

Aus der Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie  
der Universität Würzburg  
Direktorin: Professor Dr. med. E.-B. Bröcker

**Antigenpräsentation zwischen naiven CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten und  
dendritischen Zellen: Interaktionsdynamik und Kalzium-  
Signalgebung in 3D Kollagenmatrices und  
multizellulären Aggregaten**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung der Doktorwürde der  
Medizinischen Fakultät  
der  
Bayerischen Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg

vorgelegt von

Martin Kretschmar  
aus Basel

Würzburg, 2005

Referent: Prof. Dr. Ph.D. (CDN) P. Friedl  
Korreferent: Prof. Dr. J. Schneider-Schaulies  
Dekan: Prof. Dr. G. Ertl

Tag der mündlichen Prüfung: 27.07.2006

Der Promovend ist Arzt

*meinen Eltern  
und Regina*

## **Inhaltsverzeichnis**

### **Abkürzungen**

#### **1. Einleitung**

1.1.	Antigenpräsentation und T-Zell-Aktivierung	1
1.2.	Zelluläre Mechanismen der Antigenpräsentation	3
1.2.1.	Stabile Zell-Zell-Interaktion	3
1.2.2.	Dynamische Zell-Zell-Interaktion	4
1.3.	Bedeutung des Mikromilieus für die Dynamik während der Antigenpräsentation	4
1.4.	Ziel der Untersuchung	5

#### **2. Material und Methoden**

2.1.	Material	7
2.1.1.	Zellkultur	7
2.1.2.	Zellisolation	7
2.1.3.	Mausmodell	8
2.1.4.	Färbung	8
2.1.5.	Geräte	8
2.1.6.	Beobachtungskammer	8
2.1.7.	Programme	9
2.2.	Methoden	9
2.2.1.	Zellgewinnung und Kultur	9
2.2.1.1.	Isolation muriner CD4 <sup>+</sup> T-Zellen	9
2.2.1.2.	Generierung dendritischer Zellen aus murinen Knochenmarkszellen	12
2.2.2.	Zellfärbung	13
2.2.2.1.	Inkubation der T-Zellen mit Fluo-3	13
2.2.2.2.	Zytoplasmatische Färbung dendritischer Zellen mit Cell Tracker Orange	13
2.2.3.	Generierung multizellulärer Aggregate (Cluster)	14
2.2.4.	Beobachtungskammer	14
2.2.5.	Konfokalmikroskopie und Videodokumentation	15
2.2.6.	Digitale Auswertung von Bildsequenzen	15
2.2.6.1.	Auswertung der Zelldynamik	15
2.2.6.2.	Auswertung des Kalziumsignals	16

<b>3.</b>	<b>Ergebnisse</b>	
3.1.	Hochaufgelöste Darstellung des $\text{Ca}^{2+}$ -Signals in Kollagenmatrix und Flüssigkultur	18
3.1.1.	$\text{Ca}^{2+}$ -Signal während der T-Zell-DC-Interaktion in der Kollagenmatrix	18
3.1.1.1.	Initiale Kontaktaufnahme	18
3.1.1.2.	Signalverhalten während der Kontaktphase	19
3.1.1.3.	$\text{Ca}^{2+}$ -Signal während der Ablösephase	19
3.2.	Morphodynamik und $\text{Ca}^{2+}$ -Signal während der T-Zell-DC-Interaktion im multizellulären Cluster	20
3.2.1.	$\text{Ca}^{2+}$ -Signalverhalten im T/DC-Zellcluster	20
3.2.2.	Rekonstruktion statischer und dynamischer Interaktionen in T/DC-Zellclustern	20
3.2.3.	Die Morphologie der wandernden T-Zelle im Cluster ist polar	22
3.3.	Sequenzielle, simultane und repetitive Kontakte dynamischer Interaktionen zwischen T-Zellen und DC in Zellclustern	23
	a) Serielle Kontakte	23
	b) Simultane Kontakte	23
<b>4.</b>	<b>Diskussion</b>	
4.1.	Produktive $\text{Ca}^{2+}$ -Signalgebung während statischer und dynamischer Kontakte	24
4.2.	Diversität der Kontaktdynamik in Kollagen/ECM-freien Zellclustern	27
4.3.	Bestätigung des seriellen Kontaktmodells für ECM-freie Cluster	28
4.4.	Ausblick: Darstellung der LK Matrixsituation in vivo mit Multiphotonenmikroskopie	29
<b>5.</b>	<b>Zusammenfassung</b>	31
<b>6.</b>	<b>Literatur</b>	32
<b>7.</b>	<b>Abbildungsverzeichnis</b>	35
<b>8.</b>	<b>Filmverzeichnis</b>	36
<b>9.</b>	<b>Anhang</b>	
	Danksagung	
	Lebenslauf	
	Erklärung	

## Abkürzungen

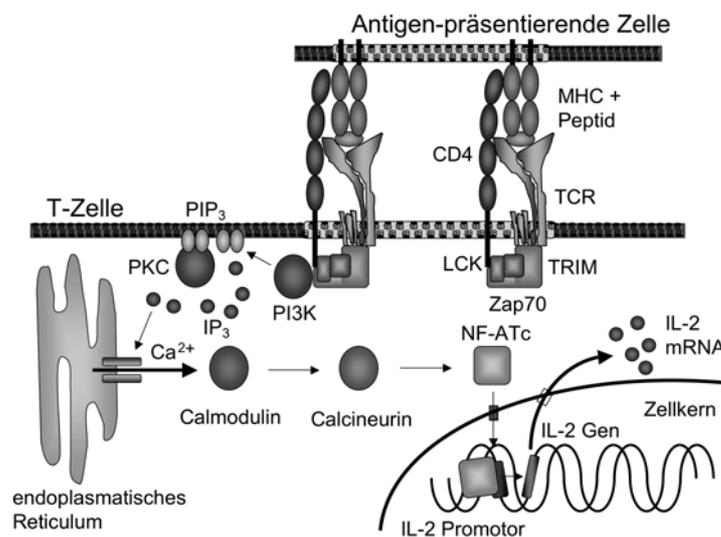
APC	Antigen präsentierende Zelle
BMDC	Bone marrow derived dendritic cells
CTLA	Cytotoxic T-lymphocyte antigen
DAG	Diacylglycerol
DC	Dendritic cell
ECM	Extracellular matrix
FCS	Fetal calf serum
GMCSF	Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor
HSA	Human serum albumin
ICAM	Intracellular adhesion molecule
IL	Interleukin
IP <sub>3</sub>	Inositoltriphosphat
LAT	Linker for activation of T-cells
LFA	Lymphozytenfunktionsantigen
LPS	Lipopolysaccharid
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MHC	Major histocompatibility complex
NEAA	Non-essential amino acids
NF-Atc	Nuclear factor of activated T-cell
PBS	Phosphate buffered saline
PI3K	Phosphoinositol-3-Kinase
PKC	Proteinkinase C
TCR	T-cell receptor
TRIM	T-cell receptor interacting molecule
ZAP-70	Zeta associated Protein

## 1. Einleitung

### 1.1. Antigenpräsentation und T-Zell-Aktivierung

Die Regulation zellulärer und humoraler Immunität erfordert die Aktivierung von T-Lymphozyten durch Antigen-präsentierende Zellen (APC). Voraussetzung für eine erfolgreiche T-Zell-Aktivierung ist der direkte physische Kontakt zwischen Lymphozyt und APC, z. B. dendritischen Zellen (DC) oder B-Zellen.

Kommt es während eines solchen Kontaktes zu einer ausreichend starken Bindung zwischen dem Antigen tragenden *major histocompatibility complex-II* (MHC II Rezeptor) der präsentierenden Zelle und dem für dieses Antigen spezifischen Rezeptor der T-Zelle, so wird dies als Erkennung des Antigens bezeichnet. Als Folge dieser spezifischen Rezeptorbindung wird die T-Zelle über einen gut bekannten Signaltransduktionsprozess zur DNA-Synthese und schließlich zur Teilung und damit zur klonalen Expansion angeregt (Abb.1).



**Abb. 1:** T-Zell-Aktivierung: Signaltransduktion

Der Signalaustausch zwischen  $CD4^+$  T-Zelle und APC erfolgt über die Bindung von Oberflächenrezeptoren beider Zellen. Dabei bindet der T-Zellrezeptor (TCR)-CD3 Komplex spezifisch an den Peptid-MHC II-Komplex der APC.

Durch Translokation von CD45 und Bindung an noch nicht vollständig identifizierte Liganden auf der APC sowie Bindung des Korezeptors CD4 an MHC II oder CD8 und MHC I Moleküle kommt es zur Aktivierung der Tyrosinkinasen Lck und Fyn im Zytoplasma der T-Zelle, die ihrerseits das *T-cell receptor interacting molecule* (TRIM) sowie den *linker for activation of T cells* (LAT), beides multifunktionale Adapterproteine, und die Tyrosinkinase Zap-70 rekrutieren und durch Phosphorylierung aktivieren.

Zap-70 kann nun das Transduktionssignal auf drei Wegen weiter geben:

1. Aktivierung der Phosphoinositol-3-Kinase (PI3K): Dies führt über die Synthese von Inositoltriphosphat ( $IP_3$ ) zur Aktivierung von Kalziumkanälen im sarkoplasmatischen Retikulum, sodass von dort  $Ca^{2+}$ -Ionen ins Zytoplasma übertreten. Über die Aktivierung der  $Ca^{2+}$ -sensitiven Enzyme Calmodulin, Calcineurin sowie der Transposition des Transkriptionsfaktors NF-ATc vom Zytosol in den Zellkern folgt schließlich die Transkription von IL-2 und weiteren Zytokinen und Transkriptionsfaktoren.
2. Promotoraktivierung von Mitosegenen, die durch Translokation von promotorbindenden Proteinen, z.B. NF-AT, in den Zellkern vermittelt wird. Die Transposition von NF- $\kappa$ B in den Nukleus wird durch Diacylglycerol (DAG) über die Aktivierung der Protein-Kinase C (PKC) induziert.
3. Aktivierung des G-Proteins Ras, das durch Aktivierung der *mitogen activated protein kinase* (MAPK)-Kaskade seinerseits zur Transkription von proliferationsfördernden Genen wie IL-2 und IL-2R führt.

Die zentrale Rolle des  $IP_3$ -  $Ca^{2+}$ -Weges, der allein zur T-Zell-Proliferation führen kann, wurde für unterschiedliche T-Zell-Populationen und verschiedene Stimuli z.B. TCR-Signale, mitogene Lektine und anti-TCR-AK belegt (Imboden et al., 1985; Jayaraman et al., 1995). Der Anstieg der zytosolischen  $Ca^{2+}$ -Konzentration ist ein eindeutiges und gut detektierbares frühes Anregungssignal, das innerhalb von Sekunden nach Rezeptorbindung mittels Fluoreszenzfarbstoffen nachweisbar ist. Im Rahmen dieser Arbeit weisen wir diesen Signalweg mittels Fluo-3 nach, um das intrazelluläre Aktivierungssignal der T-Zellen während der Interaktion zwischen T-Zelle und APC darzustellen. Für die physiologische Stimulation ruhender naiver T-Zellen ist neben dem TCR abhängigen Signalweg die Bindung von weiteren Rezeptoren wie CD28 (aktivierend) oder CTLA4 (regulierend) an die DC-ständigen B7-Moleküle als kostimulatorisches Signal („Signal 2“) nötig.

## 1.2. Zelluläre Mechanismen der Antigenpräsentation

Die Antigenpräsentation ist ein komplexer Vorgang, bei dem sowohl biochemische Mechanismen wie Rezeptor-Ligand-Interaktionen als auch physikalische Mechanismen wie etwa der Aufbau des Zell-Zell-Kontaktes ineinander greifen. Zur Gestalt dieser physikalischen Interaktion zwischen T-Zelle und APC und zu ihrer Funktion während des Signalaustausches gibt es verschiedene Modelle:

### 1.2.1. Stabile Zell-Zell-Interaktion

Die Interaktion zwischen  $CD4^+$  T-Zellen und B-Zellen als APC in Flüssigkultur sowie zwischen T-Zellen und planaren Bilayern (Grakoui et al., 1999) führt zur temporären Ausbildung einer stabilen statischen Bindung zwischen Antigen präsentierenden Zellen und Lymphozyten (Dustin, et al., 2001). Sie wird als Voraussetzung für eine suffiziente Aktivierung des Lymphozyten gesehen. Dabei führt der Kontakt mit der APC über die spezifische Bindung zu einem „Stoppsignal“ für die T-Zelle (Dustin et al., 1997), d.h. zu einer schnellen Steigerung Integrin (LFA-1)-vermittelter Adhäsion und migratorischem Arrest der T-Zelle, sodass die T-Zelle ihre Wanderung einstellt und sich kontaktspezifisch polarisiert. Diese Polarisierung führt morphologisch zu einer Abrundung des kontaktfernen Kompartimentes der T-Zelle und zur Ausbildung einer plattenartigen Kontaktfläche zwischen beiden Zellen, die auch „immunologische Synapse“ genannt wird. Diese Synapse wird durch Interaktion von Adhäsionsmolekülen wie ICAM-1 mit LFA-1 stabilisiert und kompartimentiert. In einer frühen Phase, ca. 1 bis 5 Minuten nach Kontaktaufnahme, akkumulieren innerhalb der Kontaktzone TCR-MHC-Komplexe um zentral gelegene ICAM-1/LFA-1 Komplexe, während sich in der späteren maturen Synapse nach 5 – 30 min ein Ring von Adhäsionsmolekülen um zentral gelegene TCR-MHC-Komplexe formiert. Diese spezielle molekulare Anordnung innerhalb der Synapse könnte über strukturelle Mikrocluster von Zytoskelett und intrazellulären Signalmolekülen zu einer für den Aufbau verschiedener Signalwege nötigen Kompartimentierung führen (van der Merwe, 2000). Dustin postuliert für eine suffiziente Aktivierung von T-Zellen eine Kontaktdauer von mindestens 2 Stunden (Dustin, 2003), deren Erreichen durch adhäsive Kontaktstabilisierung begünstigt wird.

### 1.2.2. Dynamische Zell-Zell-Interaktion:

Arbeiten von Friedl et al. mit Zellen in 3D-Kollagenmatrix aber auch jüngere Daten am intakten explantierten Lymphknoten (Miller et al., 2004; Mempel et al., 2004) bzw. Thymuskulturen (Bouso et al., 2002) zeigen dynamische Kontakte zwischen APC und CD4<sup>+</sup> oder CD 8<sup>+</sup> T-Zellen bzw. Thymozyten. Diese dynamischen Kontakte sind im Wesentlichen durch eine kurze Kontaktzeit, eine aktive Wanderung der T-Zelle auf der APC (*scanning*), und der Fähigkeit der T-Zelle, sich aktiv von der DC loszulösen, charakterisiert. Während allen Phasen des dynamischen Kontaktes behält die T-Zelle ihre polare Gestalt (Gunzer et al., 2000). Ein Stoppmechanismus nach Kontaktetablierung - wie bei T-Zellkontakten auf planaren Bilayern beschrieben - wurde in der Frühphase der Interaktionen nicht beobachtet. In 3D-Kollagenkulturen wurden kurzlebige Kalziumströme in T-Zellen als Zeichen ihrer Aktivierung und konsekutive T-Zellproliferation nachgewiesen (Gunzer et al., 2000). Dynamische Kontakte führen nach wenigen Minuten zu rascher Lösung der Interaktion und Ausbildung weiterer Interaktionen mit benachbarten APC (Gunzer et al., 2000). Infolge der Beobachtung serieller Kontakte einer T-Zelle zu verschiedenen DC in kurzer Abfolge wurde die Akkumulation einer Sequenz mehrerer kurzer Aktivierungssignale postuliert, die durch multiple Kontakte zu verschiedenen DC vermittelt wird („serielles Kontaktmodell“ (Friedl und Gunzer, 2001). Jüngste in vivo Befunde am intakten Lymphknoten bestätigen dies für die ersten Stunden der Aktivierung naiver T-Zellen (Mempel et al., 2004; Miller et al., 2004).

### 1.3. Bedeutung des Mikromilieus für die Dynamik während der Antigenpräsentation

Wie lässt sich die beobachtete unterschiedliche Morphodynamik der Antigenpräsentation erklären?

Für die Integration von Zellform und Bewegung bzw. Adhäsion („Morphodynamik“) während der Antigenpräsentation ist das migratorische bzw. adhäsive Verhalten der T-Zelle maßgeblich. Sie trägt mit ihren Bewegungen wesentlich zum Kontaktaufbau und zur Kontaktbeendigung bei; ebenso führt ihre Migration auf der DC zur Dynamik der eigentlichen Antigenpräsentation.

Dabei ist das migratorische Verhalten von T-Zellen variabel und hängt wahrscheinlich von verschiedenen Faktoren des Mikromilieus ab. Dazu zählen chemische Substanzen mit

promigratorischer Wirkung aber auch physikalische Faktoren, wie Adhäsionskräfte zwischen T-Zelle und Umgebung, Temperatur oder räumlich komplexe Strukturen wie das umgebende Geflecht extrazellulärer Matrix oder zellulärer Strukturen.

Während stabile und langlebige Kontakte überwiegend aus der Interaktion zwischen T-Zellen mit 2D planaren Bilayern oder B-Zellen als APC resultieren, finden dynamische und kurzlebige Kontakte in 3D-Kollagenfasergeflechten (Gunzer et al., 2000; 2004) oder intaktem lymphatischem Gewebe in vivo statt (Mempel et al., 2004). Offenbar benutzen T-Zellen 3D-Gewebestrukturen als promigratorisches Gerüst, das auch während der T-Zell-APC Interaktion physikalisch mit der abgewandten T-Zell-Region in Verbindung bleibt. So ist es möglich, dass die T-Zellen auch während der Antigenpräsentation mit einer DC die umgebenden Fasern nutzen, um die Adhäsivkräfte zur DC zu überwinden und sich entweder auf der DC fortzubewegen oder sich von ihr zu lösen. Neben dieser Gerüstfunktion löst die umgebende Bindegewebsstruktur wahrscheinlich auch über Interaktion mit membranständigen  $\beta 1$ -Integrinen der T-Zellen kostimulierende Signale aus (Shimizu et al, 1990).

Unklar ist jedoch, welchen relativen Beitrag Gerüst- und Signalfunktion der ECM zu den dynamischen Interaktionen leisten. Nicht bekannt ist auch, ob andere 3D-Gewebestrukturen, die wenig oder keine ECM enthalten wie z.B. zellreiche Zonen des Lymphknotens, ähnliche promigratorische Effekte auf T-Zell-APC Interaktionen ausüben.

#### **1.4. Ziel der Untersuchung**

In dieser Arbeit war zu klären, ob, wie von Dustin vorgeschlagen (Dustin et al., 2001), dynamische und serielle Kontakte als Folge der Besonderheiten von 3D-Kollagenmatrices resultieren. Alternativ könnten allein 3D-Umgebungsbedingungen eine ausreichende promigratorische Struktur liefern, die selbst in Abwesenheit von ECM die Kontaktdynamik moduliert.

Um zu klären, ob das 3D-Kollagenmodell durch ein anderes 3D-Mikromilieu ersetzt werden kann, sollte unter 2D Kulturbedingungen - d.h. Flüssigkultur auf flachen Objektträgern - ein konfokalmikroskopisches 3D-Modell zur Beobachtung individueller Interaktionen zwischen T-Zellen und dendritischen Zellen in multizellulären Clustern etabliert werden. Zellcluster sind räumlich komplex strukturierte Zellaggregate, die sich in vitro in Flüssigkultur spontan innerhalb von Minuten bilden, wenn T-Zellen und mit spezifischem Antigen gepulste DC in

Kokultur gegeben werden (Inaba, et al., 1984). Neben der Zellform und Dynamik sollten zeitgleich - über Detektion des Kalziumsignals - produktive von nicht produktiven Kontakten unterschieden werden. Damit sollte geklärt werden, ob ECM freie Bedingungen in 3D-Zellclustern ähnliche Gerüstfunktionen für die Kontaktmorphologie wie die 3D-Kollagenmatix liefern.

## 2. Material und Methoden

### 2.1. Material

#### 2.1.1. Zellkultur

PBS	PAN Biotech GmbH, Aidenbach, D
RPMI 1640 + Glutamin	PAN Biotech GmbH, Aidenbach, D
FCS	PAN Biotech GmbH, Aidenbach, D
Penicillin/Streptomycin	PAN Biotech GmbH, Aidenbach, D
NEAA MEM x100	PAA Laboratories , Linz, AUT
Natriumpyruvat	Seromed, Berlin, D
Hepes Puffer 1M	Roche Diagnostics, Mannheim, D
$\beta$ -Mercaptoethanol	Sigma, Taufkirchen, D
Gentamycin	PAA Laboratories GmbH, Linz, AUT
IL4	Überstände aus NIH 3T3 Fibroblasten
GMCSF	Überstände aus NIH 3T3 Fibroblasten
Ova Peptid	MWG Biotech AG, Ebersberg, D
LPS	Sigma, Taufkirchen, D

#### 2.1.2. Zellisolation

Nylonwolle	Cat# 18369 Polysciences
Zellsieb	Falcon 2360
B Zell Säule Collect™ Mouse T	Cytovax Biotechnologies, Edmonton, Kanada
Biomag-Beads	Qiagen
Depletionsmagnet	Miltenyi
AK Anti CD8	BD Biosciences, Pharmingen, NJ, USA
AK Anti 45R	BD Biosciences, Pharmingen, NJ, USA
AK Anti 11b	BD Biosciences, Pharmingen, NJ, USA
AK Anti 16	BD Biosciences, Pharmingen, NJ, USA

AK Anti 32	BD Biosciences, Pharmingen, NJ, USA
AK Anti Ly6G	BD Biosciences, Pharmingen, NJ, USA
Albumin 20 (Humanes Serumalbumin, HAS)	Bayerisches Rotes Kreuz

### 2.1.3. Mausmodell

DO 11.10 (Murphy, 1990)
BALB/c

### 2.1.4. Färbung

Fluo-3 AM	Molecular Probes Europe BV Leiden, NL
Cell Tracker Orange	Molecular Probes Europe BV Leiden, NL

### 2.1.5. Geräte

Konfokalmikroskop TCS SP 2	Leica Microsystems Heidelberg, D
Durchflusszytometer FACScan <sup>TM</sup>	BD, Heidelberg, D

### 2.1.6. Beobachtungskammer

Wachs/Vaseline
Objektträger
Deckgläschen

### 2.1.7. Programme

Photoshop	Adobe Systems Inc.
Graphic Converter	Lemke Software
Quick Time Pro	Apple Computer Inc.
LCS 3.78/4.77	Leica Microsystems
WinMDI	J. Trotter, Scripps Institute, La Jolla, USA
3D-Cluster Analysesoftware	Jochen Möller, Würzburg
Excel	Microsoft
Powerpoint	Microsoft
Word	Microsoft

## 2.2. Methoden

### 2.2.1. Zellgewinnung und Zellkultur

Um Antigenpräsentationen unter dem Mikroskop beobachten zu können, d.h. eine möglichst hohe Anzahl an Präsentationsereignissen pro Beobachtungsfeld vorzufinden, wurden T-Zellpopulationen eingesetzt, die in hohem Anteil einen transgenen TCR exprimieren, der Ova-Peptid (323-335) in Verbindung mit MHC II (HLA Kb) erkennt. Als Antigen präsentierende Zellen wurden mit OVA-Peptid beladene DC aus Balb/c Mäusen verwendet.

#### 2.2.1.1. Isolation muriner CD4<sup>+</sup> T-Zellen

Für die Versuche wurden naive CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten aus DO 11.10 transgenen Mäusen mit BALB/c Hintergrund verwendet (Murphy et al., 1990). Mittels Durchflußzytometrie und Detektion durch den spezifischen AK K<sub>j</sub> 1-16 zeigten 75-90% der isolierten T-Zellen aus der murinen Milz eine Expression des transgenen TCR. Der verbliebene Anteil exprimierte normale MHC II Moleküle.

DO 11.10 Mäuse wurden unter Bedingungen, die frei von spezifischen Pathogenen (SPF) waren, in Zucht gehalten. Dies war einerseits erforderlich, weil diese Tiere für die normale Umwelt partiell immuninkompetent sind. Andererseits sollte das Risiko einer vorzeitigen

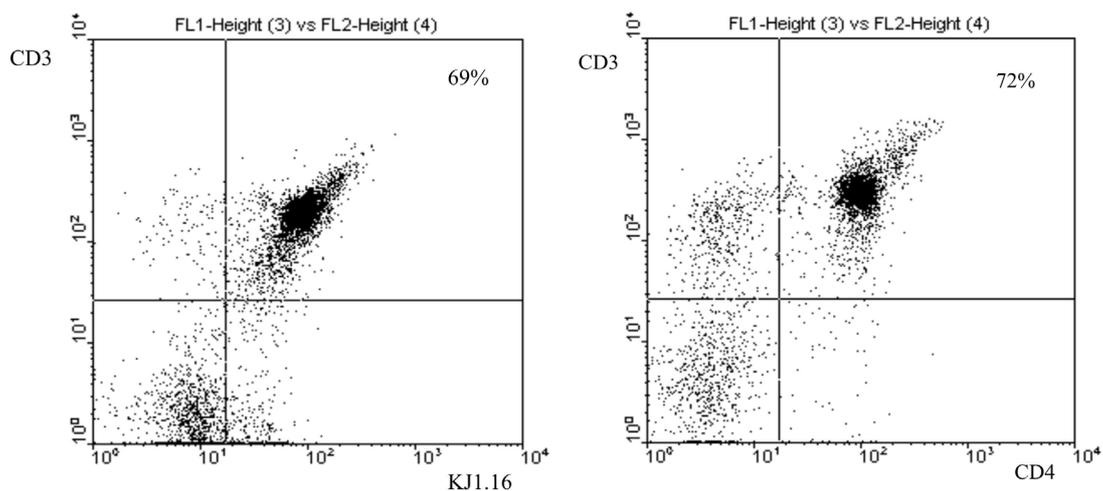
Immunisierung verringert werden, um einen hohen Anteil naiver -also nicht voraktivierter T-Zellen- zu erhalten.

Nach Tötung der Tiere wurden die Milzen und eine möglichst hohe Anzahl von Lymphknoten entnommen. Unter Wahrung der Kühlkette wurden die Organe zunächst durch ein Einzelzellsieb passiert. Aus der gemischten Milzzellsuspension wurden nach Lysierung der Erythrozyten naive  $CD4^+$  T-Lymphozyten über mehrere Schritte aufgereinigt:

#### *Passage über Nylo Säule zur Elimination von Makrophagen und Granulozyten*

Für die Herstellung der Nylo Säule wurde 1g Nylonwolle in eine 20ml Spritze gefüllt und anschließend autoklaviert. Kurz vor dem Versuch wurde die Säule mit 15ml T-Zellmedium blasenfrei gefüllt und für 30min bei  $37^{\circ}C$  und 5%  $CO_2$  inkubiert.

Nach Zentrifugation der Einzelzellsuspension für 5min ( $300 \times G$ ,  $4^{\circ}C$ ) wurde das Pellet in 5ml T-Zellmedium resuspendiert, auf die Nylo Säule gegeben und 45min zur Anhaftung von Makrophagen, DC und Granulozyten an den Nylonfasern bei  $37^{\circ}C$  und 5%  $CO_2$  inkubiert. Nach der Inkubation wurde die Säule mit einer konstanten Geschwindigkeit von 1ml/min eluiert und mit 35ml T-Zellmedium bei gleicher Flussgeschwindigkeit gespült. Die erhaltene Zellsuspension wurde in einem auf  $4^{\circ}C$  gekühltem Gefäß aufgefangen. Sie bestand nahezu ausschließlich aus einer T-/B-Zellmischung (Abb. 2).



**Abb. 2: Anreicherung  $CD4^+$  Lymphozyten nach Passage über Nylo Säule**  
 Von den Zellen mit hoher CD3 Expression zeigten 72% eine hohe CD4 Expression und 69% eine hohe Expression des transfizierten TCR (KJ1.16)

*Aufreinigung über B-Zellsäule zur Elimination von B-Lymphozyten*

Die B-Zell-Elimination erfolgte über Bindung an polyklonale anti-IgG-goat-anti-mouse-Antikörper. Entsprechend den Anweisungen des Herstellers (Gabe der Antikörperlösung mit 1ml PBS/1%FCS auf die gespülte Säule und Inkubation über 1h bei Raumtemperatur) wurde die Säule vorbereitet und die Zellen anschließend nach Zentrifugation in 3ml PBS/FCS resuspendiert und auf die Säule gegeben. Diese wurde sofort bei einer Geschwindigkeit von 1 Tropfen/7-10sec eluiert und bei gleicher Flussgeschwindigkeit mit 15ml PBS/FCS gespült. Die erhaltene Zellsuspension wurde in einem auf 4°C gekühlten Gefäß aufgefangen.

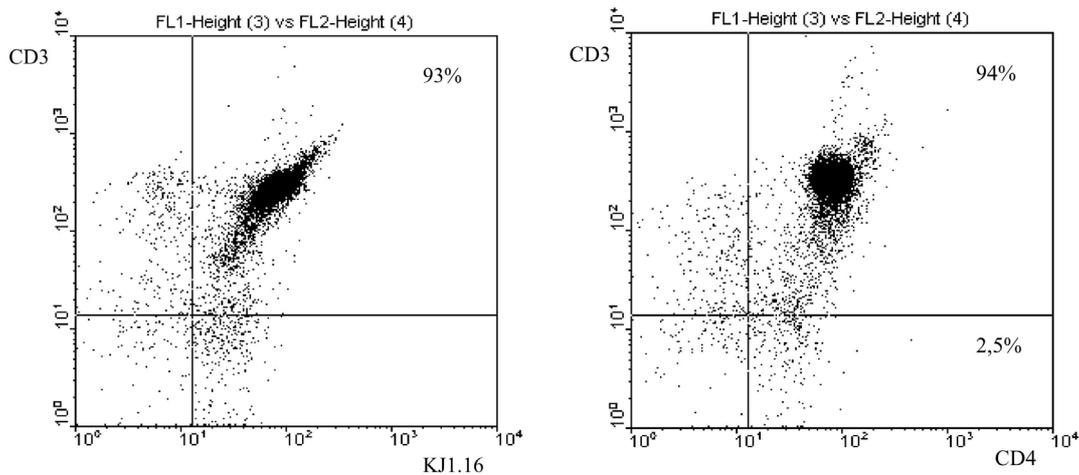
*Magnetdepletion von CD8<sup>+</sup> Lymphozyten und anderen Zellen*

Die Zellsuspension wurde zentrifugiert, in 500µl PBS/FCS resuspendiert und mit einem Antikörpercocktail, bestehend aus jeweils 6µl einer Anti-CD8, Anti-CD45R, Anti-CD11B, Anti-CD16, Anti-CD32, und Anti-Ly6G (alle 0.5mg/ml) sowie 1.5µl einer 1/100 verdünnten HSA Lösung, inkubiert. Die Inkubation in diesem AK-haltigen Medium erfolgte auf einem Taumelrollenmischer (30min, 4°C).

Nach mehrmaligem Spülen wurden die Zellen dann in 1ml PBS resuspendiert, mit 5µl/1 Mio Zellen eines Biomag-Beads-haltigen Mediums ( $1 \times 10^8$  Beads/ml) versetzt und für weitere 30min bei 4°C gelagert.

Es folgte die Magnetdepletion mit einem speziellen auf 4°C gekühlten Magneten (Miltenyi). Die Lösung wurde für jeweils 2min dem Magneten ausgesetzt. Anschliessend wurde der Überstand über den haftenden zellhaltigen Beads abgenommen. Dieses Verfahren wurde 6x wiederholt.

Die erhaltene Zellpopulation wurde mittels Durchflusszytometrie auf ihren Gehalt CD4<sup>+</sup> T-Zellen überprüft (>90% naive CD4<sup>+</sup> Lymphozyten, Abb. 3) und in T-Zellmedium (500ml RPMI, 25ml FCS, 5ml NEAA, 5ml L-Glutamin, 5ml Hepes Puffer 10mM, 5ml Natriumpyruvat 1mM, 5ml β-Merkaptoethanol 500mM, 5ml Pen/Strep (Penicillin 10.000U/ml und Streptomycin 10mg/ml)) kultiviert.



**Abb. 3: Anreicherung der CD4<sup>+</sup> Lymphozyten nach Magnetdepletion**

Von den Zellen mit hoher CD3 Expression zeigten 94% eine hohe CD4 Expression und 93% eine hohe Expression des transfizierten TCR (KJ1.16)

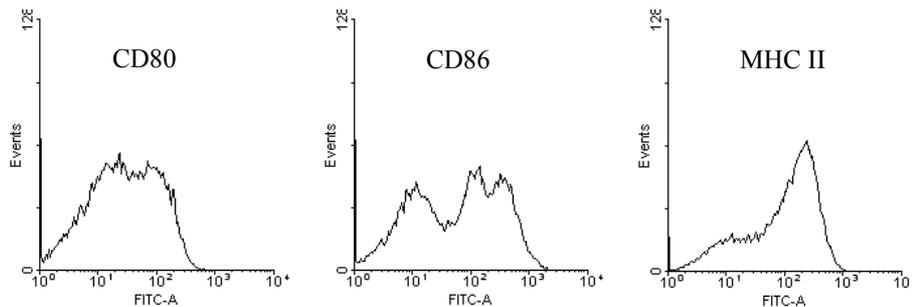
### 2.2.1.2. Generierung dendritischer Zellen aus murinen Knochenmarkszellen

Für die Generierung der DC wurden Knochenmarkstammzellen aus BALB/c Mäusen isoliert. Den Tieren wurden nach Tötung die Femores und Tibiae entnommen, die anschließend eröffnet wurden. Das Knochenmark wurde in PBS durch mehrmaliges Aspirieren mit einer 25G Kanüle als Einzelzellsuspension gewonnen, in 0,4% NaCl Lösung inkubiert (37°, 1min Lysierung der Erythrozyten), durch ein 200µm Falconsieb filtriert (Entfernung von Zelldetritus) und in 10ml BMDC-Medium (500ml RPMI 1640, 25ml FCS, 5ml L-Glutamin, 5ml NEAA, 5ml β-Merkaptoethanol, 500µl Gentamycin) in einer 100mm Ø Petrischale aufgenommen.

Nach 2h Inkubation (37°C, 5% CO<sub>2</sub>) und Adhärenz von Makrophagen, Fibroblasten und mesenchymalen Stammzellen am Schalenboden wurde der Überstand mit darin befindlichen hämatopoetischen Zellen durch zweimaliges vorsichtiges Spülen des Schalenbodens gewonnen und über 10 weitere Tage kultiviert.

Zur Maturation der DC aus diesen hämatopoetischen Vorläuferzellen wurden 3x10<sup>6</sup> Zellen in 5ml BMDC Medium mit GMCSF (250U/ml) und IL-4 (100U/ml) in einer 6-Lochplatte ausgesät und für 10 Tage bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Das zytokinhaltige Medium wurde nach jeweils 2-3 Tagen gewechselt. An den Tagen 6-8 wurden täglich die nicht adhärenen Zellen in ein neues Well überführt und die adhärenen

Zellen verworfen. Ab Tag 7 der Kultur wurden 5 µg/ml LPS zur terminalen Maturation (Aufregulation von MHC II, B7.1 und B7.2) dem Medium zugefügt. Maturierte DC wurden ab Tag 8 für Migrations- und Interaktionsversuche mit T-Zellen eingesetzt. Die Zellreife wurde anhand der Expression von MHC II-Molekülen und B7-Molekülen (CD 80, CD86) überprüft.



**Abb. 4: Maturation dendritischer Zellen**

Nachweis einer hohen Expression von CD80, CD86 und MHCII nach Inkubation laut Protokoll und abschliessender Gabe von 5 µg/ml LPS als Zeichen der Maturation.

## 2.2.2. Zellfärbung

### 2.2.2.1. Inkubation der T-Zellen mit Fluo-3

Zur Darstellung von freiem Kalzium im Zytosol der T-Zellen wurden diese mit Fluo-3 gefärbt. Dazu wurde vor der Kokultivierung Fluo-3 in 10 µM Konzentration in HEPES Puffer für 20 min bei 37°C in das T-Zellmedium gegeben. Der Färbeprozess wurde durch Zentrifugation und Resuspension in RPMI beendet.

### 2.2.2.2. Zytoplasmatische Färbung dendritischer Zellen mit Cell Tracker Orange

Zunächst wurden ungefärbte DC in den Clustern eingesetzt. Da sich jedoch die Konturen der DC mittels Phasenkontrast nur unzureichend von den T-Zellen abgrenzten, wurde in den weiteren Versuchen das Zytoplasma der DC mit Cell Tracker Orange gefärbt. Dafür wurden die DC vor der Kokultivierung mit T-Zellen in PBS mit Cell Tracker Orange (1 µM) für 20 min bei 37°C inkubiert, zentrifugiert und in RPMI-Medium resuspendiert.

### **2.2.3. Generierung multizellulärer Aggregate (Cluster)**

Für einen spezifischen Kontakt müssen die DC das Ova-Peptid auf ihren MHC II Molekülen präsentieren. Vor dem Ansetzen der Kokultur fügten wir deshalb 5µg/ml Ova-Peptid der DC-Kultur zu und inkubierten diese für weitere 2h.

Anschließend wurden die gefärbten DC und T-Zellen im Verhältnis 10:1, d.h. 1 Mio T-Zellen und 100.000 DC, in 3ml T-Zellmedium aufgenommen und für etwa 1h inkubiert. Spontan entstandene Cluster wurden entweder direkt oder nach kurzer Zentrifugation (ca. 100xG) vom Boden der Kulturschale pipettiert und auf einen Objektträger plaziert. Aus diesen unterschiedlichen Vorgehensweisen resultierte eine unterschiedliche Zelldichte auf dem Objektträger ohne Einfluss auf die Zusammensetzung oder Größe der Cluster.

### **2.2.4. Beobachtungskammer**

Anders als im Kollagengel, sinken Zellcluster in Flüssigkultur spontan auf den Boden der Kammer. Da der Brennpunkt der aufrechten Konfokaloptik bei 170µm (63x Objektiv) bzw. 250µm (40x Objektiv) liegt, war zur Darstellung der abgesunkenen Cluster die Konstruktion einer ausreichend flachen Kulturkammer notwendig, die zugleich nicht zu einer Kompression größerer Cluster führte.

Zur Wahrung dieser Kriterien wurde die clusterhaltige Zellsuspension in einem Volumen von 20µl auf den Objektträger pipettiert und mit einem Deckgläschen (Stärke max. 115µm) frei schwimmend bedeckt. Durch die Oberflächenspannung der Flüssigkeit erhielten wir eine Flüssigphase von etwa 30µm Stärke, was dem Durchmesser eines mittelgroßen Zellclusters entspricht. Zusammen mit der Stärke des Deckgläschens ergab sich ein maximaler Abstand von 150µm vom Boden der Beobachtungskammer bis zur Optik, sodass auch die untersten Schichten eines Clusters sicher im Fokussierbereich lagen. Die Kammer wurde mit einer Mischung aus Vaseline und Parafin versiegelt, um einen Volumenverlust des Mediums durch Verdunstung zu verhindern. Während der Beobachtung wurde die Kammer mit einem Infrarotstrahler bei 37°C konstant temperiert.

### **2.2.5. Konfokalmikroskopie und Videodokumentation**

Die Zellen in den Inkubationskammern wurden simultan mit zwei Fluoreszenzkanälen und einem Transmissionslichtkanal bzw. Reflexionslichtkanal aufgenommen. Die Fluoreszenzfarbstoffe Cell Tracker Orange und Fluo-3 wurden mit einem 488nm ArKr-Laser angeregt. Das emittierte Licht wurde auf zwei Kanälen jeweils im Spektralbereich der maximalen Emission - d.h. für Fluo-3 im Bereich 526nm und für Cell Tracker Orange im Bereich 576nm - detektiert. Während der Beobachtungszeit von 20min konnte kein relevantes bestrahlungsbedingtes Ausbleichen der Farbstoffe registriert werden (Abb. 6).

Zur Rekonstruktion dreidimensionaler Cluster wurden Z-Ebenen bis zu einer Gesamthöhe von 20 $\mu$ m aufgenommen. Das Cluster sollte in der Tiefenausdehnung möglichst vollständig erfasst werden. Andererseits durfte zur Vermeidung des zytotoxischen Effektes des Laserlichtes nur die minimal notwendige Anzahl an Scans durchgeführt werden. Der Ebenenabstand (Schnittdicke) betrug in der Regel 1 bis maximal 3 $\mu$ m und orientierte sich an der Ausdehnung der T-Zellen, die auf mindestens 2 benachbarten Ebenen abgebildet sein sollten, um einen artifiziellen Signalverlust durch Herauswandern der Zellen aus einer Detektionsebene zu vermeiden. Diese Z-Stapel wurden alle 30sec aufgenommen, sodass eine Sequenz von 40 Bildstapeln eine Beobachtungszeit von 20min abbildete.

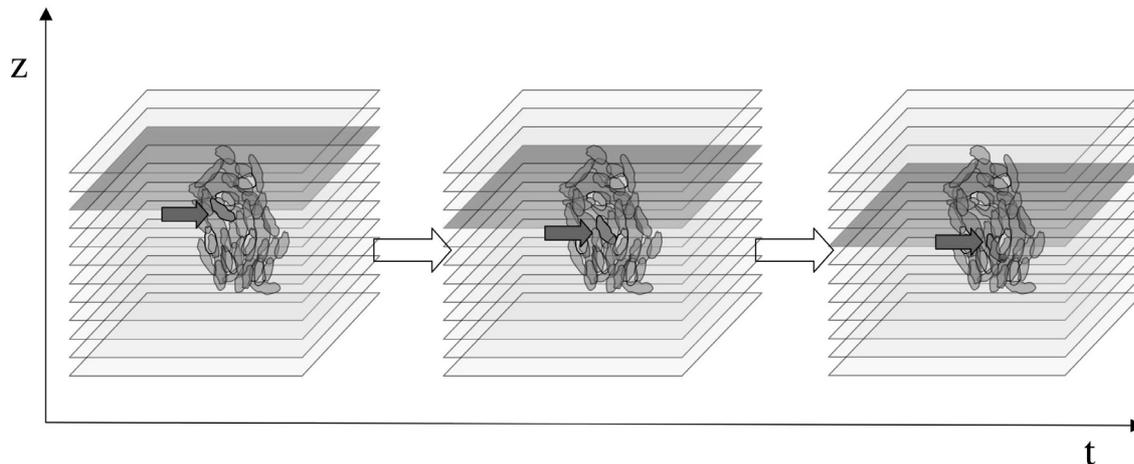
### **2.2.6. Digitale Auswertung von Bildsequenzen**

#### **2.2.6.1. Auswertung der Zelldynamik**

Die dreidimensionale Rekonstruktion der Zellbewegung in Zellclustern wurde unter folgenden Kriterien durchgeführt:

Eine Interaktion galt dann als dynamisch, wenn die T-Zelle mindestens einen Weg von der Länge ihres Durchmessers während einer Beobachtungszeit von in der Regel 20min zurückgelegt hatte und/oder wenn eine Bewegung der T-Zelle relativ zu benachbarten Zellen erfolgte. In einzelnen Fällen musste die Eigendynamik des Zellclusters durch Bestimmung eines Referenzpunktes, der die Bewegung des gesamten Clusters repräsentierte, und nachfolgender Subtraktion dieser Bewegung von der Migrationsbewegung der T-Zelle korrigiert werden. Zellen an sich stark bewegenden Dendriten der DC konnten für die Auswertung nicht verwendet werden.

Um eine Zelle auf ihrem Weg durch das Cluster verfolgen zu können, wurde in der Arbeitsgruppe (Dr. Jochen Moeller) eine Software entwickelt, die es erlaubt, die Zelle entlang der Zeitachse wie auch entlang aller räumlichen Dimensionen darzustellen (Abb. 5).



**Abb. 5: Digitale Bildrekonstruktion anhand veränderlicher Detektionsebenen dreidimensionaler Zellcluster über die Zeit.**

Von einem Bildstapel zu unterschiedlichen Zeitpunkten wird mittels einer spezifischen Software definiert, welche Ebenen zur Rekonstruktion eines 2D Bildes herangezogen werden. Dieses Verfahren berücksichtigt die Positionsänderung von T-Zellen in Z-Richtung (oben-unten) und ermöglicht zugleich, Hintergrundrauschen und Bildüberlagerung zu minimieren. (Zu jedem Zeitpunkt  $t$  wird ein möglichst vollständiger 3D-Datensatz am Konfokalmikroskop erhoben).

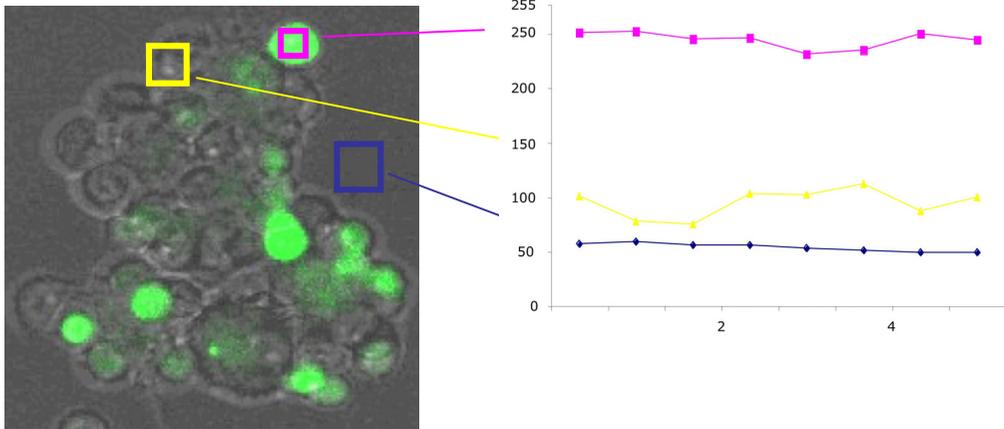
In der Auswertung am Computer wurde entlang der Zeitachse eine T-Zelle durch die Z-Stapel verfolgt, sodass sie zu allen Zeitpunkten hoch aufgelöst und überlagerungsfrei dargestellt werden konnte.

### 2.2.6.1. Auswertung des Kalziumsignals

Für die Bestimmung der relativen Signalintensität wurden zur Auswertung die Summationsbilder des Fluo-3-Fluoreszenzkanales aus allen Z-Ebenen verwendet. Mit dem Programm Photoshop wurde zunächst eine *region of interest* (ROI) an einer zentralen Stelle der Zelle bestimmt und dann die durchschnittliche Pixelintensität gemessen (Abb. 6). Anhand der Unterschiede im Signalniveau verschiedener T-Zellen einer gemischten Population spezifischer und unspezifischer T-Zellen wurde der Verlauf der Signalintensitäten für

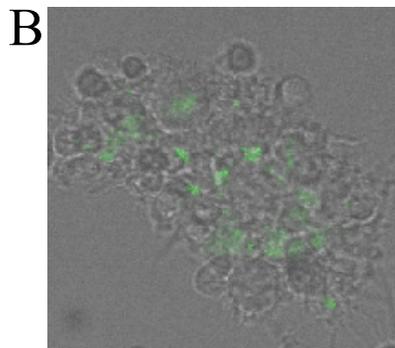
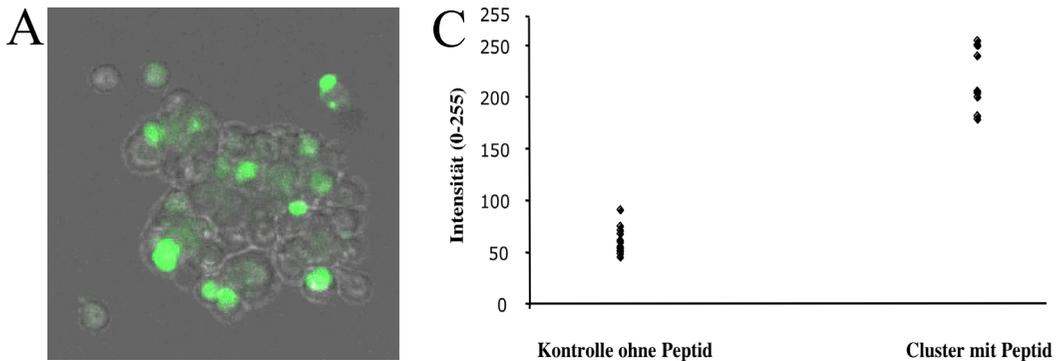
spezifische und unspezifische Kontakte über eine Zeitdauer von bis zu 20min bestimmt. Technisch bedingte Schwankungen der Intensität wurden durch simultane Messung des Hintergrundsignals erfasst. Anschließend wurden pro Bildserie für unterschiedliche Zeitpunkte die Intensitäten unspezifischer und spezifischer Kontakte gemessen. Zusätzlich wurde die Signalintensität unspezifischer Kontakte durch Messung der Signalintensität von T-Zellen aus Kontrollclustern mit DC ohne Peptidbeladung gemessen. Hier zeigte sich ein deutlicher Unterschied der Signalintensität von durchschnittlich 59 relativen Einheiten im Vergleich zu durchschnittlich 220 relativen Einheiten bei spezifischen Kontakten mit Peptid tragenden DC. (Abb. 7, A-C)

## Farbtafel 1



**Abb. 6: Semiquantitative Messung der Fluo-3 Fluoreszenzintensität in T-Zellen eines Zell-Aggregats.**

Zur direkten Darstellung spezifischer und nicht spezifischer Signalintensitäten wurden T-Zellen geringerer Reinheit nach Isolation mit B-Zell-Säule mit OVA-Peptid beladenen DC kokultiviert. Definition der Regionen: Produktive spezifische Interaktion mit hohem Signal (rot), unspezifisches Signal eines nicht produktiven Kontaktes (gelb) und unspezifisches Hintergrundsignal (blau). Die Veränderung des Signals über die Zeit wurde aus sequentiellen Bildern einer Zeitserie errechnet. Die Daten zeigen auch, dass kein wesentliches Ausbleichen der Fluoreszenzintensität erfolgte.



**Abb. 7: Nachweis spezifischer Kontakte in multizellulären T-Zell-DC-Clustern mittels Fluo-3.**

Summationsbilder aus 10-20 Z-Ebenen, die das nahezu gesamte Volumen des Zellclusters erfassten. Das Zellcluster mit gepulsten DC (A) zeigte verstreut angeordnete T-Zellen mit kräftigem  $\text{Ca}^{2+}$ -Signal bei durchschnittlich 220 relativen Intensitätseinheiten (C).

OVA-freies Kontrollcluster (B) mit ungepulsten DC zeigte signallose bzw. signalarme T-Zellen mit durchschnittlich 59 relativen Intensitätseinheiten (C).

### 3. Ergebnisse

#### 3.1. Hochaufgelöste Darstellung des $\text{Ca}^{2+}$ -Signals in Kollagenmatrix und Flüssigkultur

##### 3.1.1. $\text{Ca}^{2+}$ -Signal während der T-Zell-DC Interaktion in der Kollagenmatrix

Der spezifische Kontakt zwischen T-Zelle und DC in 3D Kollagenmatrices vollzieht sich als dynamische Interaktion zwischen beiden Zellen. Diese Interaktion lässt sich morphodynamisch in 3 distinkte Phasen unterteilen: Kontaktaufnahme, Kontaktphase, Ablösephase. Während jeder dieser Phasen zeigt die T-Zelle konstant wiederkehrende Verhaltensweisen (Song, unveröffentlichte Daten). Die hochauflösende Aufnahme der dynamischen Kontakte einzelner Zellen mit gleichzeitiger Detektion von freiem zytoplasmatischem  $\text{Ca}^{2+}$  am Konfokalmikroskop sollte klären, welche der Phasen zu einer Engagierung des TCR mit nachfolgender Signaltransduktion führen und somit für die T-Zellaktivierung selbst relevant sind.

##### 3.1.1.1. Initiale Kontaktaufnahme

Wie zuvor beschrieben (Negulescu et al., 1996; Gunzer et al., 2000; Song, unveröffentlichte Daten) wurde der Kontakt zwischen DC und T-Zelle über die Vorderfront (Abb. 8A, roter Pfeil) der migrierenden polarisierten T-Zelle aufgebaut. Die T-Zelle zeigte vor dem initialen Kontakt kein oder nur ein geringes  $\text{Ca}^{2+}$ -Signal (Abb. 8A, „0-40sec“).

Es ließ sich ein steiler und kräftiger Anstieg des  $\text{Ca}^{2+}$ -Signals von 60 auf 250 relative Intensitätseinheiten innerhalb von Sekunden nach dem ersten Kontakt der Vorderfront der T-Zelle mit Dendriten der DC beobachten (Abb. 8A, „120sec“, 8B). Die anderen Kompartimente der polarisierten T-Zelle waren in diesem Moment noch nicht in die Kontaktfläche mit einbezogen. Der Uropod stand appositionell zur Kontaktzone umgeben von Kollagen und war somit morphologisch nicht an der Kontaktaufnahme beteiligt (Abb. 8A, gelber Pfeil). Im weiteren Verlauf vergrößerte sich die Kontaktfläche durch Abflachung der Vorderfront der T-Zelle bei gleichbleibender Intensität des  $\text{Ca}^{2+}$ -Signals (Abb. 8A, „200sec“). Siehe auch Film 1.

### 3.1.1.2. Signalverhalten während der Kontaktphase

Der Kontaktaufnahme schloss sich eine dynamische Kontaktphase an, während der die T-Zelle ihre wandernde Bewegung auf der Oberfläche der DC fortsetzte. Hierbei lag der Zellkörper der T-Zelle unilateral der DC an, sodass Vorderfront wie auch Zellkörper und der – nur angedeutet sichtbare – Uropod in die Kontaktfläche einbezogen waren. Die Längsachse der polarisierten Zelle lag dabei parallel zur Migrationsrichtung (Abb. 10A, „320sec“). Während dieser Migration der T-Zelle über die DC-Oberfläche war ein kontinuierlich angehobenes  $\text{Ca}^{2+}$ -Signal bei 230-250 relativen Intensitätseinheiten darstellbar, das über die gesamte Strecke der beobachteten Wanderung auf der DC ohne wesentliche Oszillationen anhielt (Abb. 10B).

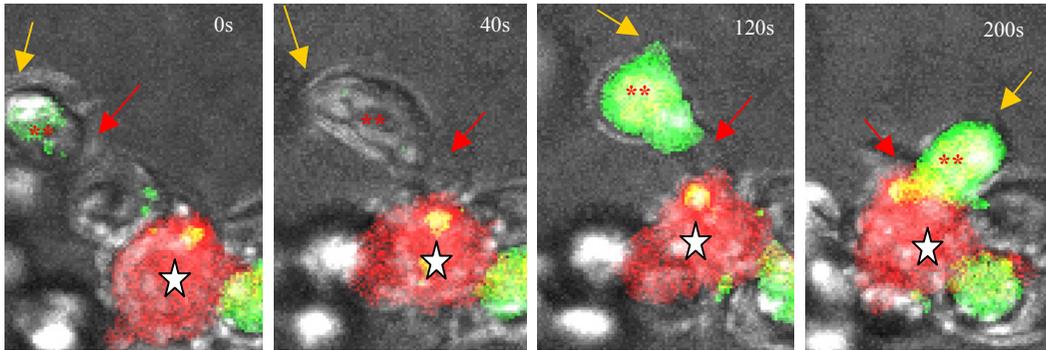
Die Geschwindigkeit der T-Zelle von Bild zu Bild zeigte Schwankungen zwischen 0.5 und  $2.3\mu\text{m}/\text{min}$  (Mittelwert:  $1.09\mu\text{m}/\text{min}$ ) (Abb. 10C). Siehe auch Film 3.

### 3.1.1.3. $\text{Ca}^{2+}$ -Signal während der Ablösephase

In der Ablösephase orientierte sich die Vorderfront weg von der DC in Richtung Kollagenmatrix, sodass sich der nachfolgende T-Zellkörper tangential von der DC-Oberfläche löste (Abb. 11A, „40sec“, schwarzer Pfeilkopf). Es resultierte ein temporärer Übergangszustand mit Ausrichtung der Vorderfront der T-Zelle in Richtung Matrix, während der Uropod noch verankert an der DC-Oberfläche war (Abb. 11A, „480sec“, weißer Pfeilkopf). Während in einem beobachteten Fall der Kontakt durch Retraktion des Uropods gelöst wurde und zu einer Abnahme des  $\text{Ca}^{2+}$ -Signals führte (Abb. 10, roter Pfeil), erlaubten einzelne partielle Lösungen die Untersuchung des  $\text{Ca}^{2+}$ -Signals während dieses Übergangszustands. Hier baute die T-Zelle pendelnden Zug auf die Kollagenmatrix mit der Vorderfront auf, während der Uropod eine relativ stabile, adhäsive Verbindung zur DC wahrte (Abb. 11A, „40-480sec“, schwarzer Doppelpfeil). In dieser Phase der unipolaren Interaktion des Uropods zeigte die T-Zelle ein weiterhin deutlich angehobenes  $\text{Ca}^{2+}$ -Signal (Abb. 11B), das einen zusätzlichen Anstieg erfuhr, als sich der Zellkörper der T-Zelle zurück auf die DC-Oberfläche orientierte (Abb. 11 A, „880sec“; Abb. 11B, Pfeil). Dieser Befund impliziert, dass der punktuelle Kontakt des Uropods zur DC auch ohne direkte Beteiligung der Vorderfront der T-Zelle ein einmal etabliertes Signal aufrechterhalten kann. Siehe auch Film 4.

## Farbtafel 2

A



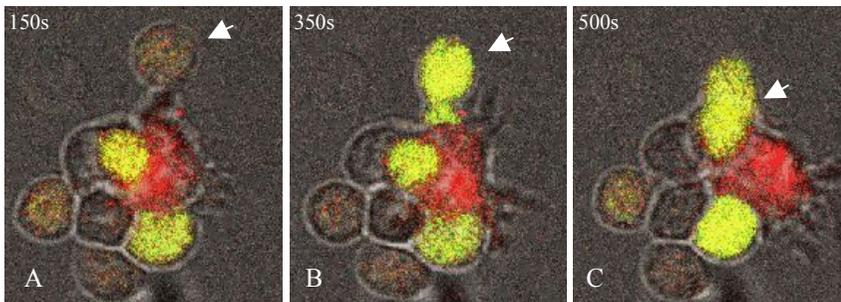
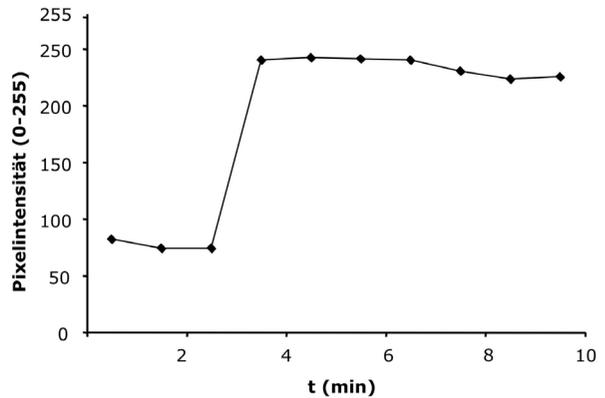
**Abb. 8: Kontaktaufnahme einer T-Zelle in 3D Kollagenmatrix.**

Fluo-3 markierte T-Zellen wurden mit Cell Tracker Orange-markierten DC in 3D Kollagenmatrices kopolymerisiert und mittels 4D Konfokalmikroskopie analysiert.

(A) Die polarisierte T-Zelle (\*\*), initiierte mit der Vorderfront (roter Pfeil) den Kontakt zu schwach kontrastierten Dendriten der DC (Stern). Dabei war der Uropod appositionell zur Kontaktzone positioniert (gelber Pfeil).

(B) Wenige Sekunden nach Kontaktinitiation kam es zu einem kräftigen  $\text{Ca}^{2+}$ -Signalanstieg in der T-Zelle (grüne Fluoreszenz). Siehe auch Film 1.

B

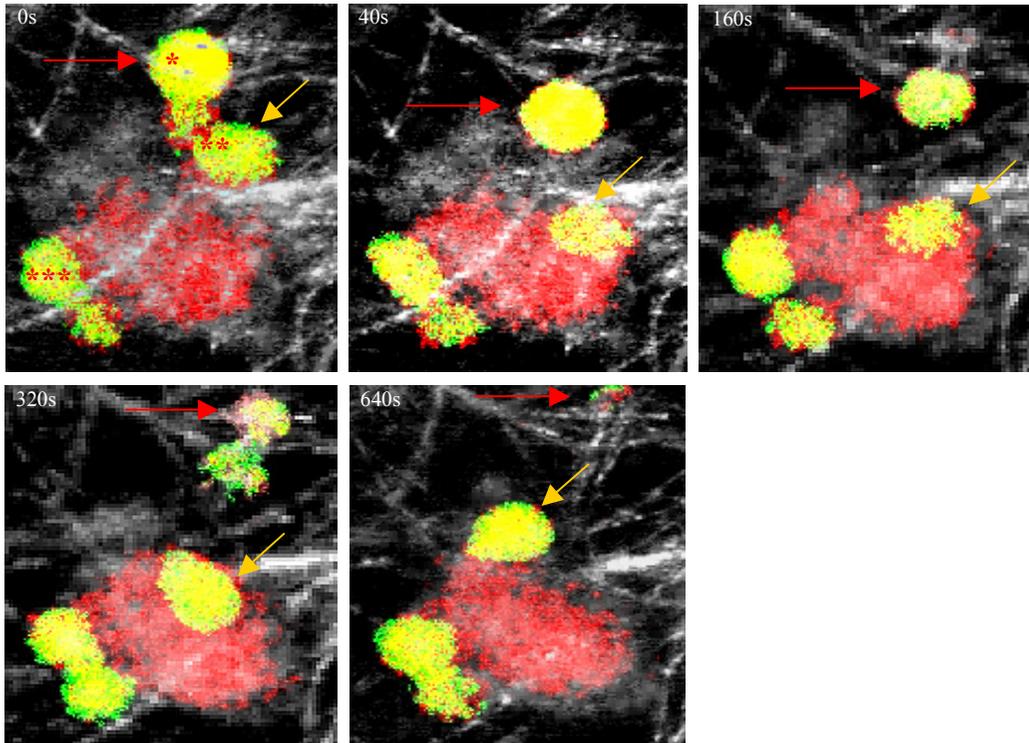


**Abb. 9: Interaktion von T-Zellen mit OVA-Peptid beladenen DC im Flüssigkultur: Kontaktaufnahme und frühes  $\text{Ca}^{2+}$  Signal.**

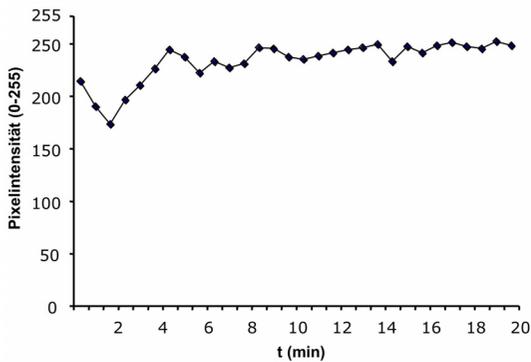
Kontaktinitiation durch Bewegung eines Dendriten der DC (A, Pfeilspitze, 150sec). Innerhalb der folgenden 200sec kam es zu einem kräftigen und über mehrere Minuten persistierenden Anstieg des  $\text{Ca}^{2+}$ -Signals (B, C; weiße Pfeile). Siehe auch Film 2.

### Farbtafel 3

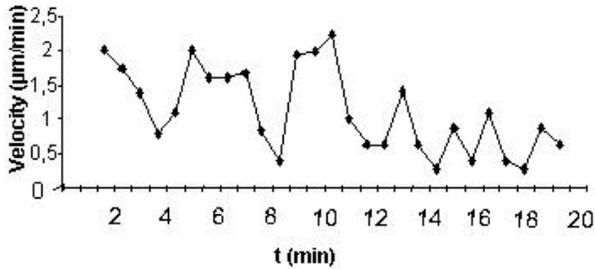
A



B



C



**Abb. 10: Scanning, Ablösephase und stabile Interaktionen im multizellulären Cluster zwischen vier T-Zellen und einer DC in einer 3D Kollagenmatrix.**

**A:** Motile Interaktion (\*\*): Bewegung einer T-Zelle (gelber Pfeil) über die Oberfläche der DC (rote Fluoreszenz). Ablösung (\*) einer T-Zelle (roter Pfeil) von der DC und nachfolgend Reduktion des  $\text{Ca}^{2+}$ -Signals.

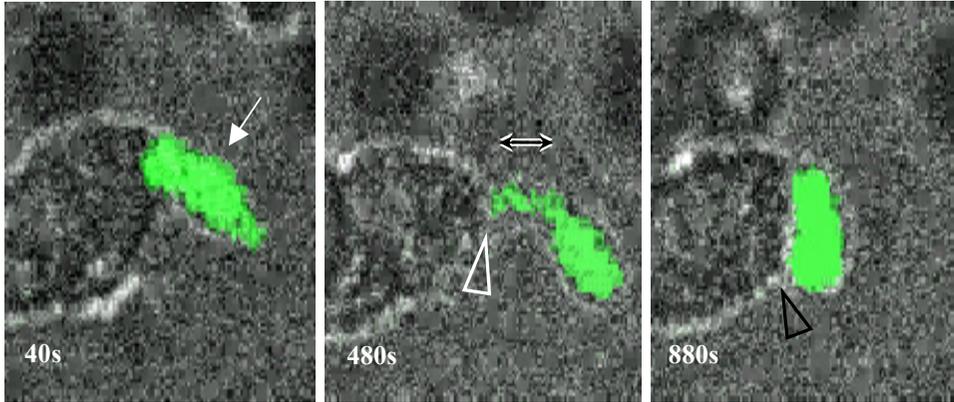
Zwei morphologisch statische Zellen (\*\*\*) mit abgerundeter Morphologie.

**B.** Kontinuierlich angehobenes  $\text{Ca}^{2+}$ -Signal der wandernden T-Zelle (A, \*\*).

**C.** Die Bewegungsgeschwindigkeit dieser Zelle zeigte ein oszillierendes Muster. Siehe auch Film 3.

## Farbtafel 4

A

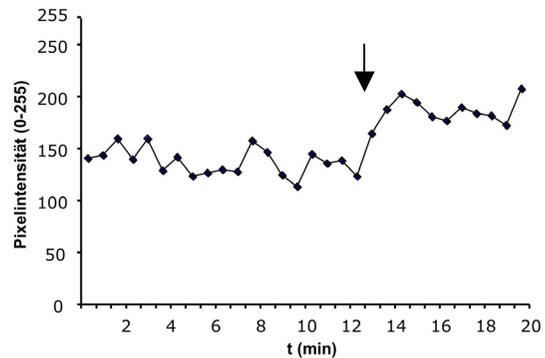


**Abb. 11: Uropod-mediiertes persistierendes  $\text{Ca}^{2+}$  Signal während der Ablösephase.**

(A) Stark polarisierte T-Zelle (weißer Pfeil) während einer frustranen Ablösephase. Der Kontakt war zeitweise ausschließlich über den Uropod vermittelt (weißer Pfeilkopf, 480sec).

(B) Während des Kontaktes über den Uropod blieb das  $\text{Ca}^{2+}$ -Signal kontinuierlich im unteren Bereich der spezifischen Intensität erhöht. Nach Vergrößerung der Kontaktfläche (A, schwarzer Pfeilkopf, 880s) kam es zu einem Anstieg des  $\text{Ca}^{2+}$ -Signals (Pfeil). Siehe auch Film 4.

B



### **3.2. Morphodynamik und $\text{Ca}^{2+}$ -Signal während T-Zell-DC Interaktionen im multizellulären Cluster**

#### **3.2.1. $\text{Ca}^{2+}$ -Signalverhalten im T/DC-Zellcluster**

Nach Aggregation multizellulärer Cluster aus T-Zellen und OVA-Peptid beladener DC ließen sich zeitgleich T-Zellen mit hohem und niedrigem bzw. nicht messbarem  $\text{Ca}^{2+}$ -Signal nachweisen. Der Anteil der Zellen mit hohem  $\text{Ca}^{2+}$ -Signal schwankte zwischen 30 und 85% in verschiedenen experimentellen Ansätzen.

Um die Spezifität der Kontakte mit hohem  $\text{Ca}^{2+}$ -Signal zu zeigen und sie vom  $\text{Ca}^{2+}$ -Signal eines unspezifischen Kontaktes abzugrenzen, wurden Kontrollcluster ohne vorherige OVA-Beladung der DC generiert, die überwiegend niedriges bis nicht detektierbares  $\text{Ca}^{2+}$ -Signal induzierten (Abb. 7B). Die densitometrische Analyse zeigte, dass Pixelintensitäten oberhalb von 120 relativen Einheiten nur in Anwesenheit von OVA-gepulsten DC erreicht wurden, was somit als Indikator spezifischer -d.h. vom Antigen abhängiger Signalgebung- gewertet wurde (Abb. 7C).

#### **3.2.2. Rekonstruktion statischer und dynamischer Interaktionen in T/DC-Zellclustern**

In den komplex 3D strukturierten Zellclustern konnten 4 Typen der Zelldynamik beobachtet werden:

- Eigendynamik des gesamten Clusters: In manchen Fällen zeigte das Cluster als ganzes eine geringe driftende Bewegung einschließlich langsamer Formveränderungen an den Rändern. Diese Dynamik war einerseits technisch durch Kompression des Clusters während der Fokussierung aber auch durch Konvektion im Medium und Relativbewegung der Zellen innerhalb des Clusters bedingt. Sie war in den meisten Fällen zu geringfügig, um sich in der Geschwindigkeitsmessung der T-Zellen auszuwirken. Siehe auch Film 5. In wenigen Fällen musste sie bei der Messung der Migrationsgeschwindigkeiten der Zellen im Cluster berücksichtigt werden.
- Dynamische Formveränderung der DC: Dendritische Zellen wiesen eine erhebliche Motilität ihrer Dendriten auf. Siehe auch Film 6.

- Migratorische Aktivität der T-Zellen, die zu einem Wandern der T-Zellen durch den Cluster führte.
- Stabile Positionierung sowohl von T-Zellen wie auch DC innerhalb des Clusters über einen Beobachtungszeitraum von i. d. R. 20min.

Zur Dynamik spezifischer Kontakte trugen sowohl die Bewegungen der T-Zellen als auch die Bewegungen der DC bei. Nicht immer ließ sich der Beitrag zur Dynamik den jeweiligen Zellen eindeutig zuordnen.

#### *Phasen dynamischer T-Zell-DC Interaktion in Clustern*

Die Kontaktaufnahme zu einer DC wurde für 2 verschiedene Situationen beobachtet:

- 1) De-novo Kontaktaufnahme einer T-Zelle mit einem Zellcluster: Die Kontaktaufnahme erfolgte weniger durch aktive Bewegung der T-Zelle, sondern durch passives „Treiben“ der Zelle im Konvektionsstrom des flüssigen Mediums bis sie von Dendriten der DC gebunden wurde. Hier ließ sich ein unmittelbar folgender kräftiger Anstieg des  $Ca^{2+}$ -Signals nachweisen (Abb. 9, Film 2), vergleichbar der Kontaktaufnahme in der Kollagenmatrix (Abb. 8, Film 1).
- 2) Übergang des Kontakts zwischen 2 DC innerhalb des Clusters durch Ortsänderung der T-Zelle: Erfolgte eine Positionsänderung der T-Zelle relativ zur DC innerhalb des Clusters mit Auflösung eines vorbestehenden Kontakts zu einer DC und Aufbau einer Interaktion zu einer anderen DC (Abb. 14, blauer Pfeil, von DC2 zu DC1), so blieb das intrazelluläre  $Ca^{2+}$ -Signal der T-Zelle in der Regel auf hohem Niveau erhalten (Abb. 13). Siehe auch Film 7. Dies legt eine Kontinuität der Signalgebung nahe, bei der das Signal durch dicht benachbarte OVA-gepulste DC unabhängig vom jeweiligen Einzelkontakt und unabhängig von der Polarität der T-Zelle (z.B. Vorderende versus Hinterende) übertragen wird.

#### *Die Auflösung von Kontakten in aggregierten Clustern*

Kontaktauflösung mit Übergang von einer DC zu einer benachbarten DC: Innerhalb des Clusters erfolgten Ablösungen als Kontaktwechsel zwischen verschiedenen DC, ohne dass eine klare morphologische Trennung von Kontaktab- und -aufbau möglich war (Abb. 14 weißer Pfeil). Siehe auch Film 7.

### *Statische Interaktionen*

Die statischen Kontakte zeigten das typische Bild einer abgerundeten T-Zelle, die über eine stabile Kontaktzone zu einer Seite adhärent mit einer DC verbunden war (Abb. 15B). Trotz der stabilen Ausrichtung konnten hier langsame Positionsänderungen der T-Zellen relativ zur DC beobachtet werden (vgl. Eigendynamik des Clusters, 3.2.2. 1.). Siehe auch Film 5.

### *T-Zelldynamik und Ca-Signalverhalten*

Die migratorische Aktivität der T-Zellen hatte keinen erkennbaren Einfluß auf die Intensität des  $\text{Ca}^{2+}$ -Signals. Stabil positionierte wie auch motile T-Zellen entwickelten vergleichbar hohe Fluoreszenzintensitäten (Abb. 12 A). Ebenso liessen sich beide Kontaktformen in der Gruppe mit niedrigem  $\text{Ca}^{2+}$ -Signal nachweisen (Abb. 12 A-D).

Für T-Zellen mit starkem Calciumsignal fanden sich im Mittel 45% dynamische Interaktionen und 55% statische Interaktionen (Abb. 17). Die Geschwindigkeit der T-Zelle betrug 0.1-4  $\mu\text{m}/\text{min}$  (Abb. 18) und lag damit um 50–90% niedriger verglichen mit der freien Migration in der Kollagenmatrix.

### **3.2.3. Die Morphologie der wandernden T-Zelle im Cluster ist polar.**

Wie auch in anderen Umgebungsbedingungen zeigten die sessilen und motilen T-Zellen im Cluster eine von ihrer Mobilität abhängige unterschiedlich polare Gestalt.

Die wandernde T-Zelle im Cluster war länglich geformt. Es ließen sich wie bei der wandernden Zelle im Kollagengel Pseudopodien oder kleine *ruffles* an der Vorderfront erkennen, die die Richtung der Wanderbewegung vorwegnahmen. Sie gingen in einen ovoiden Zellkörper über, der mit seiner Längsachse entlang der Wanderbewegung ausgerichtet war (Abb. 15A). Ein Uropod, wie er für die polare schnell wandernde T-Zelle im Kollagengel typisch ist, ließ sich im Cluster selten und nur angedeutet erkennen.

Die Morphologie der wandernden T-Zelle im Cluster repräsentiert annäherungsweise eine Art Übergangsform zwischen der stark polarisierten und elongierten T-Zelle in der Kollagenmatrix und der sessilen abgerundeten und nach einer Seite adhärenen Zelle in stabilen Kontakten wie z. B. zu einem Lipidmonolayer oder B-Zellen.

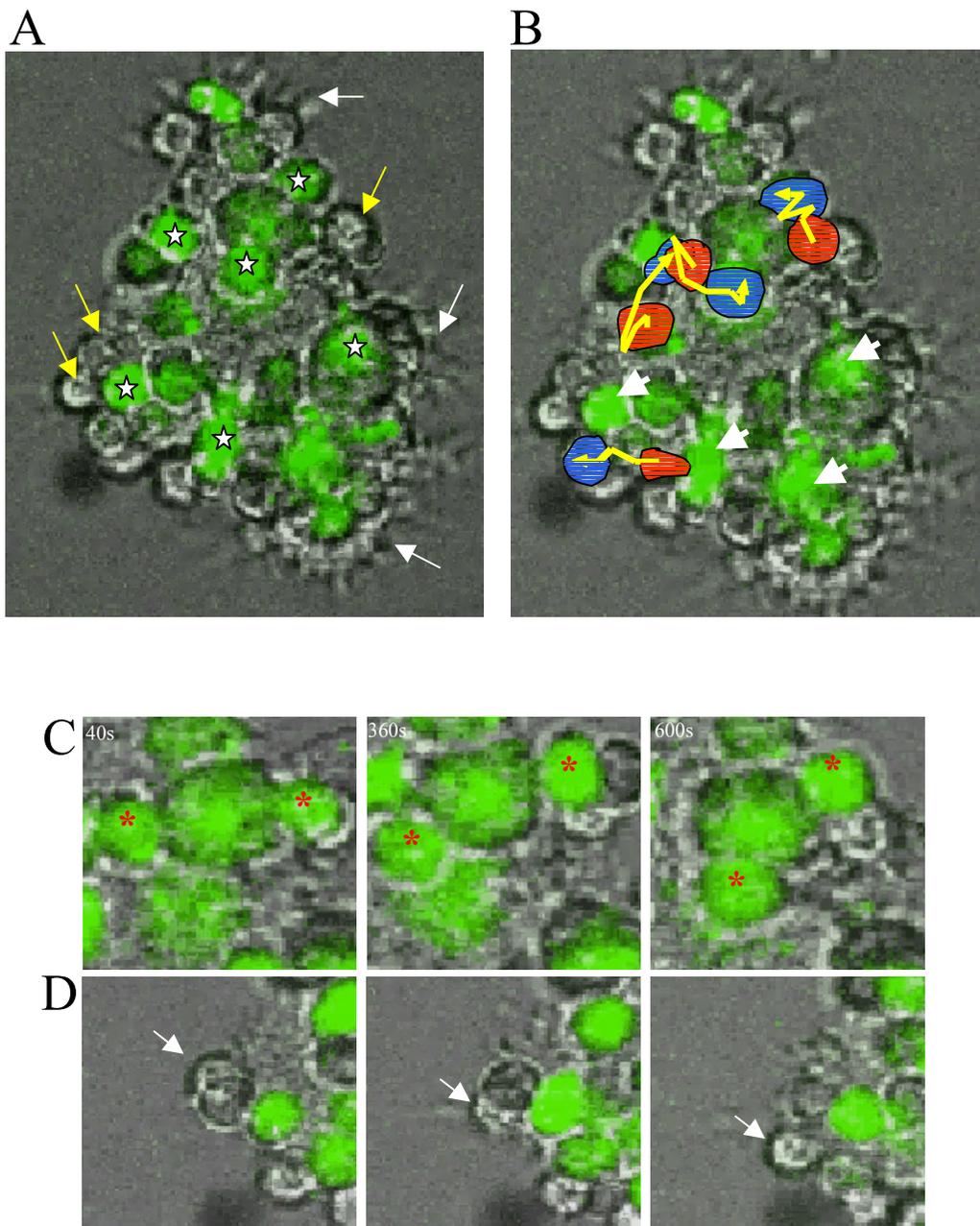
### **3.3. Sequenzielle, simultane und repetitive Kontakte dynamischer Interaktionen zwischen T-Zellen und DC in Zellclustern**

Die Analyse der Wanderpfade bewegter T-Zellen im Cluster zeigte, dass die migrierende T-Zelle vielgestaltige produktive und in der Abfolge komplexe Kontakte zu verschiedenen benachbarten DC aufnahm.

**a) Serielle Kontakte:** Serielle Kontaktübergänge vollzogen sich während des Übergangs von einer DC zur nächsten (Abb.14). Eine Ablösung von einer DC und zwischenzeitlicher Interposition zwischen T-Zellen ohne Kontakt zu einer DC wurde (wahrscheinlich aufgrund des relativ hohen Anteils an DC) nicht beobachtet, sodass während jeder Phase des DC Wechsels der Kontakt zu mindestens einer DC und damit das  $\text{Ca}^{2+}$ -Signal aufrechterhalten blieb (Abb. 13 A-C, 14, A-B). Siehe auch Filme 6 und 7.

**b) Simultane Kontakte:** Während des Wechsels einer T-Zelle zwischen zwei DC, aber auch unabhängig davon, kam es zu simultanen Kontakten einer T-Zelle zu zwei oder mehreren DC. Simultane Kontakte wurden für statische wie auch dynamische Interaktionen beobachtet (Abb. 13B, 13C, „550sec“, 14, B,2). Siehe auch Filme 6 und 7

## Farbtafel 5



### Abb. 12: Statische und dynamische Kontakte in einem Cluster.

Summationsbild aus Transmissionskanal, Fluoreszenzkanal sowie mehreren Tiefenschichten.

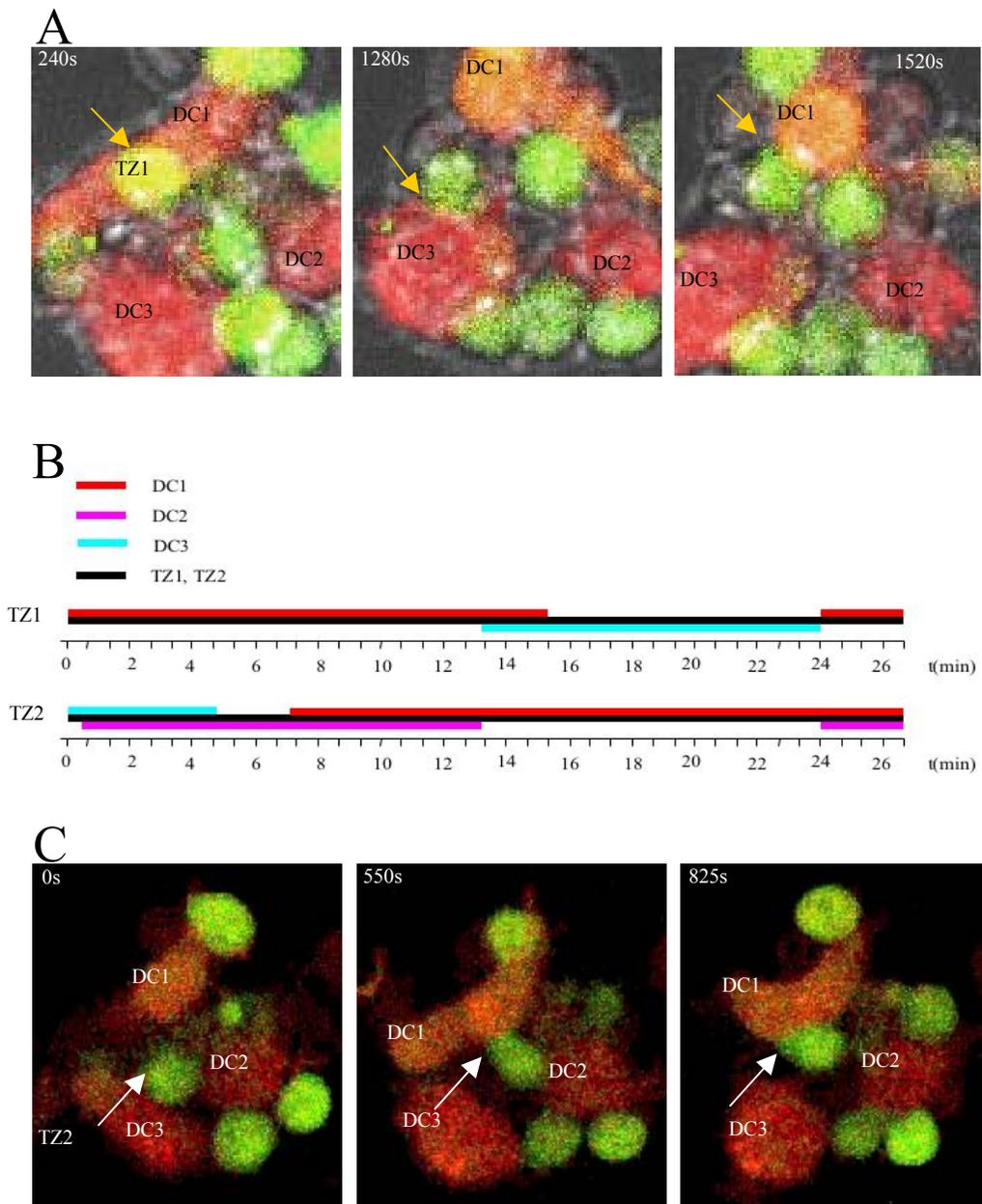
**(A)** Zellcluster aus 31 T-Zellen und 5 DC. T-Zellen ohne (gelbe Pfeile) und mit hohem  $Ca^{2+}$ -Signal (Sterne) sowie randständige Dendriten der DC (weiße Pfeile).

**B:** Die Wanderbewegung 4 signaltragender T-Zellen mit Start- (hellrot) und Endposition (blau) sowie dem Pfad selbst (gelbe Linie). Zeitgleich waren 4 stationäre signaltragende T-Zellen (weiße Pfeile) nachweisbar. Siehe auch Film 5.

**C:** Vergrößerter Ausschnitt aus A: Wandernde signaltragende Zellen (Sterne) im zeitlichen Verlauf.

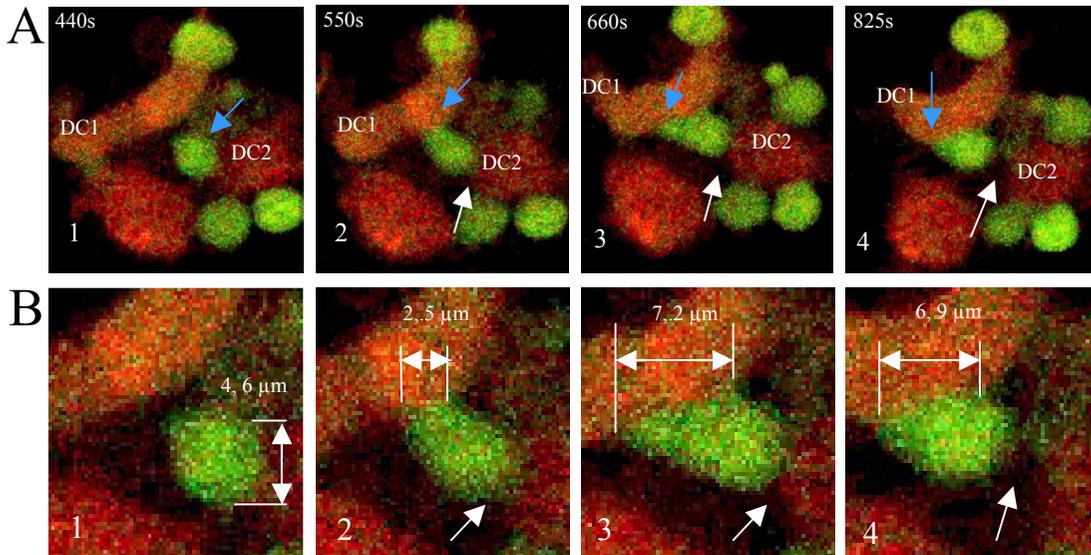
**D:** Vergrößerter Ausschnitt aus A: Wandernde signallose Zelle (weißer Pfeil) im zeitlichen Verlauf.

## Farbtafel 6



**Abb. 13: Serielle und simultane Kontakte zwischen T-Zellen und verschiedenen DC.** Bildsequenz aus Transmissions- und 2 Fluoreszenzkanälen (A) bzw. 2 Fluoreszenzkanälen der Schnittebene der maximalen Ausdehnung der T-Zelle (C). (B) Zeitaufgelöste Analyse der Interaktionen Fluo-3 beladener T-Zellen (schwarzer Balken) mit OVA-Peptid beladenen DC (roter, rosa oder blauer Balken). TZ1 (A, gelber Pfeil) wechselte von DC1 nach DC3 und wieder zurück auf DC1. TZ2 (C, weißer Pfeil) wechselte ihren Kontakt von DC3 über DC2 nach DC1. In beiden Sequenzen fanden die Wechsel innerhalb von 24min statt. Siehe auch Film 6, 7.

## Farbtafel 7



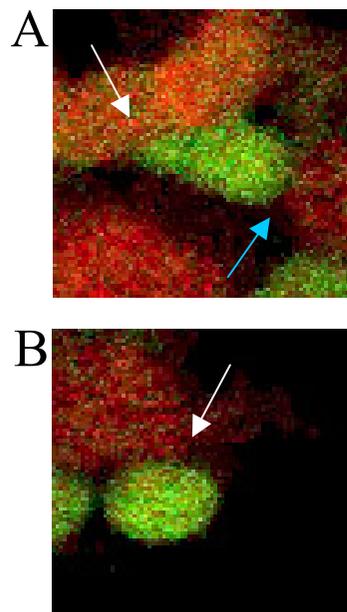
**Abb. 14: Sequenzieller Kontakt einer T-Zelle zu zwei OVA-Peptid gepulsten DC.**

Produktive  $\text{Ca}^{2+}$ -positive Interaktion einer zunächst abgerundet erscheinenden T-Zelle (A1, blauer Pfeil) mit DC2, gefolgt von einer Polarisierung der T-Zelle nach 110sec auf DC1 zu. Die Vorderfront (A2, blauer Pfeil) der T-Zelle bildete zunächst eine schmale Kontaktzone (B2) mit DC1 aus, während der hintere Teil der Zelle eine breite Kontaktzone mit DC2 aufrecht erhielt (B1 und 2, weißer Pfeil). Während dieses Übergangszustandes kam es zu einem transienten simultanen Kontakt der T-Zelle zu DC1 und DC2 (A2, B2). Nach weiteren 110sec Verbreiterung der Kontaktfläche der Vorderfront zu DC1 (A3, blauer Pfeil; B3) mit verringerter Kontaktbreite des Hinterendes zu DC2 (A3, B3, weißer Pfeil). Mit Auflösung des Kontaktes zu DC2 war der dynamische Übergang zu einem unilateralen Kontakt zu DC 1 nach weiteren 165sec abgeschlossen. Der Übergang der T-Zelle von DC2 zu DC1 vollzog sich in 385sec und entspricht einem sequentiellen Kontakt . Siehe auch Film 7.

**Abb. 15: Morphologie einer wandernden und einer sessilen T-Zelle im Cluster.**

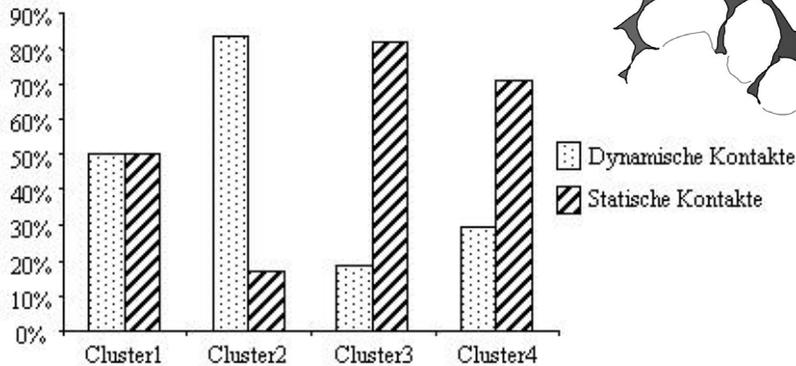
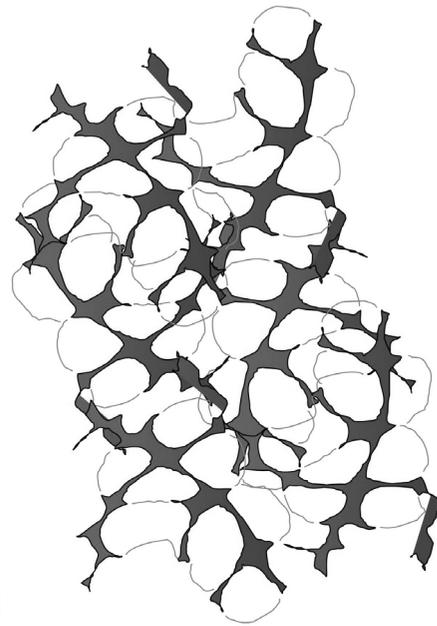
(A) Elongierte Morphologie während der Bewegung einer T-Zelle zwischen zwei DC. In der Filmsequenz war an der Vorderfront der polarisierten Zelle Pseudopodiendynamik darstellbar (weißer Pfeil), die die Wanderbewegung der Zelle vorwegnahm. Der hintere Teil der Zelle schloss rundlich ohne diskreten Uropod ab.

(B) Sessile T-Zelle mit abgerundeter Morphologie und unilateraler Kontaktfläche zur DC (weißer Pfeil). Ein starkes  $\text{Ca}^{2+}$ -Signal war für beide Morphologietypen nachweisbar.



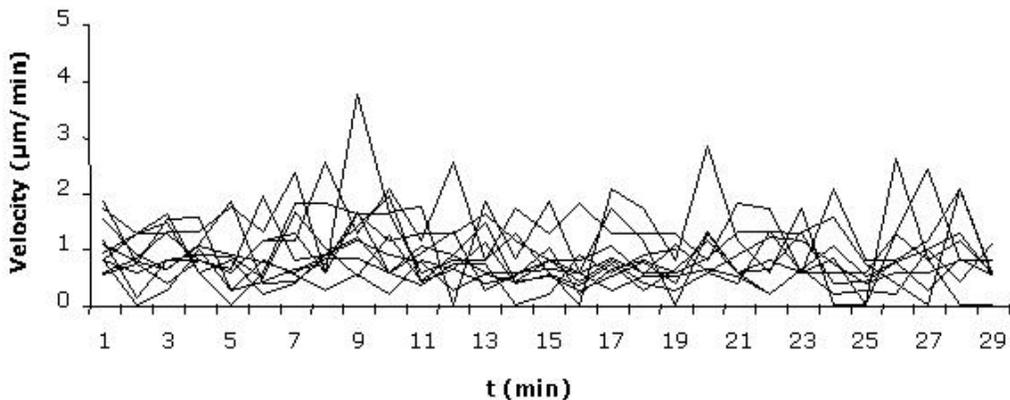
**Abb. 16: Modell eines Zellclusters mit Interzellularräumen.**

Augrund der dichten Aggregation von DC und T-Zellen bildet sich durch die Zellgrenzen eine morphologisch komplexe, gerüstähnliche 3D Struktur, entlang derer T-Zellen innerhalb des Clusters über Zellgrenzen hinweg migrieren können, ohne Kontakt zu OVA-Peptid beladenen DC zu verlieren.



**Abb. 17: Variable Verteilung von statischen und dynamischen Kontakten in unterschiedlichen Ansätzen.**

Dargestellt sind Daten von 4 Clustern aus 4 unabhängigen Experimenten. Berücksichtigt wurden ausschließlich T-Zellen mit hohem  $Ca^{2+}$ -Signal ab einer Pixelintensität von 120 relativen Einheiten.



**Abb. 18: Migrationsgeschwindigkeit von 11  $Ca^{2+}$ -positiven T-Zellen aus 4 unabhängigen Clustern.**

Die Migrationsgeschwindigkeit betrug im Durchschnitt  $0.82\mu\text{m}/\text{min}$  (Höchstwert  $4\mu\text{m}/\text{min}$ , Mindestwert  $0.18\mu\text{m}/\text{min}$ ), teils unterbrochen von kurzen Stopp-Phasen. In allen Fällen persistierte das  $Ca^{2+}$ -Signal während der Bewegung.

## 4. Diskussion

In 3D-Kollagenmatrix entwickeln sich zum überwiegenden Teil dynamische Kontakte zwischen DC und T-Zellen, die zu einer Aktivierung der T-Zellen führen.

Diese Arbeit zeigt nun, dass auch ECM-freie multizelluläre Cluster Umgebungsbedingungen liefern, die bei etwa 50% der spezifischen Kontakte zu produktiven dynamischen Interaktionen führen. Damit ergeben sich weitere Hinweise für die Anpassungsfähigkeit der T-Zellen, unterschiedliche physikalische Umgebungsbedingungen in morphodynamisch verschiedene Zell-Zell-Interaktionen umzusetzen, die zu einer Signaltransduktion führen.

### 4.1. Produktive $\text{Ca}^{2+}$ -Signalgebung während statischer und dynamischer Kontakte

In dieser Studie wurde dynamische Hellfeld- und Konfokalmikroskopie zur Detektion freier zytoplasmatischer  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen über fluoreszente Fluo-3-Kalzium-Komplexe eingesetzt. Dieses Verfahren erlaubt eine semiquantitative Analyse des  $\text{Ca}^{2+}$ -Signals, dessen Intensität neben der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration selbst von weiteren Faktoren wie beispielsweise Schwankungen der Laserleistung, schichtdickenabhängige Absorption von Photonen oder durch Ungenauigkeiten in der Präparation bedingte Schwankungen der Fluo-3-Konzentration beeinflusst werden kann. Da es in dieser Arbeit bei der  $\text{Ca}^{2+}$ -Detektion in erster Linie darum ging, spezifische Signale zu identifizieren und sie von unspezifischen Signalen zu differenzieren, war ein quantitatives Verfahren mit Aussagen über die absolute Konzentration freien zytoplasmatischen  $\text{Ca}^{2+}$  nicht notwendig. Durch Standardisierung der Aufnahme- und Analysemethoden konnte eine Reproduzierbarkeit der Signalintensitäten erzielt werden, die die Etablierung eines Trennwertes von 120 relativen Einheiten (RE) möglich machte, wobei es nur bei spezifischen Kontakten zu Intensitätswerten oberhalb dieses Wertes kam. Das um den Faktor 3-4 erhöhte Niveau des Fluoreszenzsignals von T-Zellen aus Clustern mit gepulsten DC im Vergleich zu T-Zellen aus Clustern mit ungepulsten DC ermöglichte reproduzierbar die Differenzierung des Signalniveaus spezifischer Kontakte gegenüber der relativ schwächeren  $\text{Ca}^{2+}$ -Signalintensität Antigen-unabhängiger Kontakte. Dies ist konsistent mit publizierten Daten von T-Zell-DC-Einzelkontakten in Flüssigkultur, die eine  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration von etwa 250 nM bei unspezifischen Kontakten und eine etwa 5-fach höhere Konzentration von 1220 nM bei spezifischen Kontakten zeigten (Delon et al., 1998).

Für eine interne Kontrolle zur Differenzierung von spezifischen und unspezifischen Kontakten in den einzelnen Clustern dienten Zellen mit T-Zellmorphologie und niedrigem  $\text{Ca}^{2+}$ -Signal (Pixelintensität  $< 120$  RE), dessen Niveau sich ebenfalls deutlich von dem der spezifischen Signale (Pixelintensität  $> 120$  RE) absetzte.

Diese Differenzierung entsprach dem 3-4fachen Anstieg innerhalb von 30 bis 60 Sekunden in naiven T-Zellen während einer Kontaktetablierung zu Ag-gepulsten DC. Hier spricht auch der frühe Zeitpunkt des Signalanstieges für einen spezifischen Kontakt, da unspezifische  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale deutlich verzögert etwa 5-10min nach Kontaktetablierung gemessen wurden (Delon et al., 1998; Revy et al., 2001).

Zusammengefasst konnte die hier verwendete Methode der semiquantitativen Analyse von intrazellulärem  $\text{Ca}^{2+}$  durch Standardisierung der Aufnahme- und Analyseverfahren zuverlässig das frühe Anregungssignal von T-Zellen während des spezifischen Kontaktes erfassen.

Die hier erstmalig durchgeführte hoch aufgelöste Bildgebung dynamischer Interaktionen zwischen T-Zelle und DC in Kollagenmatrices zeigte, dass bereits in der frühen Phase der Kontaktbildung über die Vorderfront der T-Zelle ein spezifischer Anstieg des  $\text{Ca}^{2+}$ -Signals auf 250RE erreicht wurde, ohne dass die übrigen Kompartimente der polarisierten T-Zelle an der Kontaktfläche beteiligt waren. Dieser Befund stimmt mit Daten von voraktivierten T-Zellen und B-Zellen in Flüssigkultur überein (Negulescu et al., 1996). Der fehlende weitere Anstieg des spezifisch erhöhten  $\text{Ca}^{2+}$ -Signales während der anschließenden Vergrößerung der Kontaktfläche und konsekutiven Einbeziehung des mittleren und hinteren Kompartimentes der weiterhin polarisierten Zelle legen nahe, dass bereits der sehr frühe Kontakt über die Vorderfront eine maximale TCR-Stimulation liefert. Somit wird auch im Matrixmodell frühzeitig und vor vollständiger Ausbildung einer immunologischen Synapse ein vollständiges  $\text{Ca}^{2+}$ -Signal erreicht, passend zu Daten der T-Zell/B-Zell-Interaktion in Flüssigkultur (Lee et al., 2002). Jedoch im Unterschied zu T-Zell/B-Zell-Interaktionen in Flüssigkultur (Dustin et al., 1997; Lee et al., 2002) führte der spezifische Kontakt dabei nicht zu einem Stopp der Migration und persistierenden adhäsiven Arrest der T-Zelle.

In der Phase der Ablösung der T-Zelle von der DC blieb das  $\text{Ca}^{2+}$ -Signal so lange kontinuierlich erhöht, wie ein punktueller Kontakt des T-Zell-Uropods zur DC-Oberfläche bestand, was das Vorhandensein funktioneller TCR-MHC II-Komplexe im Uropod nahe legt. Vor dem Hintergrund, dass der Uropod eine gegenüber der Vorderfront 4fach geringere Sensibilität für eine primäre Kontaktetablierung besitzt (Negulescu et al., 1996; Wei et al., 1999), kann das hohe ausschließlich über den Uropod vermittelte Signal darauf hinweisen,

dass im Verlauf dynamischer Kontakte mit der Migration der T-Zelle über die DC eine Einbeziehung des Uropods in die Signalzone erfolgt und somit die Kontaktzone mit produktiven TCR-MHC II-Bindungen in Richtung Uropod verschoben wird. Diese Verlagerung der Kontaktzone entspricht wahrscheinlich dem *contact spreading*, wie für Interaktionen aktivierter T-Zellen mit B-Zellen gezeigt (Costello et al., 2002). Hier könnte eine dynamische Darstellung der Kontaktzone mit einem molekularen Marker weitere wichtige Informationen liefern.

Die vollständige Ablösung von der DC führte zu einem weitgehenden Verlust des  $\text{Ca}^{2+}$ -Signals in der T-Zelle, passend zur vollständigen Auflösung produktiver TCR-MHC II-Komplexe. Eine kürzlich veröffentlichte Studie mit T-Zellen und MHC-tragenden Fibroblasten als APC gibt jedoch Hinweise darauf, dass es auch zu einem MHC-Transfer von der APC zur abgelösten T-Zelle kommen kann und somit eine Autostimulation nach Ablösung der T-Zelle über die transferierten MHC-Moleküle möglich wäre (Wetzel et al., 2005). Die für diesen Fall zu erwartende Persistenz des  $\text{Ca}^{2+}$ -Signales nach Ablösung der T-Zelle konnte in der vorliegenden Arbeit jedoch nicht bestätigt werden.

Insgesamt zeigen die Daten der hoch aufgelösten Darstellung der T-Zellaktivierung in der 3D-Kollagenmatrix eine dynamische Interaktion der Antigenpräsentation. Im Verlauf aller drei Phasen der dynamischen Interaktion zeigte die T-Zelle eine polare Morphologie, migratorische Aktivität und erhöhtes  $\text{Ca}^{2+}$ -Signal. Während ein spezifisches  $\text{Ca}^{2+}$ -Signal ausschließlich von der Vorderfront der T-Zelle initiiert wurde, waren im Kontaktverlauf alle weiteren Kompartimente der polarisierten T-Zelle einschließlich Längsachse des Zellkörpers wie auch der Uropod in der Lage das  $\text{Ca}^{2+}$ -Signal über den Kontakt zur DC aufrecht zu erhalten.

Die erstmalige Beobachtung der Antigenpräsentation von  $\text{CD4}^+$  T-Zellen in ECM-freien multizellulären Clustern ergab erhöhte  $\text{Ca}^{2+}$ -Signalwerte in wechselnden Anteilen sowohl in polarisierten wandernden T-Zellen als auch in einem Anteil von stabil adhärennten T-Zellen, die polar mit DC interagierten. Der Vergleich des  $\text{Ca}^{2+}$ -Signals zwischen statischen und dynamischen Kontakten ergab interessanterweise keinen Unterschied der Signalthöhe. In der Zusammenschau zeigen die Daten, dass ein hohes  $\text{Ca}^{2+}$ -Signal in gleicher Weise für dynamische T-Zell-DC-Kontakte in 3D-Kollagenmatrices und dynamischen wie auch statischen Interaktionen in ECM-freien multizellulären T-Zell-DC-Aggregaten aufrechterhalten wird und somit von der Morphodynamik der Interaktion unabhängig ist. Dies impliziert, dass T-Zellen sehr unterschiedliche physikalische Grundbedingungen in

Signaltransduktion „übersetzen“ können und widerlegt das Konzept, dass ein Stoppsignal Voraussetzung für antigenspezifische Signaltransduktion ist.

#### 4.2. Diversität der Kontaktdynamik in Kollagen/ECM-freien Zellclustern

Bisher wurden dynamische Kontakte hauptsächlich in Kollagenmatrix bzw. im Lymphknoten lebender Mäuse *in vivo* dargestellt. Die Frequenz dynamischer Kontakte war hoch, weniger als 10% der Kontakte in Kollagenmatrix waren statisch (Gunzer et al., 2000). Dagegen zeigt sich in Flüssigkultur auf Objektträgern eine reduzierte Dynamik des T-Zell-APC-Kontaktes. So wandern unter diesen Kulturbedingungen 25% der T-Zellen auf transfizierten MHC tragenden Fibroblasten durchschnittlich 5min nach Kontaktetablierung und Ausbildung einer Synapse (Wetzel et al., 2002). Auch bei Kontakten von voraktivierten T-Zellen zu DC auf Objektträgern ist bei hohem  $Ca^{2+}$ -Signal eine anhaltende, wenn auch reduzierte Mobilität der T-Zellen beschrieben worden (Montes et al., 1998). Auf planaren Bilayern hingegen sistierte die Wanderung von T-Zellen spontan nach Bindung an MHC II-Moleküle und folgendem  $Ca^{2+}$ -Signalanstieg, so dass eine vollständige T-Zell-Immobilisierung erreicht wurde (Dustin et al., 1997).

Dem Ziel dieser Studie, dynamische Kontakte in multizellulären Clustern zwischen T-Zellen und dendritischen Zellen nachzuweisen, lagen folgende Hypothesen zugrunde:

1. Ein wichtiger Faktor für das Zustandekommen dynamischer Interaktionen ist das Angebot eines 3D-Gerüsts extrazellulärer Matrix, das Zellbewegung fördert.
2. Die Zellmembranen aggregierter Cluster-bildender Zellen bilden selbst eine komplexe 3D-Struktur aus, die als Gerüst auch ohne ECM das Wechselspiel zwischen Zellbewegung und koordinierter Positionierung erlauben könnte.

Tatsächlich konnten in multizellulären Clustern in 45% der beobachteten Kontakte dynamische Interaktionen mit einer Nettobewegung der T-Zellen nachgewiesen werden. Die Bewegungsgeschwindigkeit lag mit 1-2 $\mu$ m/min orientierend etwa 50% niedriger als bei dynamischen Kontakten in der Kollagenmatrix. In 55% der Kontakte zeigten die T-Zellen entweder die Morphologie einer statischen Synapse oder führten kleine Pseudopodienbewegungen bei abgerundeter Morphologie aus, ohne dass eine Nettobewegung erreicht wurde.

Wie kommt es zu dieser Diversität der Morphodynamik in Zellclustern verglichen mit der hohen Rate an dynamischen Kontakten in der Kollagenmatrix?

Ein möglicher Grund könnte in dem Mechanismus der Kontaktentstehung liegen: Während der Kontakt zwischen DC und T-Zelle im Kollagengel, in dem die Zellen überwiegend vereinzelt und mit grösserer Distanz zueinander eingebettet sind, nur durch aktive Migration entweder der T-Zelle oder der DC initiiert wird, entstehen experimentelle multizelluläre Cluster - und damit die T-Zell-DC-Kontakte - durch Treiben der Zellen im Konvektionsstrom und nachfolgend überwiegend passiver Aggregation. Somit werden spontan motile wie auch nicht motile T-Zellen in Kontakte einbezogen. In Migrationsstudien an T-Zellen in 3D-Kollagenmatrices teilte sich die T-Zellpopulation in variabel grosse Fraktionen spontan migrierender (15-50%) und nicht migrierender, statischer T-Zellen (Friedl et al., 1995, 1998; Entschladen et al., 1997). So findet in 3D-Kollagenmatrices sowie in vivo eine Vorselektion ausschließlich migrierender Zellen statt, während in Flüssigkultur eine zufällige Mischung spontan migrierender wie auch immobiler T-Zellen einbezogen wird, die sich in der Heterogenität des Interaktionsmusters widerspiegeln könnte.

Die geringere Migrationsgeschwindigkeit und auch der geringere Grad der Polarisierung der T-Zellen in 3D-Clustern im Vergleich zu T-Zellen in der Kollagenmatrix lassen vermuten, dass neben dem oben beschriebenen Mechanismus der passiven Zellaggregation auch ein geringerer promigratorischer Reiz ausgeht oder die wahrscheinlich weniger stabile oder rigide Binnenstruktur aggregierter Zellen ein weniger geeignetes Migrationssubstrat darstellt. Vom planaren Bilayer über Einzelzellkontakte, dem Zellcluster bis hin zur Kollagenmatrix oder dem Lymphknoten besitzen die physikalischen Umgebungsbedingungen eine ansteigende räumliche Komplexität und Stabilität. Stellt man diesen unterschiedlichen räumlichen Umgebungsbedingungen die Dynamik der Zellkontakte gegenüber, ergibt sich eine zunehmende Dynamik der Zellkontakte mit ansteigender räumlicher Komplexität und Stabilität. Diese dynamischen Kontakte können sowohl von 3D-Kollagenfasern aber auch – ggf. etwas weniger effizient – von der Binnenstruktur eines aggregierten Zellcluster resultieren.

#### **4.3. Bestätigung des seriellen Kontaktmodells für ECM-freie Cluster**

Die Befunde dieser Arbeit zeigen weiterhin, dass in Flüssigkultur T-Zellen und DC spontan aggregieren und ein Spektrum unterschiedlicher Interaktionsstrategien entwickeln. Dies reicht

von der Ausbildung einer statischen adhäsiven Bindung bis hin zur dynamischen Interaktion. Die Diversität impliziert, dass kurzlebige und dynamische wie auch langlebige und eher statische Interaktionen zu AG-spezifischer Signaltransduktion verarbeitet werden können. Da auch in ECM-freien Clustern T-Zellen regelmäßig von DC zu DC übergehen und somit Kontaktbildung und -lösung einen kontinuierlichen Prozess darstellen, liegt es nahe, dass ein Großteil der Interaktionen in multizellulären Clustern dem seriellen Kontaktmodell folgt. In diesem Versuchsansatz wurde eine homogene Population Peptid-gepulster DC verwendet, sodass eine Signalunterbrechung infolge Kontaktauflösung und Wechsel zu einer nicht Antigen tragenden DC nicht beobachtet werden konnte. Es ist wahrscheinlich, dass in vivo bei niedrigerem Anteil AG-spezifischer DC während des migratorischen Wechsels eine Sequenz aus kurzen, niedrigen (unspezifischen) und hohen (spezifischen) Anregungssignalen resultiert. Diese Sequenz könnte die DC-Frequenz und die Verteilung des Antigens in der DC-Population in gepulster Form abbilden und damit von der Antigenbelastung des Organismus abhängen. Denkbar ist auch ein Schwellenwert des Anteiles spezifischer Signale, um mögliche fehlerhafte Aktivierungen zu vermeiden.

#### **4.4. Ausblick: Darstellung der LK Matrixsituation in vivo mit Multiphotonenmikroskopie**

Die Diversität der Interaktionen, wie hier für Kollagenmatrices und Cluster gezeigt, wurden jüngst durch in vivo Bildgebung bestätigt (Mempel et al., 2004; Miller et al., 2004). In beiden Arbeiten wurden drei Phasen der Zellinteraktion beschrieben. In der frühen Phase wurden hoch dynamische Interaktionen zwischen DC und T-Zelle mit multiplen seriellen Kontakten beobachtet, während in der anschließenden Phase, einige Stunden nach Eintritt der T-Zellen in den Lymphknoten, sich eher stabile Zellcluster ausbildeten mit reduzierter, aber nicht aufgehobener Dynamik (Mempel et al., 2004; Miller et al., 2004). Verglichen mit der Dynamik im Lymphknoten sind beide im Rahmen dieser Arbeit eingesetzten Modelle geeignet, unter kontrollierten in vitro Bedingungen molekular und topographisch in vivo-ähnliche Befunde zu liefern, auch wenn die Synchronisierung der Phasen weniger stringent abgebildet wird. Die Daten dieser Arbeit legen nahe, dass die wahrscheinlich wichtigste gemeinsame Bedingung das Vorliegen von 3D-Strukturen ist, die Migration, Positionierung und Loslösung von Zell-Zell-Interaktionen mittels amöboider Mechanismen erlauben. Zukünftige Studien sind notwendig, um zu klären, in wie weit Modifikationen dieser

Interaktionscharakteristika auch zur Differenzierung, Effektorfunktion und/oder Anergie von T-Zellen beitragen.

## 5. Zusammenfassung

Die Interaktion von CD4<sup>+</sup> T-Zellen mit antigenpräsentierenden dendritischen Zellen (DC) verläuft in statischen und dynamischen Phasen, die jeweils zur Ausbildung einer immunologischen Synapse und T-Zell-Aktivierung führen. Um die Signalgebung in den stabilen wie auch dynamischen Phasen näher zu charakterisieren, wurde der Kalziumeinstrom während der T-Zell-Aktivierung zeitaufgelöst untersucht. Dies wurde in 3D Kollagenmatrices und zusätzlich in 3D Zellclustern durchgeführt, um zu klären, ob sich dynamische produktive Kontakte auch in kollagenfreien, räumlich komplexen Mikromilieus ausbilden.

Kokulturen aus murinen, naiven CD4<sup>+</sup> T-Zellen (DO 11.10) und Ova-Peptid beladenen DC (BALB/c) in 3D Kollagenmatrix sowie die T-Zell/DC Cluster in Flüssigkultur wurden mittels Konfokalmikroskopie gefilmt. Die Zelldynamik wurde digital analysiert. Der Ca<sup>2+</sup>-Einstrom der T-Zellen wurde mittels zeitaufgelöster Fluo 3-Detektion semiquantitativ analysiert.

Sowohl im Kollagengel wie auch in Flüssigkulturen erfolgte wenige Sekunden nach der initialen Kontaktaufnahme über die Vorderfront der T-Zelle ein starker Ca<sup>2+</sup>-Einstrom in die T-Zelle. Das Signal blieb während der gesamten Interaktion und der Ablöse-Phase, solange der Uropod der T-Zelle mit der DC verbunden war, kontinuierlich erhöht.

In den sich spontan bildenden multizellulären Clustern erbrachte die morphodynamische Analyse von Kontakten Ca<sup>2+</sup>-positiver T-Zellen je 50% dynamische bzw. stabil-statische Kontakte, zu deren Dynamik sowohl die T-Zellen als auch die DC beitrugen. Die Geschwindigkeit der dynamischen Kontakte betrug ca. 4 µm/min (1-6 µm/min) und lag damit ca. 50-90% unterhalb der Geschwindigkeit der freien Migration im Kollagen. Analog zu Interaktionen im 3D Kollagengel wurden für Ca<sup>2+</sup>-positive T-Zellen produktive serielle und teils simultane Kontakte mit mehreren DC nachgewiesen.

Der Nachweis dynamischer produktiver Kontakte in kollagenfreien Zellclustern legt einen promigratorischen Effekt der umgebenden räumlichen Komplexität selbst nahe. Das Spektrum von statischen und dynamischen Interaktionsphasen in Abhängigkeit von der räumlichen Komplexität repräsentiert so eine inhärente Eigenschaft der Zelldynamik von T-Zellen und bildet Teilaspekte des in vivo Verhaltens von T-Zellen in Lymphknoten ab. Zukünftige Studien sind notwendig, um zu klären, wie Interaktionscharakteristika auch zur Differenzierung, Effektorfunktion und/oder Anergie von T-Zellen beitragen.

## 5. Literatur

Bousoo, P., Bhakta, N.R., Lewis, R.S., Robey, E., **2002**, Dynamics of thymocyte-stromal cell interactions visualized by two-photon microscopy. *Science*, 296, 1876-1880.

Costello, P.S., Gallagher, M., Cantrell, D.A., **2002**, Sustained and dynamic inositol lipid metabolism inside and outside the immunological synapse. *Nat. Immunol.* 3, 1082-1089.

Delon, J., Bercovici, N., Raposo, G., Liblau, R., Trautmann, A., **1998**, Antigen-dependent and -independent Ca<sup>2+</sup> responses triggered in T cells by dendritic cells compared with B cells. *J. Exp. Med.*, 188, 1473-1484.

Dustin, M.L., Bromley, S.K., Kan, Z., Peterson, D.A., Unanue, E.R., **1997**, Antigen receptor engagement delivers a stop signal to migrating T lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94, 3909-3913

Dustin, M.L., Allen, P.M., Shaw, A.S., **2001**, Environmental control of immunological synapse formation and duration. *Trends. Immunol.*, 22, 187-191.

Dustin, M.L., **2003**, Coordination of T cell activation and migration through formation of the immunological synapse. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 987, 51-59.

Entschladen, F., Niggemann, B., Zänker, K.S., Friedl, P., **1997**, Differential requirement of protein tyrosine kinases and protein kinase C in the regulation of T cell locomotion in three-dimensional collagen matrices. *J. Immunol.*, 159, 3203-3210.

Friedl, P., Noble, P.B., Zänker, K.S., **1995**, T lymphocyte locomotion in a three-dimensional collagen matrix. Expression and function of cell adhesion molecules. *J. Immunol.*, 154, 4973-4985.

Friedl, P., Entschladen, F., Conrad, C., Niggemann, B., Zänker, K.S., **1998**, CD4<sup>+</sup> T lymphocytes migrating in three-dimensional collagen lattices lack focal adhesions and utilize  $\beta$ 1 integrin-independent strategies for polarization, interaction with collagen fibers and locomotion. *Eur. J. Immunol.*, 28, 2331-2343.

Friedl, P., Gunzer, M., **2001**, Interaction of T cells with APCs: the serial encounter model. *Trends. Immunol.*, 22, 192-194.

Grakoui, A., Bromley, S.K., Sumen, C., Davis, M.M., Shaw, A.S., Allen, P.M., Dustin, M.L., **1999**, The immunological synapse: a molecular machine controlling T cell activation. *Science*, 285, 221-227.

Gunzer, M., Schafer, A., Borgmann, S., Grabbe, S., Zänker K.S., Brocker, E.B., Kampgen, E., Friedl, P., **2000**, Antigen presentation in extracellular matrix interactions of T cells with dendritic cells are dynamic, short lived, and sequential. *Immunity*, 13, 323-332.

- Gunzer, M., Weishaupt, C., Hillmer, A., Basoglu, Y., Friedl, P., Dittmar, K.E., Kolanus, W., Varga, G., Grabbe, S., **2004**, A spectrum of biophysical interaction modes between T cells and different antigen-presenting cells during priming in 3D collagen and in vivo. *Blood*, 104, 2801-2809.
- Imboden, J.B., Stobo, J.D., **1985**, Transmembrane signalling by the T cell antigen receptor. Perturbation of the T3-antigen receptor complex generates inositol phosphates and releases calcium ions from intracellular stores. *J. Exp. Med.*, 161, 446-456.
- Inaba, K., Witmer, M.D., Steinmann, R.M., **1984**, Clustering of dendritic cells, helper T lymphocytes, and histocompatible B cells during primary antibody responses in vitro. *J. Exp. Med.*, 160, 858-876.
- Jayaraman, T., Ondriasova, E., Ondrias, K., Harnick, D.J., Marks, A.R., **1995**, The inositol 1,4,5-trisphosphate receptor is essential for T-cell receptor signalling. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92, 6007-6011.
- Lee, K.H., Holdorf, A.D., Dustin, M.L., Chan, A.C., Allen, P.M., Shaw, A.S., **2002**, T cell receptor signalling precedes immunological synapse formation. *Science*, 295, 1539-1542.
- Mempel, T.R., Henrickson, S.E., Von Andrian, U.H., **2004**, T cell priming by dendritic cells in lymph nodes occurs in three distinct phases. *Nature*, 427, 154-159
- Miller, M.J., Safrina, O., Parker, I., Cahalan, M.D., **2004**, Imaging the single cell dynamics of CD4<sup>+</sup> T cell activation by dendritic cells in lymph nodes. *J. Exp. Med.*, 200, 847-856.
- Montes, M., McIlroy, D., Hosmalin, A., Trautmann, A., **1999**, Calcium responses elicited in human T cells and dendritic cells by cell-cell interaction and soluble ligands. *Int. Immunol.* 11, 561-568.
- Murphy, K.M., Heimberger, A.B., Loh, D.Y., **1990**, Induction by antigen of intrathymic apoptosis of CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, TCRlo thymocytes in vivo. *Science*, 250, 1720-1723.
- Negulescu, P.A., Krasieva, T.B., Khan, A., Kerschbaum, H.H., Cahalan, M.D., **1996**, Polarity of T cell shape, motility, and sensitivity to antigen. *Immunity*, 4, 421-430.
- Revy, P., Sospedra, M., Barbour B., Trautmann, A., **2001**, Functional antigen-independent synapsis formed between T cells and dendritic cells. *Nat. Immunol.*, 2, 925-931.
- Shimizu, Y., van Seventer, G.A., Horgan, K.J., Shaw, S., **1990**, Roles of adhesion molecules in T cell recognition: fundamental similarities between four integrins on resting human T cells (LFA-1, VLA-4, VLA-5, VLA-6,) in expression, binding, and costimulation. *Immunol. Rev.*, 114, 109-143.
- Van der Merve, P.A., Davis, J.S., Shaw, A.S., Dustin, M.L., **2000**, Cytoskeletal polarization and redistribution of cell surface molecules during T-cell antigen recognition. *Sem. Immunol.*, 12, 5-21.
- Wei, X., Tromberg, B.J., Cahalan, M.D., **1999**, Mapping the sensitivity of T cells with an optical trap: polarity and minimal number of receptors for Ca<sup>2+</sup> signalling. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96, 8471-8476.

Wetzel, S.A., McKeithan, T.W., Parker, D.C., **2005**, Peptide-specific intercellular transfer of MHC class II to CD4<sup>+</sup> T cells directly from the immunological synapse upon cellular dissociation. *J. Immunol*, 174, 80-89.

Wetzel, S.A., McKeithan, T.W., Parker, D.C., **2002**, Live-cell dynamics and the role of costimulation in immunological synapse formation. *J. Immunol*, 169, 6092-6101.

## Abbildungsverzeichnis

- Abb. 1: T-Zell-Aktivierung: Signaltransduktion
- Abb. 2: Anreicherung CD4<sup>+</sup> Lymphozyten nach Passage über Nyloensäule
- Abb. 3: Anreicherung der CD4<sup>+</sup> Lymphozyten nach Magnetdepletion
- Abb. 4: Maturation dendritischer Zellen
- Abb. 5: Digitale Bildrekonstruktion anhand veränderlicher Detektionsebenen dreidimensionaler Zellcluster über die Zeit.
- Abb. 6: Semiquantitative Messung der Fluo-3 Fluoreszenzintensität in T-Zellen eines Zell-Aggregats.
- Abb. 7: Nachweis spezifischer Kontakte in multizellulären T-Zell-Clustern mittels Fluo-3.
- Abb. 8: Kontaktaufnahme einer T-Zelle in 3D Kollagenmatrix.
- Abb. 9: Interaktion von T-Zellen mit OVA-Peptid beladenen DC im Flüssigkultur: Kontaktaufnahme und frühes Ca<sup>2+</sup> Signal.
- Abb. 10: Scanning, Ablösephase und stabile Interaktionen im multizellulären Cluster zwischen vier T-Zellen und einer DC in einer 3D Kollagenmatrix.
- Abb. 11: Uropod-mediertes persistierendes Ca<sup>2+</sup> Signal während der Ablösephase.
- Abb. 12: Statische und dynamische Kontakte in einem Cluster.
- Abb. 13: Serielle und simultane Kontakte zwischen T-Zellen und verschiedenen DC.
- Abb. 14: Sequenzieller Kontakt einer T-Zelle zu zwei OVA-Peptid gepulsten DC.
- Abb. 15: Morphologie einer wandernden und einer sessilen T-Zelle im Cluster.
- Abb. 16: Modell eines Zellclusters mit Interzellularräumen.
- Abb. 17: Variable Verteilung von statischen und dynamischen Kontakten in unterschiedlichen Ansätzen.
- Abb. 18: Migrationsgeschwindigkeit von 11 Ca<sup>2+</sup>-positiven T-Zellen aus 4 unabhängigen Clustern.

## Filmverzeichnis

- Film 1: Kontaktaufnahme einer T-Zelle zu einer Peptid tragenden DC in Kollagenmatrix.  $\text{Ca}^{2+}$ -Signalanstieg nach Sekunden (grüne Fluoreszenz). Siehe auch Abb. 8.
- Film 2: Interaktion von T-Zellen mit OVA-Peptid beladenen DC im Flüssigkultur: Kontaktaufnahme und frühes  $\text{Ca}^{2+}$ -Signal. Siehe auch Abb. 9.
- Film 3: Scanning, Ablösephase und stabile Interaktionen im multizellulären Cluster zwischen vier T-Zellen und einer DC in einer 3D Kollagenmatrix. Im ersten Teil Transmissionskanal mit zwei Fluoreszenzkanälen (rot: Cell Tracker Orange-DC, grün Fluo-3-T-Zelle) im zweiten Teil Reflexionslichtkanal mit Fluo-3-Fluoreszenzkanal. Siehe auch Abb. 10.
- Film 4: Ablösephase einer T-Zelle von einer DC in Kollagenmatrix: Persistierendes Uropod-mediiertes  $\text{Ca}^{2+}$ -Signal. Siehe auch Abb. 11.
- Film 5: Multizellulärer Cluster aus  $\text{CD} 4^+$  T-Zellen und Ovapeptid tragenden DC: Statische und dynamische Kontakte bei hohen und niedrigen  $\text{Ca}^{2+}$ -Signal. Siehe auch Abb. 12.
- Film 6: Statische und dynamische Kontakte in einem Cluster mit Nachweis serieller Kontakte Siehe auch Abb. 13 und 14.
- Film 7: Rekonstruktion der Wanderung einer Zelle während serieller Kontakte zu drei DC Siehe auch Abb. 13 und 14.

## **Danksagung**

Mein Dank gilt Frau Prof. Dr. E.-B. Bröcker, deren freundliche Unterstützung die Erstellung dieser Arbeit ermöglichte.

Besonders bedanken möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. P. Friedl, der mir ein exzellenter Betreuer und prägender Lehrer in Fragen wissenschaftlicher Methodik und wissenschaftlichen Arbeitens war.

Ich bedanke mich herzlich bei Martina Jossberger für die freundschaftliche Zusammenarbeit im Labor.

Und schließlich danke ich für Anregungen und kritisches Lesen des Manuskriptes Regina Schläger und Drs. Klaus und Richard Kretzschmar.

## Lebenslauf

Martin Kretzschmar  
Sennheimer Strasse 11  
4054 Basel, Schweiz  
e-Mail: martkretzschmar@aol.com

## Ausbildung

2003-2005	Universitätsspital Basel, Diagnostische Radiologie Ausbildung zum Facharzt für Radiologie	Basel, Schweiz
1996-2003	Universität Witten-Herdecke Studium der Medizin	Witten
2003	3. Staatsexamen	Witten-Herdecke
2001	2. Staatsexamen	Witten-Herdecke
1999	1. Staatsexamen	Witten-Herdecke
1998	Physikum	Witten-Herdecke
1988-1995	Hochschule der Künste Berlin Diplomstudium für Klaviermusik	Berlin
1995	Diplom für Klaviermusik	Berlin
1986-1988	Kopernikusgymnasium	Rheine
1988	Abitur	Rheine

## Forschung

2001-2002	Doktorarbeit an der Klinik für Dermatologie der Universität zu Würzburg Arbeitsgruppe Zellmigration	Würzburg
-----------	---	----------

## **Erklärung**

Hiermit erkläre ich ehrenwörtlich, dass ich die Dissertation selbständig angefertigt habe, und keine anderen Quellen, und Hilfsmittel, als die von mir angegebenen, benutzt habe. Diese Dissertation ist von mir nicht, weder vollständig, noch teilweise, einer anderen Fakultät vorgelegt worden mit dem Ziel einen akademischen Grad zu erwerben. Ich habe bisher keine akademischen Grade erworben oder versucht zu erwerben.

Basel, den 16.05.05