Schie/Gn, Projektfinanzierung durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft (SFB 530, Projekt A3)).

### 8.4 Eidesstattliche Erklärung

Erklärung gemäß § 7 Abs. 1 Nr. 4:

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet.

Weitere Personen waren an der inhaltlich-materiellen Erstellung der vorliegenden Arbeit nicht beteiligt. Insbesondere habe ich nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- bzw. Beratungsdiensten (Promotionsberater/innen oder anderer Personen) in Anspruch genommen. Außer den Angegebenen hat niemand von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.

Die Arbeit wurde bisher weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form in einem anderen Verfahren zur Erlangung des Doktorgrades einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Ich versichere an Eides statt, dass ich nach bestem Wissen die Wahrheit gesagt und nichts verschwiegen habe.

Vor Aufnahme der vorstehenden Versicherung an Eides Statt wurde ich über die Bedeutung einer eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unrichtigen oder unvollständigen eidesstattlichen Versicherung belehrt.

Homburg, im Januar 2009

## 8.5 Lebenslauf

### Christian Schwindling

#### Persönliche Daten:

Anschrift:  
Oberwies 29  
66346 Püttlingen  
Deutschland  
E-Mail: christian.schwindling@web.de  
Geburtstag: 21.02.1978  
Geburtsort: Völklingen  
Nationalität: deutsch

#### Schulbildung und Zivildienst:

- 08/1988 - 06/1998  
Realgymnasium Völklingen (heute: Albert Einstein Gymnasium),  
Abitur (Leistungsfächer: Biologie, Englisch, Erdkunde)
- 09/1998 - 10/1999  
Zivildienst, Malteser gGmbH, Rettungswache Saarbrücken (Ausbildung  
zum Rettungssanitäter)

#### Universitäre Ausbildung:

- 10/2000 - 01/2006  
Studium der Human- und Molekularbiologie, Universität des Saarlan-  
des, Saarbrücken
- 05/2005 - 01/2006  
Diplomarbeit, Titel: Analyse der Lokalisation von Mitochondrien in  
T-Zellen nach Stimulation mit Hilfe der Zwei-Photonen-Mikroskopie,  
Universitätskliniken des Saarlandes, Physiologisches Institut, Homburg
- 01/2006  
Diplom (Human- und Molekularbiologie; Note: 1,3)
  - Hauptfach: Physiologie
  - Nebenfächer: Pharmakologie und Toxikologie, Immunologie und Viro-  
logie

**Promotion:**

- 04/2006 - voraussichtlich 01/2009  
Promotion im Fachbereich Biophysik, Titel: Mitochondrienlokalisierung und Kalziumsignale nach Bildung der Immunologischen Synapse, Universitätskliniken des Saarlandes, Institut für Biophysik, Homburg

**Stipendien und Preise:**

- 04/2006 - 04/2009  
Stipendiat des Graduierten-Kollegs 845, gefördert von der Deutschen Forschungsgemeinschaft
- 03/2006  
Poster of the Day - Preis der Deutschen Physiologischen Gesellschaft, München

**Weitere Tätigkeiten:**

- 11/1999 - 04/2000  
Sachbearbeiter im Bereich Qualitätsmanagement, Firma Michels GmbH (Branche: Automobilzulieferer)
- 02/2006 - 04/2006  
wissenschaftliche Hilfskraft, Universitätskliniken des Saarlandes, Physiologisches Institut, Homburg
- 02/2008 - 04/2008  
Forschungsaufenthalt, Thematik: CRAC, TRPV1 and TRPA1 in INS-1 cells; John A. Burns School of Medicine, Queens Medical Center, Honolulu, HI, USA

**Sprachkenntnisse:**

- Deutsch (Muttersprache)
- Englisch (fließend)
- Französisch (Grundkenntnisse)

**EDV-Kenntnisse:**

- Betriebssysteme:  
Windows 3.1 - XP, Mac OsX
- Software:  
Microsoft Office, Corel Draw, Photoshop, LaTeX, Wavemetrics Igor Pro, Grundkenntnisse Netzwerkadministration

**Interessen und Engagements:**

- Sport:  
Mountainbiking, Snowboarding
- Kunst:  
Fotografie (HDR- und Makrofotografie)
- Universität:  
Stellvertretender Kollegiatensprecher des Graduierten-Kollegs 845 (05/2007 - 05/2008)
- Ehrenamtliche Tätigkeit:  
Rettungssanitäter im öffentlichen Rettungsdienst (Malteser Hilfsdienst gGmbH und Deutsches Rotes Kreuz; 11/1999 - 11/2004)

**Anhang CV**, Christian Schwindling, geb. am 21.02.1978 in Völklingen

**Publikationen:**

• Literatur

- Quintana A., Schwarz E.C., **Schwindling C.**, Lipp P., Kaestner L., Hoth M.; Sustained activity of calcium release-activated calcium channels requires translocation of mitochondria to the plasma membrane; J Biol Chem. 2006
- Quintana A., **Schwindling C.**, Wenning A.S., Becherer U., Rettig J., Schwarz E.C., Hoth M.; T cell activation requires mitochondrial translocation to the immunological synapse; Proc Natl Acad Sci USA. 2007
- **Schwindling C.**, Quintana A., Hoth M.; Mitochondria positioning controls local Ca<sup>2+</sup> influx in T cells; in preparation

• Vorträge

- CRAC, TRPV1 and TRPA1 in INS-1 cells; The Queens Medical Center, Honolulu; HI, USA; April 2008
- Calcium transport across plasma- and mitochondrial membranes of T cells; The Queens Medical Center, Honolulu; HI, USA; März 2008
- T cells activation requires mitochondrial translocation towards the immunological synapse; Vortrag und Poster-Präsentation, 94th Meeting of The American Association of Immunologists, Miami Beach, FL, USA; Mai 2007
- Calcium transport across plasma- and mitochondrial membranes of T cells; DFG Begutachtung des Graduiertenkolleg 845; Technische Universität Kaiserslautern, Deutschland; März 2007
- Mitochondrial control of plasma membrane calcium influx in T cells; Kolloquium des Graduiertenkolleg 845; Kaiserslautern, Deutschland; September 2006
- Efficient T-cell activation requires kinesin/dynein-dependent mitochondrial translocation to the plasma membrane, Poster-Präsentation, Joint meeting of the German Physiologic Society and the federation of European Physiologic Societies, München, Deutschland; März 2006

Homburg, im Januar 2009