

Aus dem Bereich Physiologie

Theoretische Medizin und Biowissenschaften

der Medizinischen Fakultät

der Universität des Saarlandes, Homburg (Saar)

Quantifizierung der Fusion von CD63-positiven Vesikeln durch murine cytotoxische T- Lymphozyten mittels Echtzeit-Mikroskopie

Dissertation zur Erlangung des medizinischen Doktorgrades

der Medizinischen Fakultät

der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

2024

vorgelegt von

Ruth Rasuli

Geboren am 22. März 1993 in Tübingen

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abkürzungsverzeichnis	V
Abbildungsverzeichnis	VIII
Tabellenverzeichnis	IX
1 Zusammenfassung.....	1
1.1 In deutscher Sprache	1
1.2 Summary of „Quantification of the fusion of CD63-positive vesicles by murine cytotoxic T-cells using real-time microscopy“	2
2 Einleitung.....	4
2.1 Das Immunsystem	4
2.1.1 Cytotoxische T-Lymphozyten	5
2.1.2 Immunologische Synapse	6
2.1.3 Cytotoxische Granula	7
2.2 Extrazelluläre Vesikel und Exosomen.....	8
2.2.1 Biogenese von Exosomen.....	9
2.2.2 Marker und Inhalte von Exosomen	10
2.2.3 Funktion von Exosomen	11
2.2.4 Exosomen im Immunsystem	12
2.2.5 Cytotoxische T-Zellen und Exosomen.....	13
2.3 Ziel der Arbeit	14
3 Material und Methoden	16

3.1	Material	16
3.1.1	Genutzte Chemikalien	16
3.1.2	Genutzte kommerzielle Kits	17
3.1.3	Kommerzielle Antikörper	18
3.1.4	Medien und Lösungen	18
3.1.5	Mausstämme	21
3.1.6	Plasmide	22
3.2	Methoden	23
3.2.1	Positive Isolierung von CD8-positiven T-Zellen	23
3.2.2	Aktivierung von naiven CD8-positiven T-Zellen	25
3.2.3	Zellkultur	25
3.2.4	Transfektion von Zellen mittels Elektroporation	25
3.2.5	Beschichten der Deckgläser	26
3.2.6	Fixieren von Zellen und direkte Immunmarkierung	26
3.2.7	“Structured Illumination“- Mikroskopie	27
3.2.8	Interne Totalreflexionsfluoreszenzmikroskopie	28
3.2.9	Genutzte Software	29
3.2.10	Analyse der Daten	29
3.2.11	Statistik	30
4	Ergebnisse	31
4.1	Ko-Lokalisation zwischen CD63-pHuji, CD81-pHluorin und Granzym B	31

4.2	Interne Totalreflexionsfluoreszenzmikroskopie zur Untersuchung der Fusion CD63-pHuji positiver Vesikel an der Immunsynapse	33
4.3	Calcium als Trigger der Fusion CD63-pHuji positiver Vesikel	36
4.4	Position der Fusion CD63-pHuji positiver Vesikel in der Immunsynapse	37
4.5	Fusionsereignisse von CD63-pHuji positiven Vesikeln und Granzym B-mTFP	42
5	Diskussion	46
5.1	Höhere Ko-Lokalisation zwischen CD63 und Granzym B als zwischen CD63 und CD81	46
5.2	Variable Verweilzeiten von CD63-pHuji positiven Vesikeln an der Immunsynapse vor Fusion	47
5.3	Zwei Typen von CD63-pHuji positiven Fusionsereignissen	48
5.4	Calcium ist ein Trigger für CD63-pHuji positive Fusionsereignisse	50
5.5	CD63-pHuji positive Fusionsereignisse finden vor allem im Zentrum des Aktin-Rings statt	51
5.6	Einteilung der CD63-pHuji positiven Fusionsereignisse	52
6	Literaturverzeichnis	55
7	Danksagung	63
8	Lebenslauf/Vita	64

Für meinen Mann und meine Eltern

Abkürzungsverzeichnis

Alix	Apoptosis-linked gene-2 (ALG-2) interacting protein X
APC	Antigenpräsentierende Zelle, engl. antigen presenting cell
AU	Beliebige Einheiten, engl. arbitrary units
BSA	Bovines Serumalbumin
Ca ²⁺	Calcium
CaCl ₂	Calciumchlorid
CAR	Chimärer Antigenrezeptor
CD	Cluster of differentiation
CG	Cytotoxische Granula
CTL	Cytotoxische T-Zelle, cytotoxischer T-Lymphozyt
DC	Dendritische Zelle, engl. dendritic cell
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dsDNA	Doppelstrang-DNA
mtDNA	Mitochondriale DNA
DPBS	Dulbeccos Phosphatgepufferte Kochsalzlösung, engl. Dulbeccos Phosphate Buffered Saline
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ESCRT	endosomal sorting complex required for transport
EVs	Extrazelluläre Vesikel
F-Aktin	Filamentöses Aktin
FCS	Fetales Kälberserum, engl. fetal calf serum
FP	Fluoreszierendes Protein, engl. fluorescent protein
eGFP	Grün fluoreszierendes Protein, engl. enhanced green fluorescent protein
mTFP	Blau fluoreszierendes Protein, engl. monomeric teal fluorescent protein
GLT-1	Glutamat-Transporter-1
GzmB	Granzym B
HEK293	humane embryonale Nierenzellen-293, engl. humanic embryonic kidney cells
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure

Hsc70	Hitzeschockprotein 70, engl. heat shock cognate 70
IFN- γ	Interferon γ
IL-2	Interleukin 2
IL-4	Interleukin 4
IL-12	Interleukin 12
ILV	Intraluminale Vesikel
IS	Immunologische Synapse
KCl	Kaliumchlorid
LAMP-1	Lysosomen-assoziiertes Membranprotein-1, engl. Lysosomal-associated membrane protein 1
LAMP-2	Lysosomen-assoziiertes Membranprotein-2, engl. Lysosomal-associated membrane protein 2
M	Mittelwert
MCG	Multi core granules
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex, engl. Major histocompatibility complex
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
μ l	Mikroliter
mM	Millimolar
μ M	Mikromolar
μ m	Mikrometer
MTOC	Mikrotubuli-Organisationszentrum, engl. microtubule organizing centre
MV	Mikrovesikel
MVB	Multivesikulärer Körper, engl. multi vesicular body
MVE	Multivesikuläre Endosomen
NaCl	Natriumchlorid
nm	Nanometer
PAMP	Pathogen-assoziierte molekulare Muster
PBS	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung, engl. Phosphate Buffered Saline
PD-1	„Programmed cell death-1“-Rezeptor
PD-L1	„Programmed cell death“-Ligand-1

PFA	Paraformaldehyd
pH	Potential des Wasserstoffs, engl. potential hydrogen
PRR	Mustererkennungsrezeptor, engl. Pattern recognition receptor
RNA	Ribonukleinsäure
mRNA	Messenger-RNA
miRNA	Mikro-RNA
sgRNA	Single guided RNA
ROI	Region of interest
SCG	Single core granules
SD	Standardabweichung, engl. standard deviation
SEM	Standardfehler des Mittelwerts, engl. standard error of the mean
SIM	„Structured illumination“ - Mikroskopie
SL	Sekretorische Lysosomen
SMAC	Supramolekulare Aktivierungscluster, engl. supramolecular activation cluster
cSMAC	Zentraler SMAC
dSMAC	Distaler SMAC
pSMAC	Peripherer SMAC
SMAP	Supramolekulare Angriffspartikel
TC	Zielzelle, engl. target cell
TCR	T-Zell-Rezeptor, engl. t-cell receptor
TH ₁ -Zellen	Typ-1-T-Helferzellen
TH ₂ -Zellen	Typ-2-T-Helferzellen
TIRFM	Interne Totalreflexionsfluoreszenzmikroskopie, engl. total internal reflection fluorescence microscopy
TSG-101	Tumor susceptibility gene 101
tSV	Transsynaptische Vesikel
VPS-4	Vacuolar protein-sorting-associated protein 4
WT	Wildtyp
ZEN	Zeiss Efficient Navigator
ZNS	Zentrales Nervensystem

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Immunologische Synapse.....	6
Abbildung 2: Extrazelluläre Vesikel	9
Abbildung 3: Marker von Exosomen	11
Abbildung 4: CD63-pHuji-pMAX-Vektorkarte.....	22
Abbildung 5: CD81-pHluorin-pMAX-Vektorkarte	23
Abbildung 6: Untersuchung der Ko-Lokalisation von CD81-pHluorin, CD63-pHuji und Granzym B in cytotoxischen T-Zellen (CTL) mithilfe von „Structured illumination“ - Mikroskopie (SIM).....	32
Abbildung 7: Interne Totalreflexionsfluoreszenzmikroskopie (TIRFM) der Fusion von CD63-pHuji positiven Vesikeln an der Immunsynapse (IS)	34
Abbildung 8: Analyse der Fusion CD63-pHuji positiver Vesikel von cytotoxischen T-Zellen (CTL) an der Immunsynapse (IS) in $\approx 0,1 \mu\text{M}$ - und 10 mM - Calciumlösung.....	36
Abbildung 9: Beobachtung der Ausbildung und Veränderung der Immunsynapse (IS) einer cytotoxischen T-Zelle (CTL), die Lifact-eGFP und CD63 pHuji überexprimiert ...	38
Abbildung 10: Analyse der Fusion CD63-pHuji positiver Vesikel von cytotoxischen T-Zellen (CTL), die zusätzlich Lifact-eGFP überexprimieren, an der Immunsynapse (IS) in $\approx 0,1 \mu\text{M}$ - und 10 mM -Calciumlösung.....	39
Abbildung 11: Position der Fusion CD63-pHuji positiver Vesikel in der Immunsynapse (IS)	41
Abbildung 12: Untersuchung von Fusionsereignissen CD63-pHuji bzw. Granzym B-TFP positiver Vesikel in cytotoxischen T-Zellen (CTL) mittels interner Totalreflexionsfluoreszenzmikroskopie (TIRFM) an der Immunsynapse (IS)	45

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Genutzte Chemikalien	16
Tabelle 2: Genutzte kommerzielle Kits	17
Tabelle 3: Kommerzielle Antikörper	18
Tabelle 4: Lösungen für die Zellisolation	18
Tabelle 5: Lösungen für die Zellkultur	19
Tabelle 6: Lösungen für die Elektroporation	19
Tabelle 7: Lösungen für CD3-beschichtete Deckgläser	20
Tabelle 8: Lösungen für die TIRF-Mikroskopie	20
Tabelle 9: Lösungen für Fixierung von Zellen	21

1 Zusammenfassung

1.1 In deutscher Sprache

Bei der Interaktion einer cytotoxischen T-Zelle (CTL) mit einer virusbefallenen Zelle oder Krebszelle wird die CTL über den T-Zellrezeptor (engl. t-cell receptor, TCR) und den Ko-Rezeptor CD8 stimuliert. Zwischen CTL und Zielzelle (engl. target cell, TC) wird eine Immunsynapse (IS) ausgebildet und es kommt zu einer Polarisierung der cytotoxischen Granula (CGs) zur IS. Schließlich fusionieren CGs an der IS mit Freisetzung ihres cytotoxischen Inhalts wie beispielsweise Perforin und Granzyme, um die TC zu zerstören. Es gibt zwei Klassen von CGs: „Single core granules“ (SCGs), die lösliche cytotoxische Proteine freisetzen, und „Multi core granules“ (MCGs), die supramolekulare Angriffspartikel (SMAPs) und teilweise auch Exosomen freisetzen. In den letzten Jahren wurde vermehrt berichtet, dass CTL mittels Freisetzung von extrazellulären Vesikeln (EVs) wie beispielsweise Exosomen einen weiteren Weg zur Kommunikation und zur Cytotoxizität nutzen. Bei Exosomen handelt es sich um EVs mit einer Größe von 30 - 100 nm, die durch Fusion von multivesikulären Körpern (engl. multivesicular bodies, MVBs) mit der Plasmamembran freigesetzt werden. Wir wollten herausfinden, ob CD63 ein geeigneter Marker für MVBs und Exosomen von CTL ist und ob CTL Exosomen an der IS freisetzen. Zunächst untersuchten wir in murinen CTL die Lokalisation der Exosomenmarker CD63 und CD81, welche mit den fluoreszierenden Proteinen pHuji und pHluorin gekennzeichnet waren, in Bezug auf Granzym B (GzmB) als Marker für CGs mittels „Structured illumination“-Mikroskopie (SIM). Wir stellten eine signifikant höhere Ko-Lokalisation zwischen CD63 und GzmB als zwischen CD63 und CD81 oder CD81 und GzmB fest. Aufgrund der interessanten Ko-Lokalisation zwischen CD63 und GzmB entschieden wir uns dafür die Fusion CD63-pHuji positiver Vesikel mit interner Totalreflexions-fluoreszenzmikroskopie (TIRFM) näher zu untersuchen. Hierfür säten wir CTL auf Anti-CD3-beschichtete Deckgläser aus, wodurch sie zum Ausbilden einer IS sowie zur Fusion CD63-pHuji positiver Vesikel stimuliert wurden. Wir stellten zwei Typen von CD63-pHuji positiven Fusionsereignissen fest: einen Typ mit einem schnellen Anstieg und einen schnellen Abfall der Fluoreszenzintensität und einen Typ mit einem schnellen Anstieg aber einem langsamen Abfall der Fluoreszenzintensität. Es bestand jedoch ein fließender Übergang zwischen beiden Typen. Weil Calcium eine wichtige Rolle für die Exozytose

verschiedener Vesikel spielt, gingen wir der Frage nach, ob dies auch für die Fusion CD63-pHuji positiver Vesikel gilt und konnten nachweisen, dass signifikant mehr CD63-pHuji positive Fusionsereignisse in extrazellulären $[Ca^{2+}]$ von 10 mM als in einer extrazellulären $[Ca^{2+}]$ von ca. 0,1 μ M auftraten. Als nächstes widmeten wir uns der Untersuchung der Position der CD63-pHuji positiven Fusionsereignisse an der IS. Die ringförmige Anreicherung von kortikalem F-Aktin definiert verschiedene funktionelle Bereiche der IS. Deshalb beobachteten wir gleichzeitig die Fusion CD63-pHuji positiver Fusionsereignisse und das mit Lifeact-eGFP markierte F-Aktin. Es traten signifikant mehr CD63-pHuji positive Fusionsereignisse innerhalb des Aktin-Rings auf. Zuletzt untersuchten wir in CTL von GzmB-mTFP-Knock-in-Mäusen, die CD63-pHuji überexprimierten, ob bei der Fusion CD63-pHuji positiver Vesikel GzmB freigesetzt wird. Signifikant mehr CD63-pHuji positive Fusionsereignisse waren GzmB-mTFP positiv als GzmB-mTFP negativ. Zusammenfassend lässt sich anhand der Literatur und der Ergebnisse dieser Arbeit feststellen, dass CD63 kein optimaler Marker für MVBs und Exosomen in CTL ist, weil es sich auch auf CGs befindet. Unsere Daten können wie folgt interpretiert werden: 1. Bei den GzmB-negativen CD63-pHuji-positiven Fusionsereignissen handelt es sich am ehesten um MVBs mit Freisetzung von Exosomen, 2. Bei den CD63-pHuji-positiven Fusionsereignissen mit Freisetzung von GzmB-mTFP - gekennzeichnet durch einen schnellen Abfall von der mTFP-Fluoreszenz - handelt es sich möglicherweise um SCGs und 3. bei CD63-pHuji-positiven und GzmB-mTFP-positiven Fusionsereignissen ohne Abfall von mTFP-Fluoreszenz um MCGs.

1.2 Summary of „Quantification of the fusion of CD63-positive vesicles by murine cytotoxic T-cells using real-time microscopy“

When a cytotoxic T cell (CTL) interacts with a virus-infected cell or cancer cell, the CTL is stimulated via the t-cell receptor (TCR) and the co-receptor CD8. An immune synapse (IS) is formed between the CTL and the target cell (TC) and the cytotoxic granules (CGs) polarize towards the IS. Eventually, CGs fuse at the IS, releasing their cytotoxic contents such as perforin and granzymes to destroy the TC. There are two classes of CGs: "single core granules" (SCGs), which release soluble cytotoxic proteins, and "multi core granules" (MCGs), which release supramolecular attack particles (SMAPs) and sometimes also exosomes. In recent years, there has been increasing evidence that CTL utilise another pathway for communication and cytotoxicity via the release of extracellular vesicles (EVs) such as exosomes. Exosomes are EVs with

a size of 30-100 nm that are released by fusion of multivesicular bodies (MVBs) with the plasma membrane. We wanted to find out whether CD63 is a suitable marker for MVBs and exosomes of CTL and whether CTL release exosomes at the IS. First, we investigated the localization of the exosome markers CD63 and CD81, which were labelled with the fluorescent proteins pHuji and pHluorin, in murine CTL in relation to granzyme B (GzmB) as a marker for CGs using structured illumination microscopy (SIM). We found a significantly higher co-localization between CD63 and GzmB than between CD63 and CD81 or CD81 and GzmB. Due to the interesting co-localization between CD63 and GzmB, we decided to investigate the fusion of CD63-pHuji positive vesicles with total internal reflection fluorescence microscopy (TIRFM). Therefore, we stimulated CTL by anti-CD3-coated coverslips that induced them to form an IS and to fuse CD63-pHuji positive vesicles. We detected two types of CD63-pHuji positive fusion events: one type with a rapid increase and a rapid decrease in fluorescence intensity and one type with a rapid increase but a slow decrease in fluorescence intensity. However, there was a fluid transition between the two types. Because calcium plays an important role in the exocytosis of various vesicles, we investigated whether this also applies to the fusion of CD63-pHuji positive vesicles and were able to demonstrate that significantly more CD63-pHuji positive fusion events occurred in extracellular $[Ca^{2+}]$ of 10 mM than in an extracellular $[Ca^{2+}]$ of about 0.1 μ M. Next, we investigated the position of CD63-pHuji positive fusion events at the IS by simultaneously observing the fusion of CD63-pHuji positive fusion events and F-actin labelled with Lifeact-eGFP. The accumulation of cortical F-actin defines different functional areas of the IS. Significantly more CD63-pHuji positive fusion events occurred within the actin ring. Finally, we studied in CTL of GzmB-mTFP knock-in mice overexpressing CD63-pHuji, whether GzmB is released by CD63-pHuji positive vesicles. Significantly more CD63-pHuji positive fusion events were GzmB-mTFP positive than GzmB-mTFP negative. In conclusion, based on the literature and the results of this work, CD63 is not an ideal marker for MVBs and exosomes in CTL because it is also present on CGs. Our data can be interpreted as follows: 1. the GzmB-negative CD63-pHuji positive fusion events are most likely to be MVBs with release of exosomes, 2. CD63-pHuji-positive fusion events with release of GzmB-mTFP - characterised by a rapid decrease in mTFP - are possibly SCGs and 3. CD63-pHuji-positive and GzmB-mTFP-positive fusion events without a decrease in mTFP are MCGs.

2 Einleitung

2.1 Das Immunsystem

Alle Lebewesen stehen in ständigem Kontakt zur Außenwelt voller potenzieller Krankheitserreger, deshalb ist es möglich, dass Pathogene in den Organismus eindringen. Um sich gegen diese Pathogene zur Wehr zu setzen, verfügen Lebewesen über ein Immunsystem, das aus verschiedenen Mechanismen besteht: Man unterscheidet die angeborene und die erworbene Immunantwort, auf die ich weiter unten genauer eingehe. Die angeborene Immunantwort umfasst physikalische, chemische, zelluläre und humorale Mechanismen, die von Geburt an im Kampf gegen Pathogene wie Viren und Bakterien im Einsatz sind. Zu den wichtigsten physikalischen Mechanismen zählen Haut und Schleimhäute, welche in intaktem Zustand eine unüberwindbare Barriere für Pathogene darstellen. Wichtige chemische Mechanismen der angeborenen Immunantwort sind beispielsweise die Magensäure sowie bei Frauen der saure pH-Wert der Vaginalschleimhaut (Lüllmann-Rauch und Asan, 2019). Des Weiteren enthalten Sekrete wie die Tränenflüssigkeit oder der Speichel mit Lysozym ein Enzym, welches in der Lage ist Bakterienwände zu spalten. Sollte ein Pathogen all diese Barrieren überwunden haben, kommen zelluläre Abwehrmechanismen des angeborenen Immunsystems zum Einsatz. Einige Abwehrzellen, vor allem phagozytierende Zellen, besitzen bestimmte Mustererkennungszepatoren (engl. pattern-recognition receptors, PRRs). Diese dienen dazu Pathogene anhand von bestimmten Oberflächenmolekülen (engl. pathogen-associated molecular pattern, PAMP), zu erkennen. Wenn ein Phagozyt mithilfe der PRRs ein PAMP erkennt, führt dies zu einer Entzündungsreaktion und der Phagozytose des erkannten Pathogens (Iwasaki und Medzhitov, 2015). Ferner kommt es zu einer Aktivierung der erworbenen Immunantwort, wenn Pathogene durch PRRs auf antigenpräsentierenden Zellen (engl. antigen presenting cell, APC) erkannt werden (Iwasaki und Medzhitov, 2015). APC sind besondere Phagozyten. Sie sind in der Lage phagozytierte Pathogene zu verarbeiten und anschließend Bestandteile des Pathogens auf ihrer Oberfläche T-Zellen oder B-Zellen zu präsentieren. Auf diese Weise wird die erworbene Immunantwort eingeleitet, die auf zellulären und humoralen Mechanismen basiert. Je nachdem welche Untergruppe an CD4-positiven T-Zellen vorliegt, werden eher

zelluläre oder humorale Mechanismen initiiert. Unter Einfluss von durch APC ausgeschüttetem Interleukin-4 (IL-4) differenzieren sich CD4-positive Zellen zu Typ-2-T-Helferzellen (TH₂-Zellen) (Swain et al., 1990). Diese sind wichtig für humorale Mechanismen der erworbenen Immunantwort, weil sie B-Zellen dazu anregen Antikörper zu produzieren. Für die zellulären Mechanismen der erworbenen Immunantwort spielen Typ-1-T-Helferzellen (TH₁-Zellen) eine wichtige Rolle. CD4-positive Zellen differenzieren sich unter Einfluss von Interleukin-12 (IL-12) ausgeschüttet von APC zu TH₁-Zellen (Hsieh et al., 1993). TH₁-Zellen schütten ihrerseits Interleukin-2 (IL-2) sowie Interferon- γ (IFN- γ) aus und aktivieren damit die zelluläre Immunantwort, die sich gegen intrazelluläre sowie virale Erreger richtet. Zum einen regen Zytokine der TH₁-Zellen Makrophagen dazu an Pathogene zu phagozytieren und zu zerstören. Zum anderen bewirken IL-2 und IFN- γ ausgeschüttet von TH₁-Zellen, dass sich CD8-positive T-Zellen zu aktiven cytotoxischen T-Lymphozyten (CTL) differenzieren (Abbas et al., 1996).

2.1.1 Cytotoxische T-Lymphozyten

CTL zählen zu den T-Zellen, die wie alle Blutzellen im Knochenmark gebildet werden. Anschließend reifen T-Zellen im Thymus heran. Im Zuge dieses Reifungsprozesses erhalten T-Zellen den T-Zellrezeptor (TCR). Außerdem lernen sie körpereigene Proteine zu erkennen und akzeptieren, sowie körperfremde Proteine zu erkennen. Die reifen, naiven T-Zellen verlassen den Thymus und zirkulieren zwischen Blut und sekundären lymphatischen Organen hin und her (Aust, 2020). Man unterscheidet zwei T-Zelllinien anhand ihrer Oberflächenproteine: CD4-positive T-Helferzellen und CD8-positive CTL. Eine naive CD8-positive T-Zelle wird aktiviert, indem es zu einem Kontakt mit einer APC kommt. Das über den MHC-Klasse-I-Komplex präsentierte Antigen wird von CD8-positiven T-Zellen mit dem TCR/CD3 und dem Co-Rezeptor CD8 erkannt, es kommt zur Proliferation und Differenzierung der naiven CD8-positiven T-Zellen zur aktiven CTL. Zusätzlich spielen von TH₁-Zellen ausgeschüttete Zytokine eine Rolle bei der Differenzierung von CTL. Die Aufgabe von CTL besteht darin, virusinfizierte Zellen sowie Tumorzellen zu erkennen und zu eliminieren. Wenn eine Körperzelle ein virales Protein enthält, kann sie dies auf ihrer Oberfläche über den MHC-Klasse-I-Komplex präsentieren. Dort kann es über den TCR/CD3 von CTL entdeckt werden. Präsentiert eine Körperzelle einer CTL das Antigen, auf welches sie geprägt wurde, bildet sich eine immunologische Synapse (IS) aus (Abbildung 1) und es kommt zu einer Polarisation des Mikrotubuli-Organisationszentrum

(MTOC) in Richtung Zielzelle (engl. target cell, TC). An Mikrotubuli wandern die cytotoxischen Granula (CG) entlang zur IS, fusionieren mit der Plasmamembran und setzen ihre cytotoxischen Proteine frei, um die TC zu eliminieren (Dustin, 2014; Stinchcombe et al., 2006; Walzog und Fandrey, 2019). Außerdem kann der Zelltod der TC über den Fas-Ligand/Fas-Signalweg eingeleitet werden (Waring und Müllbacher, 1999).

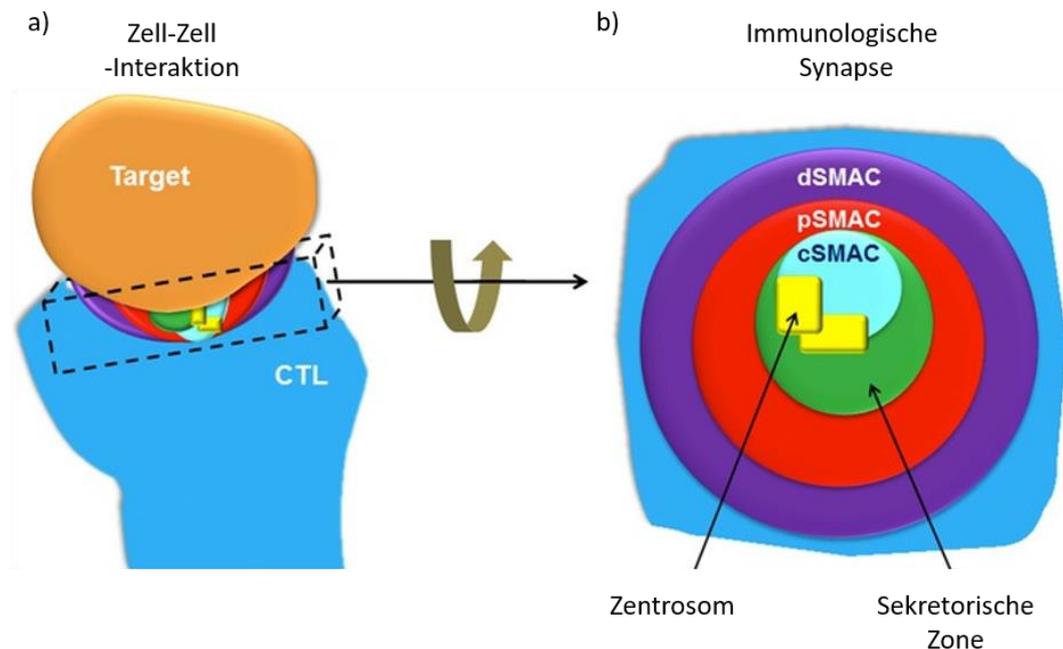


Abbildung 1: Immunologische Synapse

In Abbildung **1a** wird schematisch die Interaktion zwischen CTL und TC dargestellt. Diese führt zur Ausbildung einer IS, welche in Abbildung **1b** gezeigt wird. Hier ist abgebildet, wo dSMAC, pSMAC und cSMAC innerhalb der IS lokalisiert sind und was sie enthalten. Abbildung modifiziert nach Ritter et al. (2013).

2.1.2 Immunologische Synapse

Die IS stellt die Verbindung zwischen CTL und TC dar. Ihren Namen verdankt diese Verbindung der Ähnlichkeit mit einer Synapse im Nervensystem (Dustin und Colman, 2002). Sie entsteht, wenn es zu einer Interaktion zwischen MHC-Klasse-I-Komplex der TC mit dem TCR/CD3 der CTL kommt. Die IS kann in mehrere Abschnitte unterteilt werden: In einen zentralen Abschnitt, den sogenannten zentralen supramolekularen Aktivierungscluster (engl. central supramolecular activation cluster, cSMAC), einen umgebenden Abschnitt, den sogenannten

peripheren SMAC (pSMAC), und einen weiteren, umgebenden Abschnitt, bezeichnet als distaler SMAC (dSMAC) (Dustin, 2014; Monks et al., 1998) (Abbildung 1). Aktin spielt eine wichtige Rolle, wenn es um die IS geht. Im Kontaktbereich der CTL zur Zielzelle kommt es in den ersten Minuten zu einer Polymerisation des Aktins. Anschließend bewirkt eine Reorganisation des Aktins, dass es einen äußeren Ring bildet, den sog. dSMAC. Der dSMAC besteht aus einem Lamellopodien-ähnlichen Aktin (Yi et al., 2012). Auch im pSMAC ist Aktin enthalten. Retrograde Bewegungen des Aktins im dSMAC bewirken, dass TCR-Mikrocluster vom pSMAC in Richtung cSMAC gelangen (Campi et al., 2005; Varma et al., 2006). Weitere TCR-Mikrocluster gelangen mithilfe des polarisierten Centrosoms auch bekannt als MTOC, zur IS (Das et al., 2004). Zusätzlich trägt das polarisierte Centrosom dazu bei, dass CGs an den Mikrotubuli entlang zur IS wandern (Geiger et al., 1982; Stinchcombe et al., 2006). Dort kommt es zur Fusion der CGs in einem definierten Bereich des cSMAC, der sogenannten sekretorischen Zone (Stinchcombe et al., 2001).

2.1.3 Cytotoxische Granula

In der Interaktion mit einer virusbefallenen Zelle oder Tumorzelle setzen CTL im Bereich der IS mittels Fusion von CGs cytotoxische Proteine wie Perforin und Granzyme frei, um die TC zu eliminieren. Perforin ist ein cytolytisches Protein, das porenähnliche Läsionen in der Membran der TC verursacht (Masson und Tschopp, 1985), durch welche Granzyme in die TC gelangen können. Granzyme zählen zu den Serinesterasen und führen zur Apoptose der TC (Peters et al., 1991; Shi et al., 1997). In den CGs herrscht ein saurer pH-Wert, sodass sowohl Perforin als auch Granzyme in den Granula nicht aktiv sind (Burkhardt et al., 1990). Diese Proteine befinden sich in dem elektronenmikroskopisch dichten Kern der CGs. Auf der Membran der CGs befinden sich lysosomale Proteine wie LAMP-1, LAMP-2 und CD63. Außerdem können sie lösliche lysosomale Proteine enthalten. Aus diesem Grund können CGs als sekretorische Lysosomen (SL) bezeichnet werden (Burkhardt et al., 1990; de Saint Basile et al., 2010; Peters et al., 1991). Kürzlich wurde gezeigt, dass es morphologisch zwei Klassen von CGs gibt. In der einen CG-Klasse konnten elektronenmikroskopisch Granula mit einem einzigen Vesikel ausfüllenden, elektronendichten Kern mit einheitlichem Durchmesser nachgewiesen werden (engl. single core granules, SCG). Die zweite Klasse von CGs kann mehrere kleinere elektronendichte

Kerne mit unterschiedlichen Durchmessern enthalten und besteht teilweise auch aus einem multivesikulären Anteil (engl. multi core granules, MCG) (Chang et al., 2022). In beiden CG-Klassen wurde ein hoher Anteil an GzmB nachgewiesen. Die Zusammensetzung von MCG und SCG unterscheidet sich jedoch: Während in SCG lysosomale Proteine nachgewiesen wurden, wurden in MCG endosomale Proteine bspw. Rabs nachgewiesen. Mittels interner Totalreflexionsfluoreszenzmikroskopie (TIRFM) konnte gezeigt werden, dass sowohl SCG als auch MCG an der IS freigesetzt werden und es sich bei MCG um den Ursprungsort von supramolekularen Angriffspartikeln (engl. supramolecular attack particles, SMAP) handelt (Chang et al., 2022). SMAPs sind Partikel, die unter anderem aus GzmB und Perforin bestehen. Sie sind in der Lage selbstständig TC zu zerstören (Bálint et al., 2020). Im Gegensatz zu löslichem GzmB können SMAPs für einen längeren Zeitraum bestehen, sodass sie vermutlich für die verzögerte Elimination von TC zuständig sind (Bálint et al., 2020; Chang et al., 2022).

2.2 Extrazelluläre Vesikel und Exosomen

Neben endokriner, parakriner sowie autokriner Kommunikation stellen extrazelluläre Vesikel (engl. extracellular vesicle, EVs), die Proteine, Lipide und Nukleinsäuren transportieren können, einen weiteren, potenten Weg zur Kommunikation zwischen Zellen dar (Yáñez-Mó et al., 2015). Extrazelluläre Vesikel können je nach Größe, Morphologie oder Herkunft in 3 verschiedene Untergruppen eingeteilt werden: Apoptotische Körper, Mikropartikel/Mikrovesikel (engl. microvesicle, MV) und Exosomen (Abbildung 2). Wie der Name bereits impliziert, werden apoptotische Körper freigesetzt, wenn sich während der Apoptose die Plasmamembran der Zelle auflöst. Bei MVs handelt es sich um eine Gruppe von Vesikeln mit einer Größe von 150-1000 nm, deren Freisetzung durch Abschnüren von der Plasmamembran erfolgt. Bei Exosomen handelt es sich um intraluminale Vesikel (engl. intraluminal vesicles, ILVs) mit einer Größe von 30-100 nm, welche in multivesikulären Körpern (engl. multivesicular bodies, MVBs), auch multivesikuläre Endosomen (MVE) genannt, enthalten sind. Exosomen werden freigesetzt, indem MVBs mit der Plasmamembran verschmelzen. Zellen sind vermutlich in der Lage sowohl MVs als auch Exosomen freizusetzen. (Colombo et al., 2014; Johnstone et al., 1987; Yáñez-Mó et al., 2015).

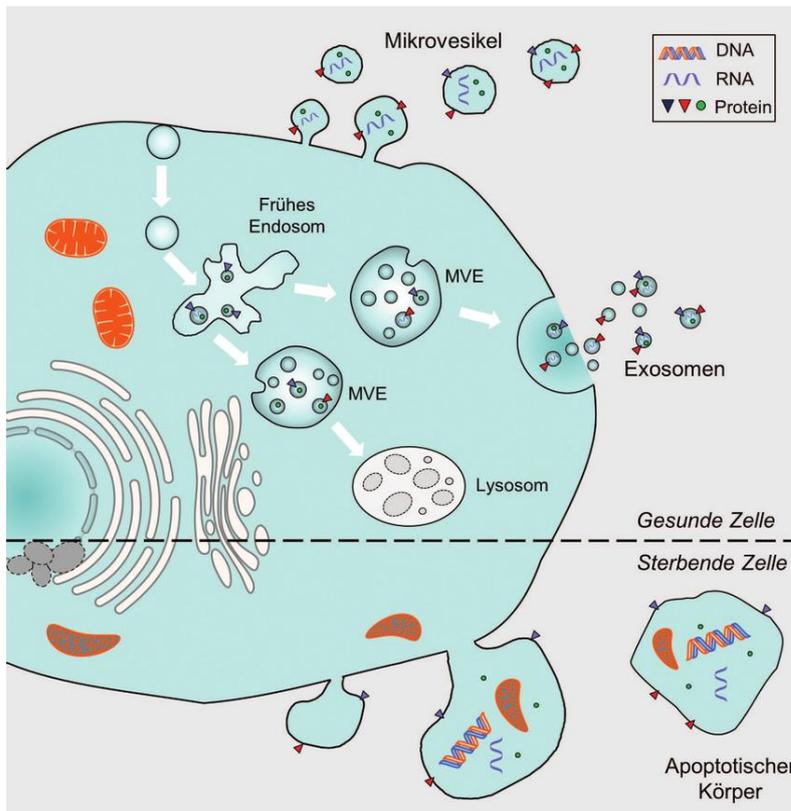


Abbildung 2: Extrazelluläre Vesikel

Schematische Darstellung der Freisetzung von Apoptotischen Körpern, Mikrovesikeln (MVs) und Exosomen. Während MVs direkt von der Plasmamembran abgeschnürt werden, haben Exosomen ihre Herkunft im endosomalen System und werden durch die Fusion von multivesikulären Endosomen (MVEs) mit der Plasmamembran freigesetzt. MVs und Exosomen enthalten Nucleinsäuren, Proteine und Lipide. Sterbende Zellen geben apoptotische Körper ab. Diese enthalten Nucleinsäuren, Proteine und Reste von Mitochondrien (Krämer-Albers und Frühbeis, 2013).

2.2.1 Biogenese von Exosomen

Während frühe Endosomen zu späten Endosomen heranreifen, kommt es zur Akkumulation von ILVs in ihrem Inneren. Aufgrund der akkumulierten ILVs werden späte Endosomen auch multivesikuläre Endosomen (MVE) oder multivesikuläre Körper (engl. multivesicular bodies, MVBs) genannt. Einige MVBs werden lysosomal abgebaut, während andere mit der Plasmamembran verschmelzen und ihren Inhalt freisetzen. Die freigesetzten Vesikel werden Exosomen genannt (Kowal et al., 2014; Stoorvogel et al., 1991). Exosomen können mithilfe von endosomalen Sortierkomplexen, die für den Transport benötigt werden (engl. endosomal sorting complexes required for transport, ESCRT), entstehen oder unabhängig von diesen Sortierkomplexen. Ungefähr 30 Proteine bilden die vier Komplexe (ESCRT-0, ESCRT-I, ESCRT-II, ESCRT-III). ESCRT-0 erkennt ubiquinierte Proteine, bildet daraus Frachtbündel und bindet sie an die Membran von Endosomen. ESCRT-I und ESCRT-II sorgen gemeinsam dafür, dass die Membran abgeschnürt wird. Zuletzt spaltet ESCRT-III die abgeschnürte Membran zur Bildung von ILVs (Wollert und Hurley, 2010). Weitere assoziierte Proteine wie das Alix (engl. ALG-2

interacting protein X) und VPS-4 (engl. vacuolar protein-sorting-associated protein 4) spielen ebenfalls eine Rolle bei der ESCRT-abhängigen Entstehung von Exosomen (Kowal et al., 2014). Es existieren zusätzlich ESCRT-unabhängige Mechanismen, welche ebenfalls eine wichtige Rolle für die Entstehung von Exosomen spielen (Stuffers et al., 2009). Daran beteiligt sind Tetraspanine wie CD63 (Van Niel et al., 2011), Lipide wie Phospholipase D2 (PLD2) (Laulagnier et al., 2004) und Hitzeschockproteine wie hsc70 (engl. heat shock cognate 70) (Shi et al., 2018).

Die Fusion von Exosomen mittels Echtzeit-Mikroskopie wurde bisher selten untersucht. Es gelang Bebelman et al. die Fusion von MVBs mit Freisetzung von Exosomen nach Überexpression von Tetraspaninen (TSPANS) gekoppelt an pHluorin in HeLa-Zellen mittels interner Totalreflexionsfluoreszenzmikroskopie (TIRFM) zu untersuchen. Bei pHluorin handelt es sich um einen pH-abhängigen Fluoreszenzfarbstoff, der im sauren Milieu in den MVBs kaum sichtbar ist, in neutralem pH-Wert jedoch stark an Intensität zunimmt. Hauptsächlich konnte Bebelman et al. länger andauernde Fusionsereignisse feststellen, jedoch konnten sie auch wenige kürzere Fusionsereignisse nachweisen (Bebelman et al., 2020).

2.2.2 Marker und Inhalte von Exosomen

Obwohl Exosomen mit einer Größe von 30-100 nm sehr klein sind, besitzen sie eine Vielzahl von Proteinen (Abbildung 3). Darunter sind Proteine des Zytoskeletts (Aktin, Tubulin), cytosolische Proteine wie zum Beispiel Alix, TSG-101 oder Hitzeschockproteine, Membranproteine beispielsweise die Tetraspanine CD9, CD63 und CD81 sowie Proteine, welche eine Rolle im Transport von Vesikeln spielen (Yáñez-Mó et al., 2015). CD9, CD63 sowie CD81 zählen zu den Tetraspaninen, bei welchen es sich um eine Gruppe von Membranproteinen mit 4 Transmembrandomänen handelt. Tetraspanine besitzen 2 extrazelluläre sowie 3 intrazelluläre Regionen und spielen eine Rolle beim Verkehr von Partnerproteinen. Tetraspanine haben vielfältige Funktionen: CD63 beispielsweise ist an der ESCRT-unabhängigen Bildung von Exosomen beteiligt (Van Niel et al., 2011) und wird ebenso wie CD9 und CD81 als Marker für EVs genutzt (Charrin et al., 2014; Raposo und Stoorvogel, 2013; Verweij et al., 2018). Neben den genannten Tetraspaninen können auch Alix oder TSG-101 als Marker für Exosomen und andere EVs genutzt werden. Leider gibt es bisher keinen Marker, welcher spezifisch nur auf Exosomen zu finden ist. Neben Proteinen enthalten Exosomen verschiedene Nukleinsäuren wie intakte

Messenger-RNA (mRNA) (Baj-Krzyworzeka et al., 2006), Mikro-RNA (miRNA) und ribosomale RNA (rRNA) (Huang et al., 2013) sowie Desoxyribonukleinsäure in Form von Einzelstrang-DNA (Waldenström et al., 2012), Doppelstrang-DNA (dsDNA) (Thakur et al., 2014) und mitochondrialer DNA (mtDNA) (Guescini et al., 2010) (Abbildung 3). Zuletzt sind auch verschiedene Lipide in Exosomen enthalten, welche ebenfalls eine wichtige Rolle bei der Funktion von Exosomen spielen (Yáñez-Mó et al., 2015).

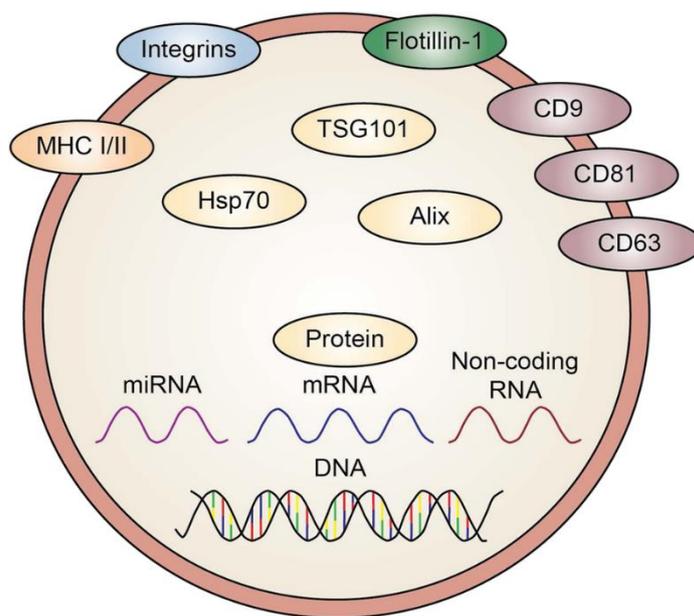


Abbildung 3: Marker von Exosomen

Im oberen Abschnitt des schematisch dargestellten Exosoms sind mit den Tetraspaninen CD9, CD63, CD81, TSG101 und Alix typische Marker von EVs dargestellt. Außerdem enthalten Exosomen verschiedene Nucleinsäuren, Proteine, welche im unteren Abschnitt der Abbildung gezeigt werden, sowie Lipide (McAndrews und Kalluri, 2019).

2.2.3 Funktion von Exosomen

Der Nachweis von Exosomen gelang mittlerweile in vielen verschiedenen Körperflüssigkeiten wie beispielsweise in Blut (Caby et al., 2005), Urin (Pisitkun et al., 2004) und zerebrospinalen Liquor (Street et al., 2012). Insbesondere der Nachweis in Blut deutet auf eine wichtige Funktion von Exosomen hin: Sie dienen der Kommunikation zwischen Zellen und können Prozesse in ihren Zielzellen beeinflussen, indem sie in ihnen enthaltene Moleküle zu entfernteren Zielen transportieren können. Verweij et al. konnte in vivo in Zebrafischembryonen zeigen, dass Exosomen, die von Zellen des Dotter-Synzythiums ausgeschüttet werden, zur Kommunikation

zwischen verschiedenen Organen dienen, indem sie ein CD63-pHluorin-Konstrukt in Zebrafischembryonen überexprimierten und CD63-pHluorin-positive Exosomen in vivo verfolgen konnten. Die nach der Überexpression von CD63-pHluorin durch Zellen des Dotter-Synzythiums ausgeschütteten Exosomen gelangten ins Blut der Zebrafischembryonen und wurden dort von Endothelzellen des kaudalen Venenplexus aufgenommen und endo-lysosomal abgebaut. Als die Ausschüttung dieser Exosomen gehemmt wurde, konnte festgestellt werden, dass das Wachstum des kaudalen Venenplexus beeinträchtigt war, was auf eine wichtige Rolle der von Zellen des Dotter-Synzythiums ausgeschütteten Exosomen für das Wachstum des Venenplexus hindeutet (Verweij et al., 2019). Wie beschrieben, enthalten Exosomen unter anderem mRNA und miRNA. Bezüglich Letzterer wurde nachgewiesen, dass im zentralen Nervensystem (ZNS) in von Neuronen freigesetzten EVs miRNA enthalten ist, die in Astrozyten zu einer vermehrten Anzahl von Glutamat-Transporter-1 (GLT-1) führt (Morel et al., 2013). Es wurde gezeigt, dass von Mastzellen gebildete Exosomen mRNA enthalten und diese an andere murine oder humane Mastzellen abgeben können. Nach Inkubation von humanen Mastzellen mit von Maus-Mastzellen abgegebenen Exosomen, konnten Maus-Proteine in den humanen Mastzellen nachgewiesen werden. So konnte gezeigt werden, dass Exosomen funktionelle mRNA enthalten und diese mRNA zur Proteinsynthese in den aufnehmenden Zellen führen kann (Valadi et al., 2007). Exosomen werden jedoch nicht nur von gesunden Zellen ausgeschüttet, auch Tumorzellen können Exosomen freisetzen und mithilfe von Exosomen unter anderem eine immunsuppressive Wirkung erzielen (Clayton et al., 2008).

2.2.4 Exosomen im Immunsystem

Sowohl für viele Zellen der angeborenen Immunantwort als auch der erworbenen Immunantwort wurde nachgewiesen, dass diese Exosomen sezernieren: Unter anderem für NK-Zellen (Lugini et al., 2012), dendritische Zellen (DC, engl. dendritic cells) (Zitvogel et al., 1998), B-Zellen (Raposo et al., 1996) sowie T-Zellen (Blanchard et al., 2002). Im angeborenen Immunsystem können EVs sowohl eine proinflammatorische (Oehmcke et al., 2012) als auch eine antiinflammatorische Wirkung haben (Gasser und Schifferli, 2004). EVs, die von Makrophagen sezerniert werden, bewirken, dass Monozyten zu Makrophagen differenzieren. Außerdem bewirken diese EVs die Freisetzung weiterer EVs und können auf diese Weise lokal das Immunsystem aktivieren (Ismail et al., 2013). B-Zellen sezernieren Exosomen mit beladenen

MHC-Komplex-Klasse-II-Molekülen. Diese Antigen-Präsentation an CD4-positive T-Zellen führt zu deren Aktivierung, was wiederum eine antigenspezifische erworbene Immunantwort auslöst (Raposo et al., 1996). Es wurde gezeigt, dass durch DC freigesetzte Exosomen MHC-Komplex-Klasse-I und MHC-Komplex-Klasse-II enthalten. Außerdem konnte nachgewiesen werden, dass T-Zellen bei Ausbildung einer IS mittels CD63-positiver Exosomen antigengesteuert miRNA zur APC transportieren und die übermittelte miRNA modulierend auf die Genexpression der empfangenden APC wirken kann (Mittelbrunn et al., 2011).

2.2.5 Cytotoxische T-Zellen und Exosomen

Bis vor zehn bis fünf Jahren gab es wenige Untersuchungen über EVs und Exosomen, die von CTL freigesetzt werden. Insbesondere der Interaktion zwischen Tumorzellen und CTL und der zugehörigen Rolle von Exosomen wurden in den letzten fünf Jahren viele Untersuchungen gewidmet, jedoch gibt es keine Studie, bei der in Echtzeit-Mikroskopie die Ausschüttung von Exosomen durch CTL beobachtet wurde. Die Aktivierung von T-Zellen führt zur vermehrten Freisetzung von Exosomen, welche den TCR/CD3 tragen (Blanchard et al., 2002). Von dendritischen Zellen (DC, engl. dendritic cell) freigesetzte mit Tumorbestandteilen beladene Exosomen bewirken, dass CTL in vivo angeregt werden und somit Tumorwachstum gehemmt wird oder es sogar zu einer vollständigen Tumorrückbildung kommt (Zitvogel et al., 1998). Bezüglich der Kommunikation zwischen CD8-positiven Zellen wurde gezeigt, dass von erschöpften CD8-positiven T-Zellen ausgeschüttete Exosomen die Aktivität und Proliferation von anderen, nicht-erschöpften CD8-positiven T-Zellen reduzieren. Darüber hinaus können diese von erschöpften CD8-positiven T-Zellen ausgeschütteten Exosomen sogar bewirken, dass nicht-erschöpfte CD8-positive T-Zellen ebenfalls erschöpfen, was zu einer reduzierten Aktivität und somit zu Tumorwachstum führen kann (Wang et al., 2019). Von aktivierten CTL ausgeschüttete Exosomen können intratumoral verabreicht eine Abnahme von mesenchymalen Tumorstromazellen bewirken (Seo et al., 2018). Qiu et al. gelang der Nachweis, dass aktivierte CTL Exosomen ausschütten, die den „Programmed cell death -1“-Rezeptor (PD-1) auf ihrer Oberfläche tragen. Die Interaktion dieser PD-1-positiven Exosomen mit dem „Programmed cell death“-Ligand-1 (PD-L1) auf der Zelloberfläche von Triple-negativen Brustkrebszellen oder mit Exosomen, die PD-L1 enthalten, kann dafür sorgen, dass die durch

PD-L1 verursachte Unterdrückung der cytotoxischen Aktivität gegenüber den Tumorzellen abgeschwächt wird (Qiu et al., 2021). Genetisch veränderten T-Zellen mit einem chimären Antigenrezeptor (engl. chimeric antigen receptor, CAR) setzen Exosomen frei, die sowohl CAR als auch CD63 exprimieren, aber auch Granzym B (GzmB) und Perforin aufweisen. Es konnte nachgewiesen werden, dass diese CAR-Exosomen eine cytotoxische Aktivität gegen Krebszellen haben und diese nicht durch PD-L1 gehemmt wird (Fu et al., 2019). Wenn CD63 als Marker für von CTL freigesetzte Exosomen genutzt wird, muss jedoch bedacht werden, dass CD63 auch auf CGs festgestellt wurde (Peters et al., 1991).

Weil Exozytose in CTL zwar hauptsächlich im Bereich der IS stattfindet, diese aber auch am distalen Pol der CTL stattfinden kann, führten Cespedes et al. den Begriff „transsynaptische Vesikel“ (engl. trans-synaptic vesicles, tSV) für im Bereich der IS freigesetzte Vesikel ein. Dazu zählen polarisierte Exosomen und synaptische Ektosomen (Céspedes et al., 2022). Polarisierte Exosomen sind Exosomen, die an der IS freigesetzt werden (Mittelbrunn et al., 2011). Bei synaptischen Ektosomen handelt es sich um MVs im Bereich der IS, die durch Knospung der Membran freigesetzt werden und T-Zellrezeptor (engl. t-cell receptor, TCR) enthalten (Saliba et al., 2019). Es konnten tSV mit verschiedenen Markern bspw. CD40, CD81, CD63 und TCR nachgewiesen werden. Verglichen mit EVs von TH-Zellen und CTL, die ohne Ausbildung einer IS sondern konstant in die Zellkultur abgegeben wurden, waren tSV im Durchschnitt größer und wiesen mehr Inhalt auf. Zum Inhalt der tSV zählen unter anderem RNA in unterschiedlicher Form bspw. microRNA (Céspedes et al., 2022).

2.3 Ziel der Arbeit

Bei Exosomen handelt es sich um extrazelluläre Vesikel mit einer Größe von 30-100 nm, die durch Fusion von MVBs mit der Plasmamembran freigesetzt werden. Sowohl für Zellen der angeborenen als auch für Zellen des erworbenen Immunsystems wurde gezeigt, dass sie Exosomen freisetzen. CTL bilden nach Interaktion zwischen TCR/CD3 sowie Ko-Rezeptor CD8 mit MHC-Klasse-I-Komplex der TC eine IS aus. Durch Fusion von lytischen Granula mit Freisetzung cytotoxischer Proteine wie Perforin und Granzyme eliminieren CTL die TC. Wir wollten herausfinden, ob CTL Exosomen an der IS freisetzen. Mittels TIRFM beobachteten wir die Sekretion

von CD63-pHuji-positiven Vesikeln durch CTL gewonnen aus der Milz von Wildtypmäusen. Näher untersucht haben wir die Kinetik der Freisetzung, ob Calcium einen Einfluss auf die Sekretion hat und wo in der IS die CD63-pHuji-positiven Vesikel freigesetzt werden. Zuletzt haben wir mit CTL gewonnen aus der Milz von GzmB-mTFP-Knock-in-Mäusen überprüft, ob CD63-positive Vesikel gemeinsam mit GzmB freigesetzt werden.

3 Material und Methoden

Für die Durchführung der Experimente waren folgende Materialien und Vorarbeiten notwendig.

3.1 Material

3.1.1 Genutzte Chemikalien

Genutzte Chemikalien	Firma
AIMV	Gibco (Thermo Fisher)
Beta-Merkaptoethanol	Roth
BSA	Sigma Aldrich
CaCl ₂	Merck
DPBS	Gibco (Thermo Fisher)
EDTA	Sigma Aldrich
FCS	Gibco (Thermo Fisher)
Glucose	Merck
Glutamax	Gibco (Thermo Fisher)
HEPES	Sigma Aldrich
IL-2	Gibco (Thermo Fisher)
KCl	Merck
KHCO ₃	Sigma Aldrich
MgCl ₂ x 6 H ₂ O	Merck
Mowiol	Merck
NaCl	Merck
NH ₄ Cl	Sigma Aldrich
PBS	Gibco (Thermo Fisher)

Poly-Ornithin	Sigma Aldrich
RPMI	Gibco (Thermo Fisher)
Tris-Puffer	Roth
Triton X-100	Roth
Trypanblau	Sigma Aldrich
Water	Sigma Aldrich

3.1.2 Genutzte kommerzielle Kits

Kommerzielles Kit für die Zellkultur	Bestandteile	Firma
Dynabeads® FlowComp™ Mouse CD8 Kit	<ul style="list-style-type: none"> - FlowComp™ Dynabeads (~1 × 10 (~10 mg) Beads/mL in PBS, pH 7,4, mit 0,1% BSA und 0,02% Natriumazid als Konservierungsmittel) - FlowComp™ Mouse CD8 Antikörper (Monoklonaler Anti-Maus CD8 Antikörper in PBS mit 0,5% BSA und 0,02% Natriumazid) - Release Buffer (modifiziertes Biotin in 0,1% BSA und 2 mM EDTA) 	Invitrogen (Thermo Fisher)
Nucleofection- Kit für Maus-T Zellen	<p>Transfektionsmedium Mouse T Cell Nucleofector™ Medium 9,1 ml</p>	Lonza

	Komponente A	100 µl	
	Komponente B	100 µl	
	FCS	500 µl	
	Glutamax	200 µl	
Dynabeads mouse T-activator CD3/CD28 für die Aktivierung und Expansion von T-Zellen	4x10 ⁷ Dynabeads™/ml in PBS, pH 7,4, mit 0,1 HSA		Gibco (Thermo Fisher)

3.1.3 Kommerzielle Antikörper

Kommerzielle Antikörper			
Antikörper	Spezies	Verdünnung	Firma
Alexa-Fluor-647-GzmB	Maus-IgG	1:200	Biologend
Anti-CD3e	Hamster	1:25	BD Pharmingen

3.1.4 Medien und Lösungen

Lösungen für die Zellisolation	Zusammensetzung
RPMI	RPMI - Glutamin - Phenolrot + 10% FCS + 1% Pen/Strep + 10 mM HEPES

Erythrozytenlysepuffer (pH 7.3)	NH ₄ Cl	155 mM
	KHCO ₃	10 mM
	EDTA	0,13 mM
Isolationspuffer (pH 7,4)	500 ml PBS	
	1x BSA 0,5 g, 0,1%	
	2 ml EDTA (2 mM) aus 0,5 M Vorrat	

Lösungen für die Zellkultur	Zusammensetzung
AIMV	AIMV-Medium + 50 µM Beta-Merkaptoethanol + 10% FCS
IL-2	25 µg IL-2 + 62,4 µl Essigsäure - 1:10 verdünnt mit Isolationspuffer

Lösungen für die Elektroporation	Zusammensetzung
Isolationspuffer (pH 7,4)	500 ml PBS 1x BSA 0,5 g, 0,1% 2 ml EDTA (2 mM) aus 0,5 M Vorrat
Transfektionsmedium	Mouse T Cell NucleofectorTm-Medium 9,1 ml + 100 µl Komponente A + 100 µl Komponente B + 500 µl FCS + 200 µ Glutamax

AIMV	AIMV-Medium + 50 μ M Beta-Merkaptoethanol + 10% FCS
------	---

Lösungen für CD3-beschichtete Deckgläser	Firma
Poly-L-Ornithin-Lösung	Sigma Aldrich
Wasser	Sigma Aldrich
DPBS	Gibco (Thermo Fisher)
Anti-CD3e-Antikörper	BD Pharmingen

Lösungen für die TIRF-Mikroskopie	Zusammensetzung
$\approx 0,1 \mu$ M - Calcium-Lösung	NaCl 155 mM KCl 4,5 mM HEPES 5 mM MgCl ₂ x 6 H ₂ O 3 mM Glukose (C ₆ H ₁₂ O ₆) 10 mM
10 mM - Calcium-Lösung	NaCl 140 mM KCl 4,5 mM HEPES 5 mM MgCl ₂ x 6 H ₂ O 2 mM CaCl ₂ 10 mM Glukose (C ₆ H ₁₂ O ₆) 10 mM

Lösungen für die Fixierung von Zellen	Zusammensetzung	
Paraformaldehyd (PFA) (15% in H ₂ O), pH 7,4	Paraformaldehyd	1,5 g
	Wasser MilliQ	10 ml
	NaOH (1mM)	ca. 20 µl
0,1 DPBS-Triton -100X	10% Triton-100X	2 ml
	DPBS	198 ml
0,1 DPBS-Triton 2% BSA	0,1 DPS-Triton	10 ml
	BSA	0.2 g
Befestigungsmedium	Mowiol 4-88	2.4 g
	Glycerin	6 g
	Wasser (2x destilliert)	6 ml
	Tris-Puffer	12 ml

3.1.5 Mausstämme

Wildtyp-Maus

Bei den verwendeten Wildtyp-Mäusen zur Gewinnung von cytotoxischen T-Zellen (CTL) aus der Milz handelte sich um C57Bl/6N (Black 6)-Wildtyp-Mäuse, Stamm-Nummer 005304. Die Wildtyp-Mäuse wurden vom Charles River Labor erworben. Sie waren zwischen 8 und 20 Wochen alt.

Granzym-B-mTFP-Knock-In-Maus

Die Granzym-B-mTFP-Knock-In-Mäuse wurden mithilfe der CRISP-Cas9-Technik in Kooperation mit dem Max-Planck-Institut Göttingen erzeugt, zur fluoreszierenden Darstellung von GzmB als Marker für cytotoxische Granula (CG) (Chitirala et al., 2020). Die verwendeten Mäuse waren zwischen 8 und 20 Wochen alt.

3.1.6 Plasmide

pMAX CD63-pHuji

Der Plasmid, den wir benutzt haben, wurde von (Verweij et al., 2018) erworben. Anschließend klonierte Margarete Klose CD 63 (609 Basenpaare) in einen pMAX-pHuji-Vektor, sodass die gesamte Größe des Vektors 4282 Basenpaare ergab (Abbildung 4).

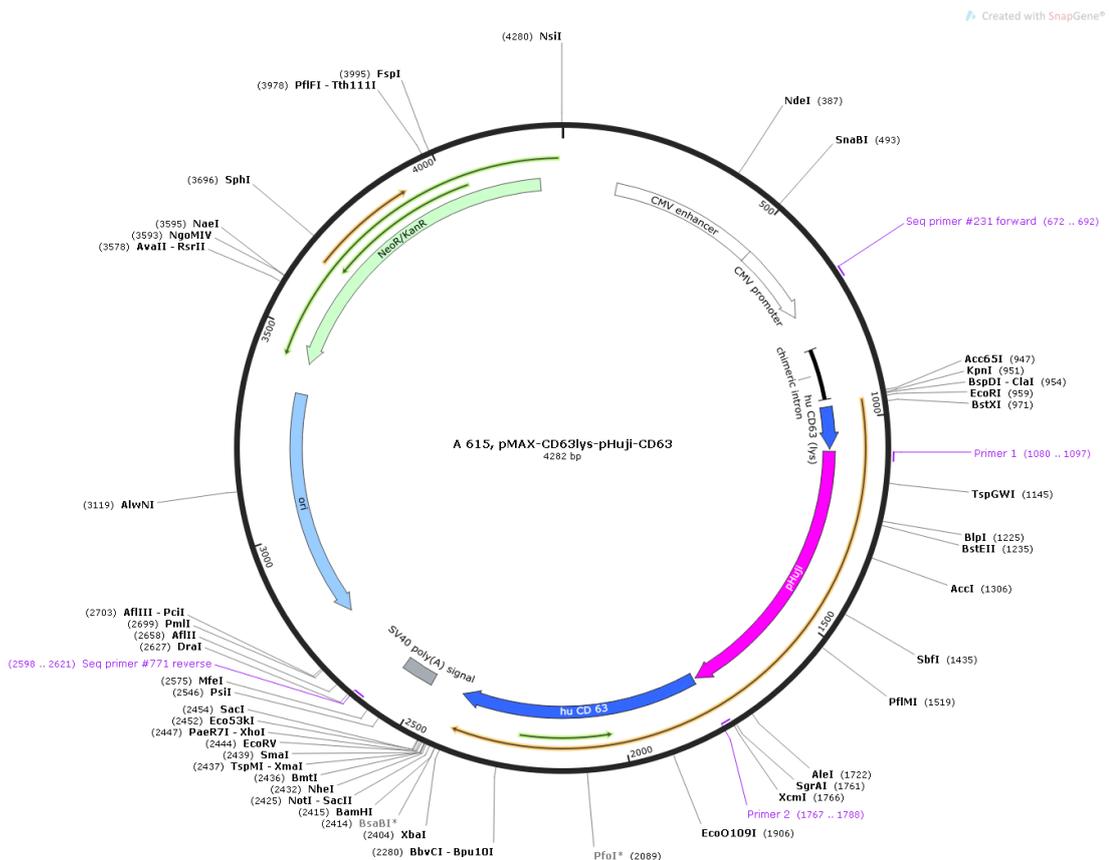


Abbildung 4: CD63-pHuji-pMAX-Vektorkarte

Hier dargestellt ist die Vektorkarte des Konstruktes, welches wir für die Transfektion von primären cytotoxischen Maus-T-Zellen für verschiedene Experimente genutzt haben. Bei dem Vektor handelte es sich um ein pMax-Plasmid, das das fluoreszierende Protein pHuji enthält. CD63 wurde am N-Terminus von pHuji eingeführt.

pMAX CD81-pHluorin

Der genutzte Plasmid wurde ebenfalls von (Verweij et. al., 2018) erworben. Anschließend wurde CD 81 (711 Basenpaare) von Margarete Klose in einen pMAX-pHluorin-Vektor kloniert, sodass die Gesamtgröße des Vektor 4312 Basenpaare ergab (Abbildung 5).

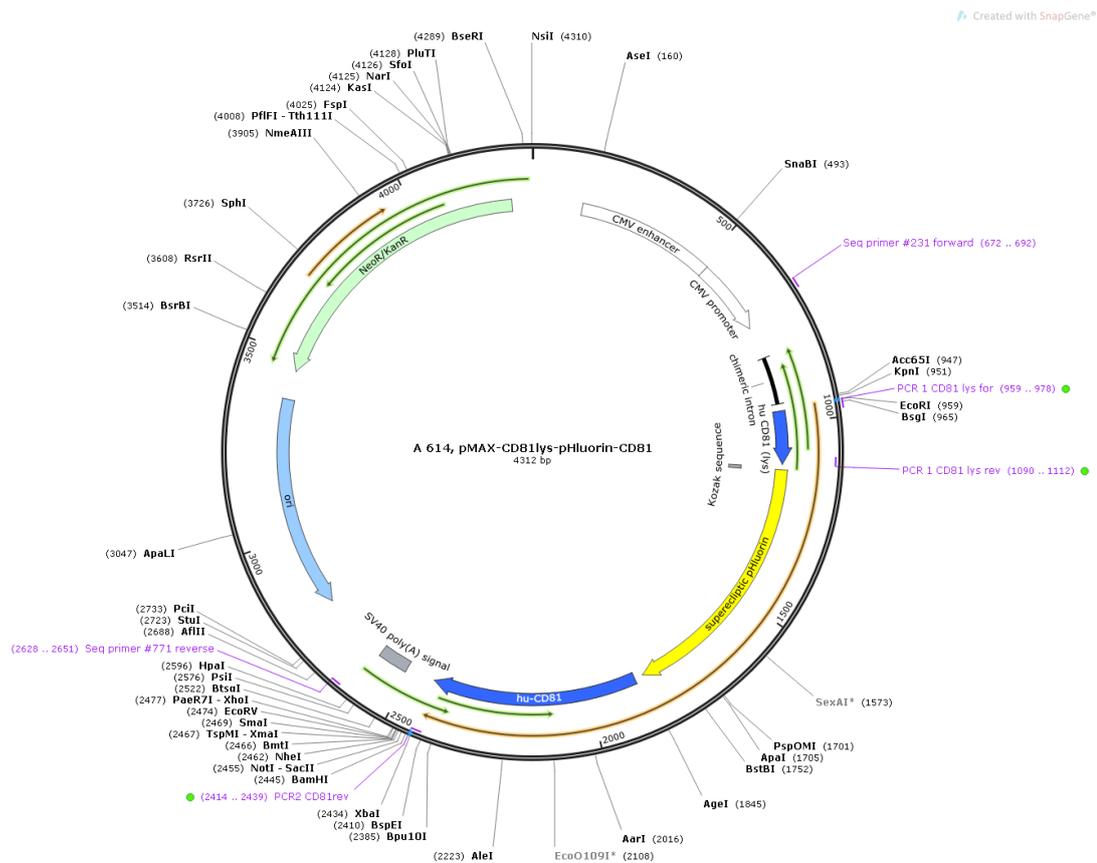


Abbildung 5: CD81-pHluorin-pMAX-Vektorkarte

Hier dargestellt ist die Vektorkarte des Konstruktes, welches wir für die Transfektion von primären cytotoxischen Maus-T-Zellen für ein Ko-Lokalisationsexperiment genutzt haben. Von dem in pMAX-superecliptic-pHluorin-klonierten CD81 ist die Zusammensetzung des Vektors dargestellt.

Lifeact-eGFP

Der genutzte Plasmid eGFP-Lifeact wurde von Addgene erworben (Addgene plasmid # 54610 ; <http://n2t.net/addgene:54610> ; RRID:Addgene_54610).

3.2 Methoden

3.2.1 Positive Isolierung von CD8-positiven T-Zellen

Um T-Zellen für die Primärkultur zu gewinnen, erfolgte eine positive Isolierung der T-Zellen aus der Milz von Wildtyp-Mäusen oder Granzym-B-Knock-In-Mäusen im Alter von 8 bis 20 Wochen mithilfe des „Dynabeads® FlowComp™ Mouse CD8 Kit“ nach Anweisungen des Herstellers. Die Mäuse wurden gemäß Tierschutzgesetz (durch CO₂ und anschließendem Genickbruch) getötet. Die Erlaubnis für die Durchführung von Experimenten an den Mäusen

durch das Saarländische Landesamt für Gesundheit und Verbraucherschutz (Nummer: 41–2016) lag vor. Im Anschluss wurde die Milz entnommen und in einer Petrischale mit RPMI-Medium unter die Sterilbank gebracht. Dort wurde die Milz mithilfe des Spritzenstempels einer 2 ml-Spritze durch einen 70 µm-Filter in vorgewärmtes (37°C) RPMI-Medium gedrückt. In diesem Medium wurden die Milzzellen gesammelt, mit 8-10 ml vorgewärmtem RPMI-Medium verdünnt und dann für 8 Minuten mit 1100 rpm ohne Bremse zentrifugiert. Um die Erythrozyten aus dem Zellgemisch zu entfernen, wurde das Zellpellet exakt 30 Sekunden lang mit 1 ml Erythrozytenlysepuffer gemischt und verdünnt mit RPMI-Medium 8 Minuten bei 1100 rpm mit Bremse zentrifugiert. Danach wurde das Zellpellet mit 8-10 ml Eis gekühltem Isolationspuffer gewaschen und erneut bei 1100 rpm mit Bremse zentrifugiert. Nach dem Waschen wurden circa 5×10^7 Milzzellen mit 25 µl Anti-CD8-Antikörper und 500 µl gekühltem Isolationspuffer gemischt, 10 Minuten lang auf Eis stehen gelassen, mit 4 ml Isolationspuffer zum Waschen verdünnt und 8 Minuten in einer gekühlten Zentrifuge (4°C) mit 1000 rpm zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand abgesaugt, das Zellgemisch mit 75 µl Dynabeads und 1 ml Isolationspuffer gemischt und 15 Minuten bei 4°C geschüttelt. Um die an die magnetischen Dynabeads gebundenen CD8-positiven T-Zellen zu isolieren, wurde das Zellgemisch nun 3 Minuten lang in einen Magneten gestellt, sodass die gebundenen CD8-positiven T-Zellen mit den Dynabeads vom Magneten angezogen an der Wand des Falcons hängen blieben. Das Zellgemisch in der Mitte des Falcons enthielt folglich keine CD8-positiven T-Zellen und konnte entfernt werden. Dann wurde 1 ml Freisetzungspuffer (engl. release buffer) dazu gegeben und das Gemisch 10 Minuten bei Raumtemperatur geschüttelt, um die CD8-positiven Zellen von den Dynabeads zu lösen. Um die magnetischen Dynabeads zu entfernen, wurde erneut der Magnet eingesetzt, sodass die Dynabeads an der Wand des Falcons hängen blieben. Die freigesetzten CD8-positiven T-Zellen befanden sich nunmehr in der Flüssigkeit in der Mitte des Falcons und wurden mit einer Pipette in ein sauberes Falcon überführt, mit 4 ml Isolationspuffer gewaschen und 5 Minuten lang mit 1100 rpm zentrifugiert. Zuvor wurden 10 µl Zelllösung mit 10 µl Trypanblau gemischt und in einer Neubauer-Zählkammer die CD8-positiven Zellen gezählt. Die gewaschenen Zellen wurden mit vorgewärmtem AIMV-Medium gemischt. Die nötige Menge an AIMV-Medium ergab sich aus der Anzahl an Zellen, die mithilfe der Neubauer-Zählkammer ermittelt werden konnte.

3.2.2 Aktivierung von naiven CD8-positiven T-Zellen

Durchschnittlich 7 bis 10×10^6 CD8-positive T-Zellen konnten bei der Isolierung aus einer Mausmilz gewonnen werden. Um eine adäquate Zellvermehrung zu erreichen, wurde pro 1×10^6 Zellen 1 ml AIMV-Medium hinzugegeben. Anschließend wurde je 1 ml AIMV-Medium mit 1×10^6 CD8-positiven T-Zellen in ein Loch einer 24-Lochplatte überführt. Dort wurden 20 μ l Dynabeads mouse T-activator CD3/CD28 pro 1 ml Zellgemisch zur Aktivierung der naiven CD8-positiven T-Zellen zu ausdifferenzierten Effektorzellen hinzugegeben sowie 100 Einheiten IL-2 zur Stimulation der T-Zellen. Anschließend wurden die T-Zellen für 2 Tage bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Vor einer Transfektion mussten die magnetischen „Dynabeads mouse T-activator CD3/CD28“ mithilfe eines Magnets entfernt werden.

3.2.3 Zellkultur

Wie oben beschrieben wurden die T-Zellen nach der Isolierung aktiviert und für 2 Tage unter den beschriebenen Bedingungen kultiviert. Am 2. Tag wurden die T-Zellen erneut in der Neubauer-Zählkammer gezählt und nach der Höhe der Zelldichte aufgeteilt. Zusätzlich wurden die Zellen gewaschen, um etwaige tote Zellen und das alte Medium zu entfernen, sowie frisches AIMV-Medium und 25 Einheiten IL-2 pro 1 ml Zellgemisch hinzugefügt. Die Zellen wurden bis zu 8 Tage kultiviert. Die Transfektion der Zellen erfolgte am 4., 5., 6. oder 7. Tag und die Experimente wurden am 5., 6., 7. oder 8. Tag durchgeführt.

3.2.4 Transfektion von Zellen mittels Elektroporation

Für die Transfektion von Zellen wurde das Nucleofection-Kit für Maus-T Zellen der Firma Lonza sowie das Amaxa® Nucleofactor®II Device der Firma Lonza genutzt sowie 3 μ g CD 63-pHuji-DNA, 3 μ g CD 81-pHluorin-DNA und 1 μ g Lifeact-eGFP-DNA.

Vor der Transfektion wurden die Zellen in der Neubauer-Zählkammer gezählt. Für jede Transfektion mittels Elektroporation wurden 3 bis 4×10^6 Zellen benötigt. Mithilfe eines Magneten wurden die magnetischen „Dynabeads mouse T-activator CD3/CD28“ entfernt und die Zellen in ein frisches Falcon überführt. Anschließend erfolgte eine 6-minütige Zentrifugation mit 1100 rpm, die Zellen wurden mit 2 ml Isolationspuffer gewaschen und

erneut mit 1100 rpm 6 Minuten lang zentrifugiert. Danach wurde 100 µl vorgewärmte Maus-T-Zell-Nucleofactor-Lösung pro Elektroporation mit dem Zellpellet vermischt. Die benötigte Menge der Plasmid-DNA wurde in eine Küvette pipettiert, die Zellsuspension in die Küvette gegeben und für wenige Sekunden in das Amaxa® Nucleofactor®II Device der Firma Lonza gestellt. Das Gerät erzeugt ein elektrisches Feld, um die Zellmembran permeabel zu machen, sodass die Plasmid-DNA in die T-Zellen gelangen kann (Shi et al., 2018). Nach Entnahme der Küvette wurde vorsichtig mit einer Plastikpipette 1 ml vorgewärmtes Transfektionsmedium zu der Zellsuspension gegeben, diese in ein Loch einer 24-Lochplatte überführt und bei 32°C und 5% CO₂ über Nacht inkubiert. Nach 10 bis 12 Stunden wurden die Zellen einmal bei 1100 rpm zentrifugiert und frisches AIMV-Medium dazu gegeben.

3.2.5 Beschichten der Deckgläser

Zuvor mit 70% Ethanol behandelte Glasdeckgläser wurden mit einem 30 µl Poly-Ornithin-Tropfen (0,1 mg/ml) für 30 Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen. Anschließend wurde das Poly-Ornithin mit einer Pipette wieder entfernt und mit PBS gewaschen. Die auf diese Weise behandelten Deckgläser eigneten sich nun für Experimente mit Poly-Ornithin-Deckgläsern. Für die Herstellung von Anti-CD3-beschichteten Deckgläsern beispielsweise für TIRFM-Experimente waren weitere Schritte notwendig: Der Tropfen Poly-Ornithin wurde mit einer Pipette entfernt, mit 30 µl PBS gewaschen und 30 µl Anti-CD3-Antikörper-Lösung (30 µl/ml) auf die Deckgläser pipettiert. Um die passende Konzentration von 30 µl/ml zu erreichen, wurde für 6 Deckgläser 5,4 µl Anti-CD3-Antikörper mit 174,2 µl PBS verdünnt. Nach 2 Stunden bei 37°C wurde der Tropfen mit Anti-CD3-Antikörper mit einer Pipette entfernt. Die Anti-CD3-beschichteten Deckgläser konnten entweder direkt für Experimente verwendet werden oder bei 4°C in einer mit Paraffin abgedichteten 6-Lochplatte bis zu 1 Woche gelagert werden.

3.2.6 Fixieren von Zellen und direkte Immunmarkierung

Am Vortag wurden mit Anti-CD3-Antikörper-beschichtete 12 mm Deckgläser sowie am Tag des Experiments mit Poly-Ornithin-beschichtete 12 mm Deckgläser nach oben beschriebenem Protokoll vorbereitet und in einer 6-Loch-Platte aufbewahrt. Die Zellen wurden mithilfe der

Neubauer-Zählkammer gezählt. Für 6 Deckgläser wurden ca. 2×10^6 transfizierte Zellen genutzt, die 5 Minuten lang mit 1100 rpm zentrifugiert, mit 2 ml PBS gewaschen und erneut 5 Minuten mit 1100 rpm zentrifugiert wurden. Anschließend wurde das Zellpellet mit 120 μ l AIMV-Medium gemischt und 20 μ l Zellsuspension wurde jeweils auf 1 Deckglas in der 6-Lochplatte gegeben. Es wurden 3 Anti-CD3-beschichtete Deckgläser und 3 Poly-Ornithin-beschichtete Deckgläser genutzt. Damit die Zellen sich absetzen, wurden sie abgedunkelt für 10 Minuten stehen gelassen. Währenddessen wurde eine 4%-PFA-Lösung aus der 15%-PFA-Lösung vorbereitet. Für 1 ml 4%-PFA-Lösung wurden zu diesem Zweck 266,66 μ l 15%-PFA mit 733,34 μ l PBS verdünnt. Pro Deckglas wurde 1 ml 4%-PFA vorbereitet. Nach 10 Minuten wurde vorsichtig mit einer Pipette das Medium von jedem Deckglas entfernt und jedes Deckglas vorsichtig mit 4%-PFA bedeckt. Nach 30 Minuten wurde das 4%-PFA entfernt und 2 Mal mit PBS gewaschen. Als nächstes wurde zum Permeabilisieren der Zellmembran 0,1% Triton-100X in DPBS auf die Deckgläser gegeben und diese 30 Minuten abgedunkelt stehen gelassen. Nach Entfernen der Permeabilisierungslösung wurde eine Blockierungslösung mit 0,1% Triton-100X und 2% BSA in DPBS auf die Deckgläser gegeben und diese für 15-30 Minuten abgedunkelt stehen gelassen. Danach wurde der Alexa-Fluor-647-GzmB-Antikörper 1:200 in der Blockierungslösung verdünnt. Pro Deckglas wurden 50 μ l des verdünnten Antikörpers auf einen Paraffin-Streifen auf der Arbeitsfläche gegeben. Anschließend wurde mit einer Pinzette das Deckglas aus der 6-Lochplatte genommen, vorsichtig die restliche Flüssigkeit abtropfen gelassen, das Deckglas mit der oberen Seite nach unten auf die mit 50 μ l verdünnten Alexa-Fluor-647-GzmB-Antikörper gelegt und für 1 Stunde inkubiert. Anschließend wurde jedes Deckglas 3 Mal mit PBS gewaschen. Zuletzt wurde pro Deckglas ein Tropfen Fixiermedium auf einen Objektträger gegeben und jedes Deckglas mit der oberen Seite, auf der sich die Zellen befanden, nach unten auf das Befestigungsmedium (Mounting Medium) gegeben. Nach wenigen Minuten konnten die fixierten Zellen auf dem Objektträger für Experimente mit einem Mikroskop genutzt werden oder bei 4°C für 1 Woche bis zum Mikroskopieren gelagert werden.

3.2.7 "Structured Illumination"- Mikroskopie

Bei der "Structured Illumination"-Mikroskopie kommt ein Mikroskop mit einer besonders hohen Auflösung zum Einsatz. Diese Auflösung wird erreicht, indem die Zelle mit einem

strukturierten Beleuchtungsmuster zur Anregung der fluoreszierenden Strukturen beleuchtet wird. Das Beleuchtungsmuster wird über die Probe schrittweise verschoben und verdreht, so dass insgesamt 15 Rohdaten-Bilder entstehen, die verrechnet werden. Die Verrechnung der Rohdatenbilder ergibt ein hochaufgelöstes Endbild, bei dem die bisherige Auflösungsgrenze von 200 nm fast halbiert wird (Gustafsson et al., 2008).

Die Bilder der fixierten Zellen wurden mit einem Elyra PS.1 Mikroskop (Zeiss, Jena, Deutschland) mit einem 63x Planachromat- Objektiv (NA 1.4) und Laseranregungen bei 488 nm, 561 nm und 635 nm aufgenommen. Danach wurden die Bilder verarbeitet. Zur Aufnahme wurde die Zeiss Efficient Navigator - Software genutzt (ZEN).

3.2.8 Interne Totalreflexionsfluoreszenzmikroskopie

Zur Untersuchung der Ausschüttung der CD63-pHuji positiven Vesikel wurde die interne Totalreflexionsfluoreszenzmikroskopie (engl. total internal reflection fluorescence microscopy, TIRFM) verwendet. Das ist ein spezialisiertes Mikroskop, das den Umstand ausnutzt, dass ein Laserstrahl, der in einem flachen Winkel auf eine Grenzfläche zwischen Wasser und Glas fällt, total reflektiert wird. So entsteht im Wasser hinter dem Glas ein Lichtfeld, dessen Lichtintensität exponentiell abfällt. Die Eindringtiefe beträgt zwischen 100 - 200 nm. Fluoreszierende Strukturen in diesem Bereich werden zur Emission angeregt (Thompson et al., 1981). TIRFM eignet sich aus diesem Grund gut zur Beurteilung von Strukturen nahe des Deckglases wie beispielsweise die IS.

Das genutzte TIRFM von Visitron Systems GmbH (Puchheim, Deutschland) besteht aus einem automatisierten Inversmikroskop IX83 von Olympus, das mit einem Olympus Autofokus, einem UAPON100XOTIR- NA1.49-Objektiv von Olympus einem 488 nm 100 mW-Laser, einem 561 nm 100 mW-Festkörperlaser, einem iLAS2-Beleuchtungskontrollsystem (Roper Scientific SAS, Frankreich), einer evolve-Prime95B-Kamera (Teledyne Photometrics) und einem Filterwürfel ausgestattet ist. Der Filterwürfel enthält einen Semrock-Filter (Rochester, NY, USA), einen FF444/520/590/Di01 dichroischen Filter und einen FF01-465/537/623 Emissionsfilter. Das TIRFM wurde von der Visiview-Software (Version 4.0.0.11, Visitron GmbH) gesteuert.

3.2.9 Genutzte Software

ImageJ, National Institutes of Health, Federal Government of USA

Zeiss Efficient Navigator (ZEN) 2012, Carl Zeiss

IGOR Pro 2018, WaveMetrics

SigmaPlot

Office 2016, Microsoft

EndNote 20

3.2.10 Analyse der Daten

Die Analyse der aufgenommenen Bilder erfolgte in ImageJ. Für die Quantifizierung der Ko-Lokalisation wurden sowohl der Mander's Überlappungskoeffizient als auch der Pearson's Überlappungskoeffizient mithilfe des JACoP-Plugin in ImageJ genutzt. Der Schwellenwert wurde manuell eingestellt. Für die Analyse der TIRFM-Aufnahmen wurden in ImageJ die cytotoxischen T-Zellen (CTL) mit CD63-pHuji positiven Vesikeln als interessante Region (engl. region of interest, ROI) umkreist und mit einer Nummer, einer sogenannten Zell-ID benannt. Danach wurde mit dem „Plot-Z-Axis-Profil“ die Fluoreszenzintensität gemessen. Weil es sich bei pHuji um einen pH-sensitiven Farbstoff handelt, steigt bei Fusion eines CD63-pHuji positiven Vesikels aufgrund des Wechsels des pH-Wertes von sauer zu neutral die Fluoreszenzintensität im Bereich der markierten CTL stark an. Auf diese Weise wurden CTL, die Fusion zeigten, erkannt. Anschließend wurden die CD63-pHuji positiven Vesikel zur genaueren Analyse ebenfalls durch ein ROI markiert. Nach Subtraktion der Hintergrundfluoreszenz wurde für jedes einzelne CD63-pHuji positive Vesikel die Fluoreszenzintensität mit dem „Plot-Z-Axis-Profil“ gemessen und als Liniendiagramm dargestellt. Wenn ein schneller Anstieg der Fluoreszenzintensität festgestellt werden konnte - also ein Fusionsereignis vorlag, wurde das Fusionsereignis mit einer Fusions-ID benannt. Die Fluoreszenzintensitätswerte von jedem Fusionsereignis wurden in Excel kopiert und gespeichert. Mit dem Programm IGOR Pro 2018, WaveMetrics und dem NeuroMatic-Makro wurden aus dem zeitlichen Verlauf der Fluoreszenzwerte die Kinetik des Verlaufs analysiert.

Dabei wurde die Anstiegszeit von 10% über den niedrigsten Punkt bis 90% unter dem höchsten Punkt berechnet. Die berechnete Abfallzeit entspricht der benötigten Zeit, in der die Fluoreszenz auf 36,8% der maximalen Intensität abfällt. Bei TIRFM-Experimenten mit zwei verschiedenen Laseranregungen erfolgte in ImageJ ein Alignment der Aufnahmen beider Laser anhand von aufgenommenen Beads mit dem „Cairn Image Splitter Analyser“ Plugin.

3.2.11 Statistik

Zur Überprüfung der Signifikanz wurden bei nicht-normalverteilten Daten der Mann-Whitney-U-Test sowie der Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test und bei Normalverteilung der t-Test in Sigmaplot durchgeführt.

4 Ergebnisse

4.1 Ko-Lokalisation zwischen CD63-pHuji, CD81-pHluorin und Granzym B

Zunächst haben wir die Lokalisierung der Exosomen in murinen CTLs untersucht. Die Experimente wurden mit murinen CTL durchgeführt, weil dies unter anderem die Möglichkeit eröffnete Experimente mit den Knock-In-Mäusen (bspw. GzmB-mTFP-Knock-In-Maus) durchzuführen. Die meist genutzten Markerproteine für Exosomen sind CD63, CD81, TSG-101 und Alix (Verweij et al., 2018; Willms et al., 2016). Leider gab es zum Zeitpunkt der Experimente für diese Studie für keines dieser murinen Proteine zuverlässige Antikörper. Daher musste die Lokalisierung der Exosomen durch Überexpression von Markerproteinen welche an ein fluoreszierendes Protein gekoppelt wurden, durchgeführt werden. Dabei entschieden wir uns für CD63-pHuji und CD81-pHluorin, weil diese nicht nur für die Lokalisierung eingesetzt werden können, sondern auch für die Untersuchung deren Exozytose (Verweij et al und Bebelmann et al). Vor allem interessierte uns, ob zwischen beiden potentiellen Exosomenmarkern eine Ko-Lokalisation vorliegt und ob eine Ko-Lokalisation mit Granzym B (GzmB) als Marker cytotoxischer Granula (CG) besteht. Hierfür wurden zunächst cytotoxische T-Zellen (CTL) aus der Milz von Wildtyp-Mäusen (WT) isoliert. 3 bis 6 Tage nach der Isolation wurden die Zellen mit CD63-pHuji und CD81-pHluorin transfiziert. Die CTL wurden zur Ausbildung einer Immunsynapse (IS) auf CD3-beschichtete Deckgläser gegeben, für 10 Minuten stehen gelassen, danach fixiert und mit anti-GzmB-Alexa-647 immun-gefärbt. Die mittels „Structured illumination“-Mikroskopie (SIM) aufgenommenen Bilder zeigen für CD81-pHluorin (gelb markiert), für CD63-pHuji (dargestellt in Magenta) und für GzmB (dargestellt in Türkis) kleine vesikelähnliche Strukturen. Zwischen den Vesikeln in den jeweiligen Farbkanälen besteht rein optisch teilweise eine Überlappung (siehe weiße Punkte im Overlay) (Abbildung 6a). Der Grad der Ko-Lokalisierung wurde mit dem Pearson's Überlappungskoeffizient und dem Mander's Überlappungskoeffizient ermittelt (Abbildung 6b-c). Der Pearson's Überlappungskoeffizient zwischen CD63-pHuji und CD81-pHluorin betrug im Durchschnitt $0,15 \pm 0,03$ ($N_{\text{Maus}} = 2$, $n_{\text{Zellen}} = 32$). Zwischen CD81-pHluorin und GzmB betrug der Pearson's Überlappungskoeffizient durchschnittlich $0,08 \pm 0,02$.

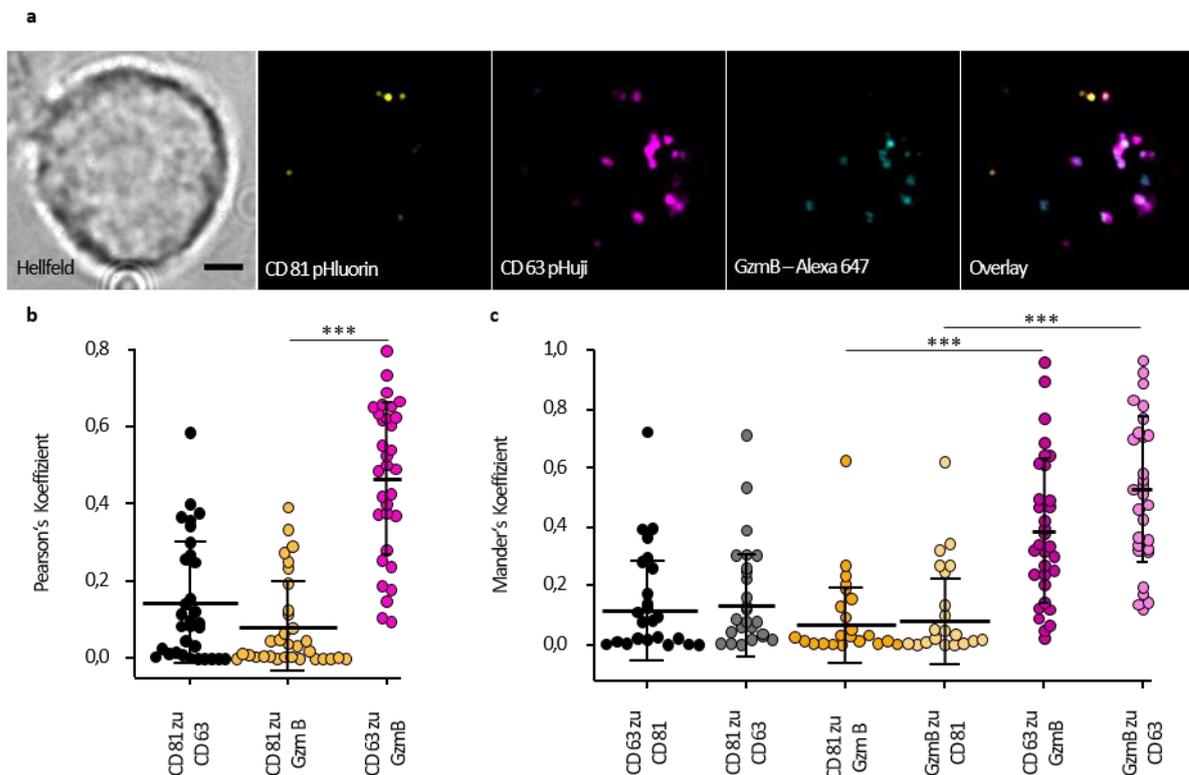


Abbildung 6: Untersuchung der Ko-Lokalisation von CD81-pHluorin, CD63-pHuji und Granzym B in cytotoxischen T-Zellen (CTL) mithilfe von „Structured illumination“-Mikroskopie (SIM)

a) Darstellung einer repräsentativen, stimulierten CTL, die zur Ausbildung einer IS auf ein CD3-beschichtetes Deckglas gegeben wurde. Die Zelle überexprimiert CD81-pHluorin (gelb) und CD63-pHuji (Magenta). Nach Fixierung wurde GzmB mit einem anti-GzmB-Antikörper gekoppelt an Alexa-647 (Türkis) gefärbt. Die Aufnahme wurde mit SIM durchgeführt. Maßstabsbalken: 1 μm . **b, c)** Ko-Lokalisationsanalyse mit dem Pearson's Überlappungskoeffizient (**b**) und dem Mander's Überlappungskoeffizient (**c**) von CD63, CD81 und GzmB ($N_{\text{Maus}} = 2$; $N_{\text{Zellen}} = 32$; *** $p < 0,001$).

Dagegen war der Pearson's Überlappungskoeffizient zwischen CD63-pHuji und GzmB mit einem Durchschnitt von $0,47 \pm 0,04$ ($N_{\text{Maus}} = 2$, $n_{\text{Zellen}} = 32$) deutlich höher. Dies war mit einem p-Wert von $<0,001$ (p-Wert = $1.725\text{E-}13$) im durchgeführten t-Test statistisch signifikant (Abbildung 6b). Der Mander's Überlappungskoeffizient zwischen CD63-pHuji und CD81-pHluorin war mit durchschnittlich $0,11 \pm 0,03$ sowie mit durchschnittlich $0,13 \pm 0,03$ zwischen CD81-pHluorin und CD63-pHuji niedrig. Das Gleiche galt auch für den Mander's Überlappungskoeffizient zwischen CD81-pHluorin und GzmB mit durchschnittlich $0,07 \pm 0,02$ sowie zwischen GzmB und CD81-pHluorin mit durchschnittlich $0,08 \pm 0,03$. Der Mander's Überlappungskoeffizient war für CD63-pHuji und GzmB mit durchschnittlich $0,39 \pm 0,04$ sowie für GzmB und CD63-pHuji mit durchschnittlich $0,53 \pm 0,04$ deutlich höher. Im durchgeführten Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test unter den durchschnittlichen Mander's Überlappungs-

koeffizienten zwischen CD63-pHuji und GzmB und CD81-pHluorin und GzmB konnte eine statistisch signifikant höhere Ko-Lokalisation zwischen CD63-pHuji und GzmB gegenüber CD81-pHluorin und GzmB nachgewiesen werden ($N_{\text{Maus}} = 2$, $n_{\text{Zellen}} = 32$; $***p < 0,001$) (Abbildung 6c). Es besteht daher eine deutlich höhere Ko-Lokalisation zwischen CD63-pHuji und GzmB als zwischen CD63-pHuji und CD81-pHluorin.

4.2 Interne Totalreflexionsfluoreszenzmikroskopie zur Untersuchung der Fusion CD63-pHuji positiver Vesikel an der Immunsynapse

Aufgrund der interessanten Ko-Lokalisation zwischen CD63-pHuji und Granzym B entschieden wir uns dafür, die CD63-pHuji positiven Vesikel näher zu untersuchen und CD63-pHuji positive Fusionsereignisse mit Echtzeit-Mikroskopie zu beobachten. Hierfür wurden CTL nach 4 bis 7 Tagen Kultivierung mit CD63-pHuji transfiziert. Die Transfektionseffizienz betrug 38,5% ($N_{\text{Maus}} = 1$, $n_{\text{Zellen}} = 361$). Ab 12 Stunden nach Transfektion wurden die CTL auf einem mit CD3-beschichteten Deckglas über insgesamt 600 Sekunden mit interner Totalreflexionsfluoreszenzmikroskopie (TIRFM) zuerst in $\approx 0,1 \mu\text{M}$ - haltiger Calciumlösung und dann in 10 mM - haltiger Calciumlösung aufgenommen und die Ausbildung der IS durch die CD63-pHuji überexprimierenden CTL sowie die Fusion CD63-pHuji positiver Vesikel beobachtet (Abbildung 7a). 32,4 % der CTL, die CD63-pHuji überexprimiert haben, zeigten CD63-pHuji positive Fusionsereignisse ($N_{\text{Maus}} = 1$, $n_{\text{Zellen}} = 139$). Die Analyse des zeitlichen Verlaufs der Fluoreszenzintensität von CD63-pHuji ergab, dass es zwei unterschiedliche Typen von Fusionsereignissen gibt (Abbildung 7). Bei dem einen Typ zeigte sich schnell eine starke Zunahme der Helligkeit des beobachteten und mit einem Pfeil markierten Vesikels mit Maximum nach 5 Sekunden, gefolgt von einem schnellen Verschwinden (Abbildung 7b). Dies entspricht einem schnellen Anstieg und einem schnellen Abfall der Fluoreszenzintensität (Abbildung 7c). Bei dem zweiten Typ zeigte sich ebenfalls eine schnelle Zunahme der Helligkeit, entsprechend einem schnellen Anstieg der Fluoreszenzintensität, jedoch ein langsamerer Abfall der Fluoreszenzintensität (Abbildung 7d und 7e).

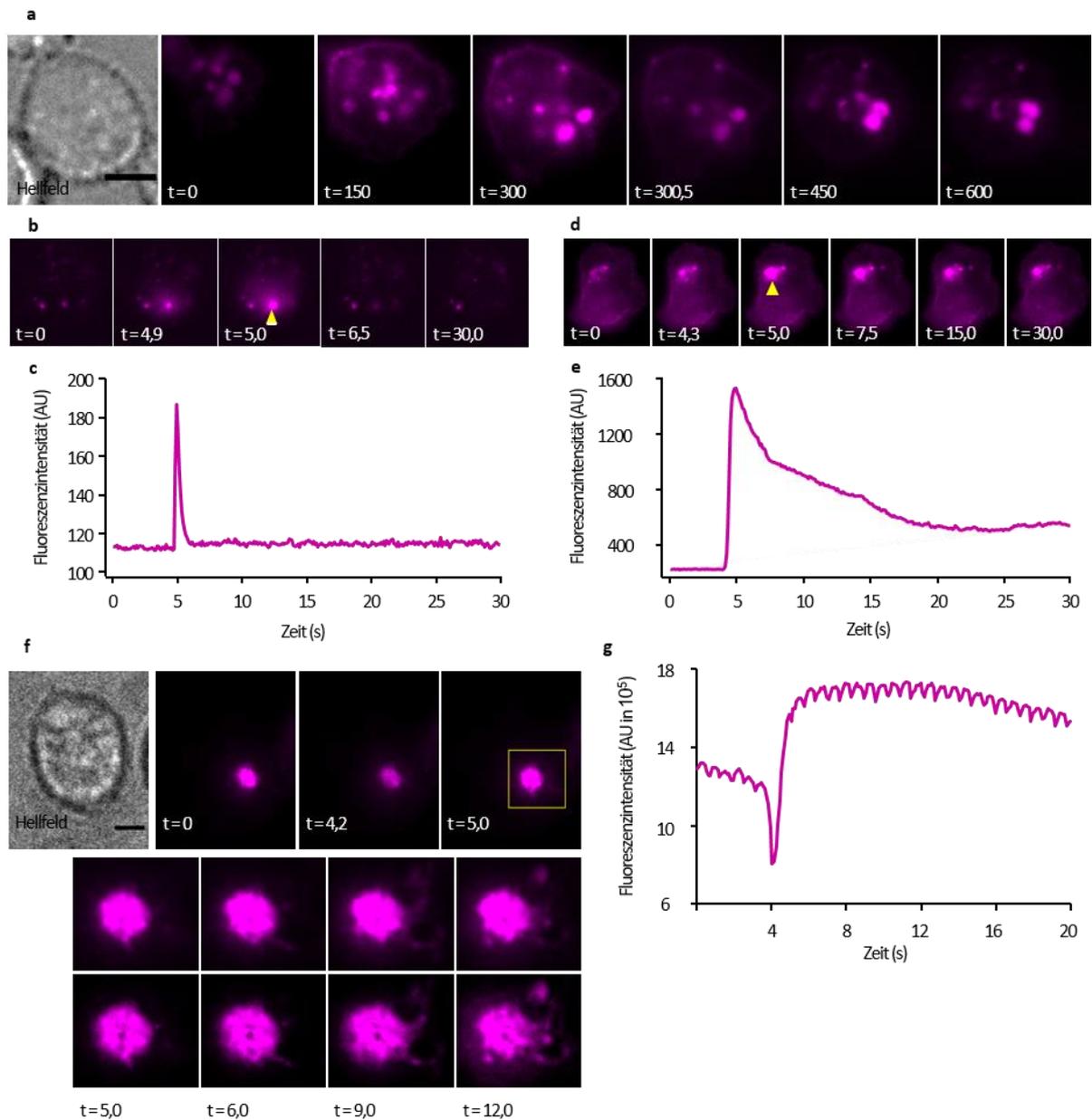


Abbildung 7: Interne Totalreflexionsfluoreszenzmikroskopie (TIRFM) der Fusion von CD63-pHuji positiven Vesikeln an der Immunsynapse (IS)

a) Darstellung einer repräsentativen, stimulierten CTL, die CD63-pHuji überexprimiert. Mittels TIRFM wurde die Ausbildung einer IS auf einem mit CD3-beschichteten Deckglas sowie die Fusion CD63-pHuji positiver Vesikel untersucht. Maßstabsbalken: 5 µm. **b), d)** Darstellung repräsentativer CD63-pHuji positiver Fusionsereignisse von CTL an der IS zu definierten Zeitpunkten. **c), e)** Graphische Darstellungen der Fluoreszenzintensität in beliebigen Einheiten (engl. arbitrary units, AU) der Fusionen dargestellt in **b)** bzw. **d)** über 30 Sekunden. **f)** Darstellung eines CD63-pHuji positiven Fusionsereignisses mit Austritt von kleinen vesikulären Strukturen im Anschluss an die Fusion, vergrößert dargestellt. Um diese zu verdeutlichen wurde der lokale Kontrast durch den ImageJ CLAHE Plugin erhöht (untere Reihe). **g)** Graphische Darstellung der Fluoreszenzintensität der in **f)** dargestellten Fusion.

Teilweise beobachteten wir CD63-pHuji positive Fusionsereignisse, bei denen das Vesikel, das bereits Fusion gezeigt hatte, im weiteren Verlauf einen weiteren starken Anstieg der Fluoreszenzintensität aufwies. Außerdem bestand optisch der Eindruck als würden aus dem fusionierten Vesikel fluoreszierende Punkte austreten. Ein Beispiel für ein solches CD63-pHuji positives Fusionsereignis mit der gemessenen Fluoreszenzintensität ist in Abbildung 7f und 7g dargestellt. Für jedes einzelne Fusionsereignis wurde das Erscheinen des CD63-pHuji positiven Vesikels im TIRFM-Feld (Abbildung 8a) sowie der Zeitpunkt der Fusion beim Maximum der Fluoreszenzintensität (Abbildung 8b) bestimmt. Dabei ist zu sehen, dass CD63-pHuji positive Vesikel während der gesamten Aufnahmezeit an der IS erscheinen (Abbildung 8a) und während der gesamten Aufnahmezeit Fusionsereignisse auftreten (Abbildung 8b). Darüber hinaus wurde der Beginn des Anstiegs der Fluoreszenzintensität als Start der Fusion und das Ende des Abfalls der Fluoreszenzintensität im Liniendiagramm als Ende der Fusion definiert. Mit dem Erscheinen des CD63-pHuji positiven Vesikels und dem definierten Start der Fusion wurde die Verweilzeit des Vesikels im TIRFM-Feld vor Fusion berechnet (Abbildung 8e). Die mittlere Verweilzeit aller CD63-pHuji positiven Vesikel vor Fusion betrug $28,0 \pm 5,6$ Sekunden ($N_{\text{Maus}} = 1$; $N_{\text{Zellen}} = 45$; $N_{\text{Fusion}} = 120$). Allerdings fiel eine breite Streuung der Verweilzeit von wenigen Millisekunden bis über 100 Sekunden auf. Es wurde auch die Fusionsdauer ausgerechnet, indem die Zeit zwischen Beginn des Anstiegs der Fluoreszenzintensität und Ende des Abfalls der Fluoreszenzintensität berechnet wurde. Die mittlere Fusionsdauer aller CD63-pHuji positiven Vesikel betrug $1,7 \pm 0,3$ Sekunden ($N_{\text{Maus}} = 1$; $N_{\text{Zellen}} = 45$; $N_{\text{Fusion}} = 120$). Zur weiteren Quantifizierung der CD63-pHuji positiven Fusionsereignisse wurde die Anstiegszeit berechnet (Abbildung 8g). Die mittlere Anstiegszeit lag bei $0,36 \pm 0,04$ Sekunden ($N_{\text{Maus}} = 1$; $N_{\text{Zellen}} = 45$; $N_{\text{Fusion}} = 120$). Die Abfallzeit betrug durchschnittlich $1,27 \pm 0,36$ Sekunden (Abbildung 8h). Interessanterweise besteht zwischen den schnelleren Fusionsereignissen und den langsameren Fusionsereignissen ein fließender Übergang, wie man anhand der Verteilung der Abfallzeiten sehen kann.

Es ist zu beachten, dass für die in Abbildung 8 dargestellten Ergebnisse teilweise unterschiedliche Zellen analysiert wurden. Für die Grafiken 8a-d wurden Zellen aus Kulturen von 2 Mäusen analysiert ($N_{\text{Maus}} = 2$; $N_{\text{Zellen}} = 42$; $N_{\text{Fusion}} = 136$). Für die Grafiken 8e-h wurden Kulturen aus 1 Maus analysiert ($N_{\text{Maus}} = 1$; $N_{\text{Zellen}} = 45$; $N_{\text{Fusion}} = 120$).

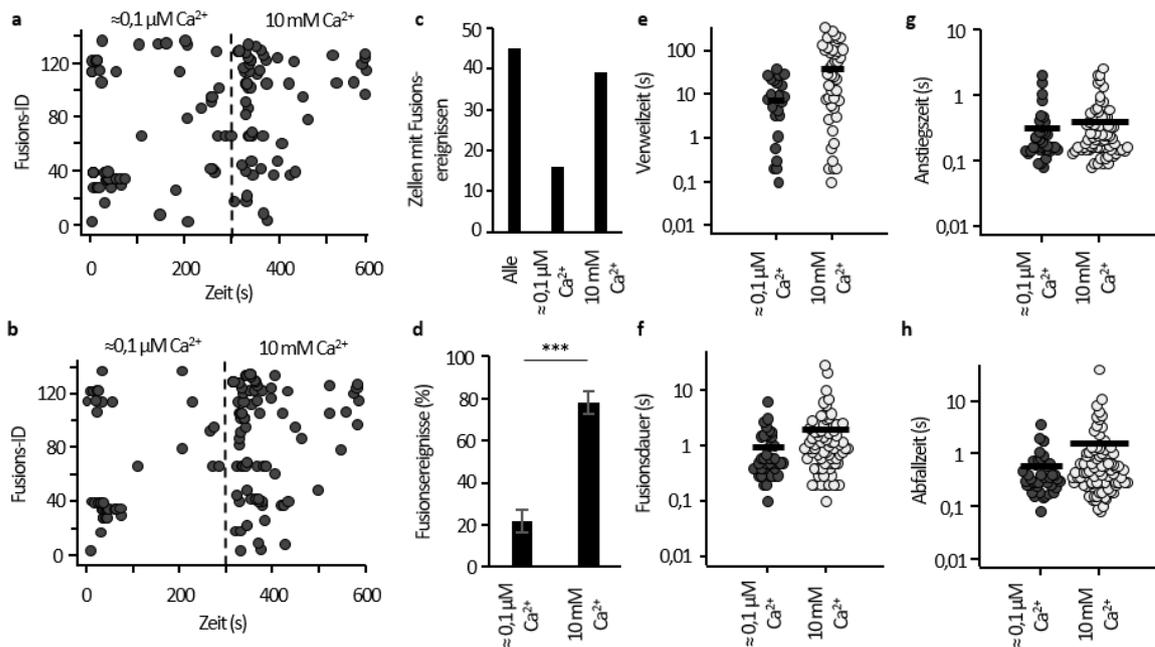


Abbildung 8: Analyse der Fusion CD63-pHuji positiver Vesikel von cytotoxischen T-Zellen (CTL) an der Immunsynapse (IS) in $\approx 0,1 \mu\text{M}$ - und 10 mM - Calciumlösung

a) Darstellung des Erscheinens der CD63-pHuji positiven Vesikel an der IS benannt mit einer Fusions-ID über 600 Sekunden. Die gestrichelte Linie markiert den Zeitpunkt, an dem 10 mM - Calciumlösung hinzugefügt wurde. **b)** Streudiagramme der Fusionsereignisse von CD63-pHuji positiven Vesikeln an der IS für alle CTLs über die Zeit. Jedes Ereignis ist mit einer Fusions-ID benannt. **c)** Balkendiagramm der absoluten Anzahl von CTL, die Fusion gezeigt haben, innerhalb des gesamten Experimentes (Alle), innerhalb der ersten 300 s bei einer extrazellulären $[\text{Ca}^{2+}]$ von $\approx 0,1 \mu\text{M}$ bzw. in den letzten 300 s bei einer extrazellulären $[\text{Ca}^{2+}]$ von 10 mM . **d)** Vergleich der Anzahl an Fusionsereignissen in $\approx 0,1 \mu\text{M}$ - Calciumlösung und in 10 mM - Calciumlösung in Prozent ($N_{\text{Maus}} = 2$; $N_{\text{Zellen}} = 42$; $N_{\text{Fusion}} = 136$; *** $p < 0,001$). **e)** Streudiagramm zum Vergleich der Verweilzeit der CD63-pHuji positiven Vesikel vor Fusion in $\approx 0,1 \mu\text{M}$ - Calciumlösung und in 10 mM - Calciumlösung. **f)** Streudiagramm zum Vergleich der Fusionsdauer CD63-pHuji positiver Vesikel in $\approx 0,1 \mu\text{M}$ - Calciumlösung und in 10 mM - Calciumlösung. **g)** Vergleich der Anstiegszeit der Fusion CD63-pHuji positiver Vesikel in $\approx 0,1 \mu\text{M}$ - Calciumlösung und in 10 mM - Calciumlösung **h)** Vergleich der Abfallzeit der Fusion CD63-pHuji positiver Vesikel in $\approx 0,1 \mu\text{M}$ - Calciumlösung und in 10 mM - Calciumlösung dargestellt als Punktdiagramm. Für die Grafiken **a-d** wurden Kulturen aus 2 Mäusen analysiert ($N_{\text{Maus}} = 2$; $N_{\text{Zellen}} = 42$; $N_{\text{Fusion}} = 136$). Für die Grafiken **e-h** wurden Kulturen aus 1 Maus analysiert ($N_{\text{Maus}} = 1$; $N_{\text{Zellen}} = 45$; $N_{\text{Fusion}} = 120$).

4.3 Calcium als Trigger der Fusion CD63-pHuji positiver Vesikel

Weil Calcium einen Einfluss auf die Exozytose verschiedener Vesikel hat, untersuchten wir, ob Calcium auch einen Einfluss auf die Fusion CD63-pHuji positiver Vesikel hat. Daher wurden bei der Untersuchung deren Fusion zwei Konditionen verwendet: $\approx 0,1 \mu\text{M}$ - haltige Calciumlösung und 10 mM - haltige Calciumlösung. Hierfür wurden 42 CTL von 2 verschiedenen Mäusen, die insgesamt 80 CD63-pHuji positive Fusionsereignisse zeigten, untersucht und analysiert. Wie in

Abbildung 8a zu sehen ist, fördert die Erhöhung der Calciumkonzentration das Erscheinen von neuen Vesikeln an der IS. Darüber hinaus zeigte sich, dass signifikant mehr CD63-pHuji positive Fusionsereignisse nach Zugabe von 10 mM - haltiger Calciumlösung auftraten. Erstaunlicherweise tauchte eine geringe Anzahl von CD63-pHuji positiven Vesikeln bereits in $\approx 0,1 \mu\text{M}$ -haltiger Calciumlösung auf, zur Fusion dieser geringen Anzahl CD63-pHuji positiven Vesikels kam es jedoch erst nach Zugabe der 10 mM - haltigen Calciumlösung. Es traten 22 CD63-pHuji positive Fusionsereignisse in $\approx 0,1 \mu\text{M}$ - haltiger Calciumlösung und 58 in 10 mM - haltiger Calciumlösung auf. Das ergibt eine Verteilung von $18,6 \pm 4,8\%$ Fusionsereignisse in $\approx 0,1 \mu\text{M}$ -haltiger Calciumlösung und $81,4 \pm 4,8\%$ CD63-pHuji positiver Ereignisse in 10 mM - haltiger Calciumlösung (Abbildung 8d) ($N_{\text{Maus}} = 2$; $N_{\text{Zellen}} = 42$; $N_{\text{Fusion}} = 80$; $***p < 0,001$). Diese Fusionsereignisse waren wie folgt verteilt: 13 CTL zeigten in $\approx 0,1 \mu\text{M}$ - haltiger Calciumlösung CD63-pHuji positive Fusionsereignisse und 40 CTL zeigten in 10 mM -haltiger Calciumlösung CD63-pHuji positive Fusionsereignisse (Abbildung 8c). Davon zeigten 10 CTL in beiden Konditionen CD63-pHuji positive Fusionsereignisse. Calcium scheint daher ein wichtiger Trigger CD63-pHuji positiver Fusionsereignisse zu sein. Interessanterweise hatte Calcium keinen Einfluss auf die durchschnittliche Anzahl an Fusionsereignissen pro CTL: Diese betrug in beiden Konditionen $3,2 \pm 0,7$, in $\approx 0,1 \mu\text{M}$ - haltiger Calciumlösung $2,5 \pm 0,6$ und in 10 mM - haltiger Calciumlösung $2,6 \pm 0,5$ ($N_{\text{Maus}} = 2$; $N_{\text{Zellen}} = 42$; $N_{\text{Fusion}} = 80$). Das lässt sich damit erklären, dass die Anzahl an CTL, die Fusionsereignisse zeigen, in erhöhter extrazellulärer Calciumkonzentration deutlich höher ist. Einen signifikanten Einfluss von Calcium auf die Verweilzeit der CD63-pHuji positiven Vesikel an der IS vor der Fusion (Abbildung 8e), auf die Fusionsdauer (Abbildung 8f), auf die Anstiegszeit (Abbildung 8g) und die Abfallzeit (Abbildung 8h) konnten wir nicht nachweisen ($N_{\text{Maus}} = 1$; $N_{\text{Zellen}} = 45$; $N_{\text{Fusion}} = 120$).

4.4 Position der Fusion CD63-pHuji positiver Vesikel in der Immunsynapse

Weil wir bei der Untersuchung der Fusion CD63-pHuji positiver Vesikel optisch den Eindruck hatten, dass diese im Zentrum der IS stattfand, entschieden wir uns für ein Experiment mit einer Doppel-Transfektion der CTL mit CD63-pHuji und Lifeact-eGFP an Tag 5 bis 7 mittels Elektroporation. Lifeact-eGFP färbt filamentöses Aktin (F-Aktin) und ermöglicht somit die

Identifizierung der verschiedenen Zonen der IS: dSMAC, pSMAC und cSMAC. Die Transfektionseffizienz betrug 54,7% ($N_{\text{Maus}} = 3$, $n_{\text{zellen}} = 285$). Für die Aufnahmen wurden Lifact-eGFP und CD63-pHuji mit einem 488 nm- und einem 561 nm-Laser gleichzeitig angeregt, um detektiert zu werden. Ab 12 Stunden nach Transfektion konnten so Ausbildung und Veränderungen der IS anhand des Lifact-eGFP sichtbar gemacht werden und die Position der Fusion CD63-pHuji positiver Fusionen in Bezug auf Lifact-eGFP über 840 Sekunden -jeweils 420 Sekunden in $\approx 0,1 \mu\text{M}$ -haltiger Calciumlösung und 10 mM -haltiger Calciumlösung - mit TIRFM untersucht werden. In Magenta dargestellt ist CD63-pHuji, das neben vesikulären Strukturen auch teilweise membranöse Strukturen markiert und das in Gelb dargestellte Lifact-eGFP markiert das filamentöse Aktin in der IS (Abbildung 9).

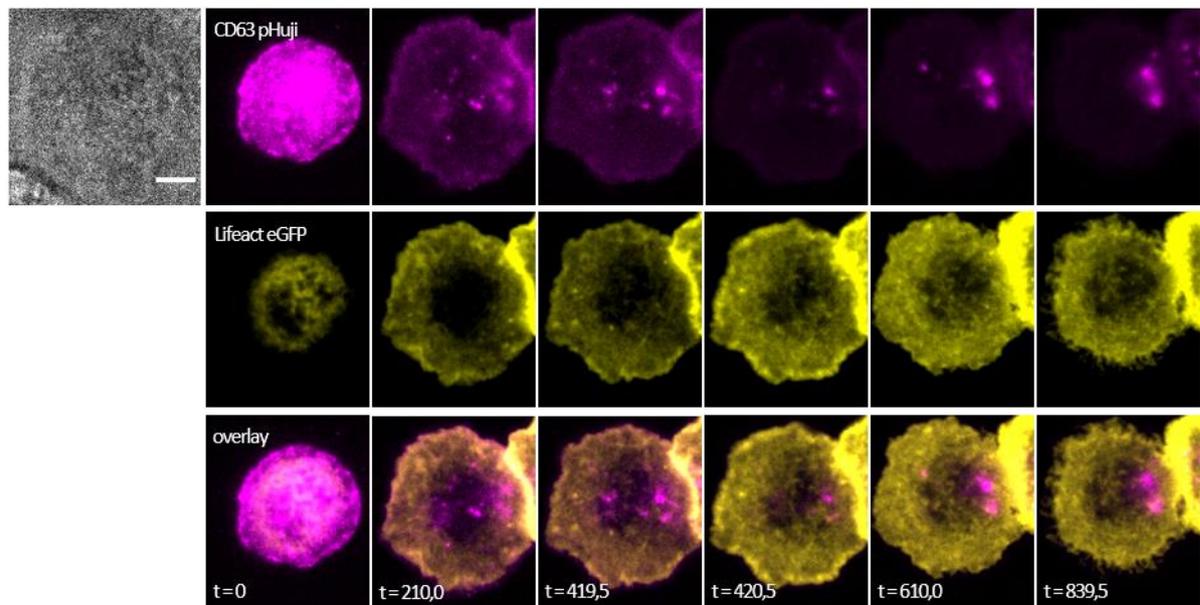


Abbildung 9: Beobachtung der Ausbildung und Veränderung der Immunsynapse (IS) einer cytotoxischen T-Zelle (CTL), die Lifact-eGFP und CD63 pHuji überexprimiert

Darstellung einer repräsentativen, stimulierten CTL, die auf ein CD3-beschichtetes Deckglas gegeben wurde, sodass es zur Ausbildung einer IS gekommen ist. Die CTL überexprimiert Lifact-eGFP (gelb) zur Markierung des Aktinrings und CD63-pHuji (Magenta). Die Aufnahme erfolgte mit TIRFM über 420 Sekunden in $\approx 0,1 \mu\text{M}$ - Calciumlösung und weitere 420 Sekunden in 10 mM - Calciumlösung.

36,5,0% der CTL, die CD63-pHuji und Lifact-eGFP überexprimierten, zeigten CD63-pHuji positive Fusionsereignisse ($N_{\text{Maus}} = 3$, $n_{\text{zellen}} = 156$). Um die CD63-pHuji positiven Vesikel besser zu charakterisieren, zählten wir für 56 CTL, die CD63-pHuji positive Fusionsereignisse gezeigt hatten, eine Gesamtzahl von 1926 CD63-pHuji positiven Vesikel an der IS. Durchschnittlich $34,4 \pm 3,3$ CD63-pHuji positive Vesikel pro CTL waren im TIRFM-Feld sichtbar. Im Durchschnitt

fusionierten $9,1 \pm 0,9\%$ der an der IS erschienen CD63-pHuji positiven Vesikel pro CTL ($N_{\text{Maus}} = 3$; $N_{\text{Zellen}} = 56$; $N_{\text{Vesikel}} = 1926$; $N_{\text{Fusion}} = 122$).

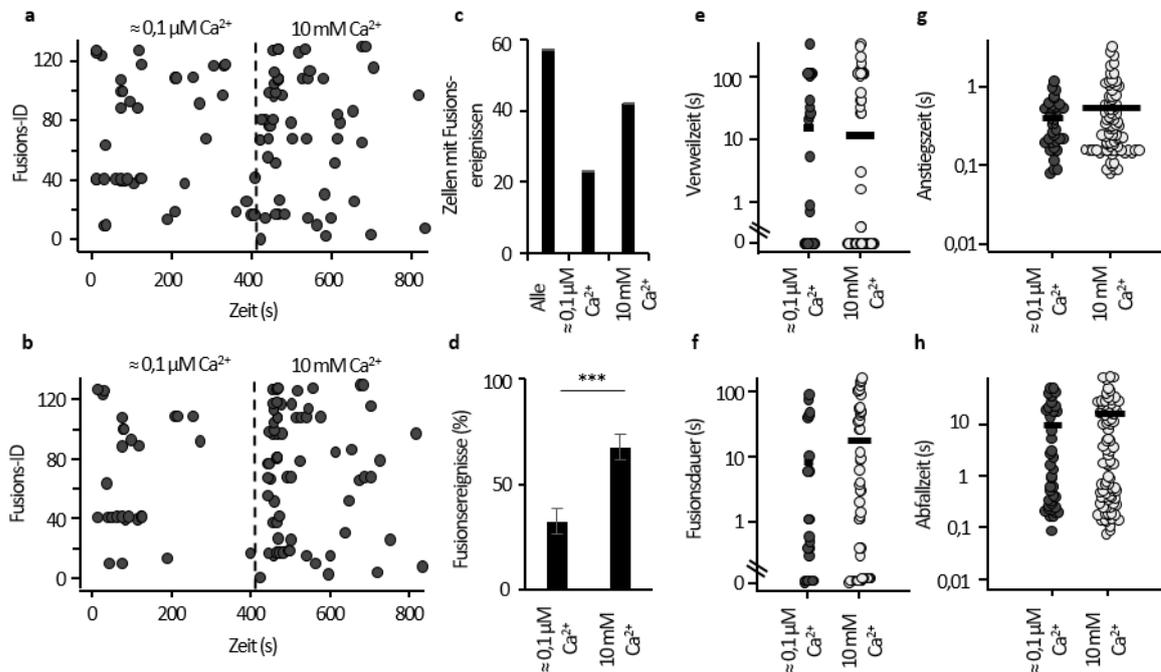


Abbildung 10: Analyse der Fusion CD63-pHuji positiver Vesikel von cytotoxischen T-Zellen (CTL), die zusätzlich Lifact-eGFP überexprimieren, an der Immunsynapse (IS) in $\approx 0,1 \mu\text{M}$ - und 10 mM - Calciumlösung

a) Darstellung des Erscheinens der CD63-pHuji positiven Vesikel an der IS benannt mit einer Fusions-ID über 840 Sekunden. Die gestrichelte Linie markiert den Zeitpunkt, an dem 10 mM - Calciumlösung hinzugefügt wurde. **b)** Streudiagramme der Fusionsereignisse CD63-pHuji positiver Vesikel an der IS für alle CTLs über die Zeit. Jedes Ereignis ist mit einer Fusions-ID benannt. **c)** Balkendiagramm der absoluten Anzahl von CTL, die Fusion gezeigt haben: In der gesamten Aufnahmezeit (Alle), innerhalb der ersten 420 s bei einer extrazellulären $[\text{Ca}^{2+}]$ von $\approx 0,1 \mu\text{M}$ bzw. in den letzten 420 s bei einer extrazellulären $[\text{Ca}^{2+}]$ von 10 mM . **d)** Vergleich der Anzahl an Fusionsereignissen in $\approx 0,1 \mu\text{M}$ - Calciumlösung und in 10 mM - Calciumlösung in Prozent ($N_{\text{Maus}} = 3$; $N_{\text{Zellen}} = 57$; $N_{\text{Fusion}} = 125$; *** $p < 0,001$). **e)** Streudiagramm zum Vergleich der Verweilzeit der CD63-pHuji positiven Vesikel vor Fusion in $\approx 0,1 \mu\text{M}$ - haltiger Calciumlösung und in 10 mM - haltiger Calciumlösung. **f)** Streudiagramm zum Vergleich der Fusionsdauer CD63-pHuji positiver Vesikel in $\approx 0,1 \mu\text{M}$ - Calciumlösung und in 10 mM - Calciumlösung. **g)** Vergleich der Anstiegszeit der Fusion CD63-pHuji positiver Vesikel in $\approx 0,1 \mu\text{M}$ - Calciumlösung und in 10 mM - Calciumlösung. **h)** Vergleich der Abfallzeit der Fusion CD63-pHuji positiver Vesikel in $\approx 0,1 \mu\text{M}$ - Calciumlösung und in 10 mM - Calciumlösung dargestellt als Streudiagramm.

Zur Validierung des Ergebnisses, dass Calcium die Fusion CD63-pHuji positiver Vesikel anregt, erfolgte auch bei diesem Experiment mit CTL, die CD63-pHuji und Lifact-eGFP über-exprimierten, eine Untersuchung in Bezug auf die Fusion CD63-pHuji positiver Vesikel in $\approx 0,1 \mu\text{M}$ - haltiger Calciumlösung und 10 mM - haltiger Calciumlösung. Wie in Abbildung 10a

zu sehen ist, erschienen auch in diesem Experiment mehr CD63-pHuji positive Vesikel an der IS nach der Zugabe von 10 mM - haltiger Calciumlösung (Abbildung 10a) und es kam zu mehr Fusionsereignissen in 10 mM -haltiger Calciumlösung (Abbildung 10b).

Von 125 CD63-pHuji positiven Fusionsereignissen traten 40 in $\approx 0,1 \mu\text{M}$ - haltiger Calciumlösung und 85 in 10 mM - haltiger Calciumlösung auf. Prozentual ergibt das $32,3 \pm 5,9\%$ CD63-pHuji positive Fusionsereignisse in $\approx 0,1 \mu\text{M}$ - Calciumlösung und $67,7 \pm 5,9\%$ CD63-pHuji positive Fusionsereignisse in 10 mM - Calciumlösung. Auch wenn das Ergebnis weniger eindeutig ausfällt, ist es stark statistisch signifikant ($N_{\text{Maus}} = 3$; $N_{\text{Zellen}} = 57$; $N_{\text{Fusion}} = 125$; $***p < 0,001$) (Abbildung 10d). Diese Fusionsereignisse waren folgendermaßen verteilt: Von 57 CTL zeigten 42 CTL in 10 mM - haltiger Calciumlösung Fusionsereignisse und 23 CTL in $\approx 0,1 \mu\text{M}$ - haltiger Calciumlösung. Davon zeigten 8 CTL in beiden Konditionen CD63-pHuji positive Fusionsereignisse. Auch in diesem Experiment konnten wir keinen Einfluss auf die durchschnittliche Anzahl von CD63-pHuji positiven Fusionsereignissen feststellen: Diese betrug durchschnittlich $2,2 \pm 0,3$ CD63-pHuji positive Fusionsereignisse in beiden Konditionen, in $\approx 0,1 \mu\text{M}$ - haltiger Calciumlösung waren es durchschnittlich $1,9 \pm 0,5$ und in 10 mM -haltiger Calciumlösung $2,0 \pm 0,2$ ($N_{\text{Maus}} = 3$; $N_{\text{Zellen}} = 57$; $N_{\text{Fusion}} = 125$). Die Erklärung hierfür ist, dass deutlich mehr CTL in einer extrazellulären $[\text{Ca}^{2+}]$ von 10 mM Fusionsereignisse zeigten. Bei Analyse der Verweilzeit der CD63-pHuji positiven Vesikel im TIRFM-Feld mit Lifeact-eGFP fiel eine breite Streuung mit Verweilzeiten von wenigen Millisekunden bis zu Verweilzeiten von über 100 Sekunden auf. Einen Einfluss von Calcium auf die Verweilzeit konnten wir jedoch nicht feststellen (Abbildung 8e). Im Vergleich zum Experiment mit CTL, die lediglich CD63-pHuji überexprimierten, erscheint die Fusionsdauer von CD63-pHuji positiven Fusionsereignissen von CTL mit Ko-Expression von CD63-pHuji und Lifeact-eGFP mit einer durchschnittlichen Fusionsdauer von $29,7 \pm 4,1$ Sekunden verlängert. Ein Einfluss von Calcium auf die Fusionsdauer konnte jedoch nicht nachgewiesen werden (Abbildung 10f). Auch die durchschnittliche Anstiegszeit mit $0,5 \pm 0,05$ Sekunden (Abbildung 10g) und die durchschnittliche Abfallzeit mit $10,7 \pm 1,5$ Sekunden (Abbildung 10h) wirkt in diesem Experiment verlängert. Ein Einfluss von Calcium auf die Anstiegszeit und die Abfallzeit konnte nicht nachgewiesen werden ($N_{\text{Maus}} = 3$; $N_{\text{Zellen}} = 57$; $N_{\text{Fusion}} = 125$).

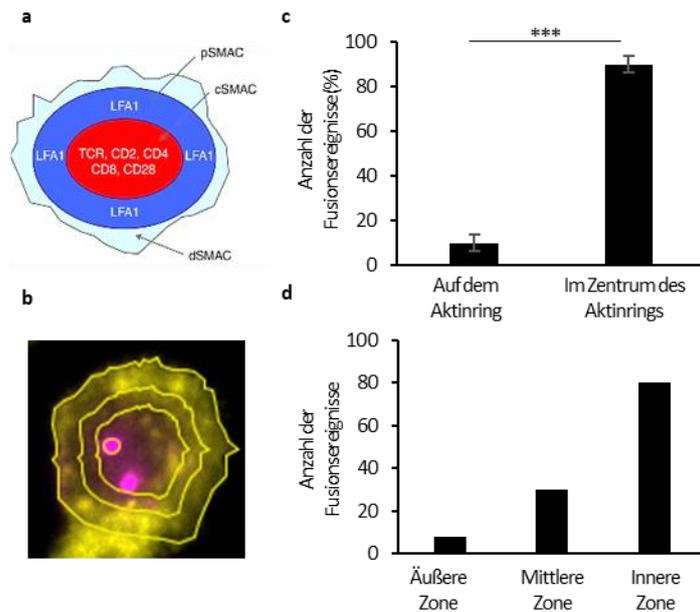


Abbildung 11: Position der Fusion CD63-pHuji positiver Vesikel in der Immunsynapse (IS)

a) Beispielhafte Darstellung der IS mit Unterteilung in den dSMAC, den pSMAC und den cSMAC (Dustin et al., 2010). **b)** Darstellung einer repräsentativen CTL, die Lifact-eGFP und CD63-pHuji überexprimiert. Zur Ausbildung einer IS wurde die CTL auf ein CD3-beschichtetes Deckglas gegeben. Danach wurde mittels TIRFM die Fusion CD63-pHuji positiver Vesikel beobachtet. Zur Analyse der Position der CD63 positiven Vesikel in der IS wurde der Aktin-Ring von außen markiert. Anhand des äußeren Aktin-Rings wurden zwei weitere Zonen definiert. **c)** Verhältnis in Prozent der Fusionsereignisse von CD63 pHuji positiven Vesikel in Bezug auf deren Position zum Aktin-Ring ($N_{\text{Maus}} = 3$; $N_{\text{Zellen}} = 41$; $N_{\text{Fusion}} = 118$; $*** p < 0,001$). **d)** Anzahl der Fusionsereignisse von CD63-pHuji positiven Vesikeln in den unterschiedlichen Zonen der IS, wie sie in **b)** definiert wurden.

Um die Position der Fusion an der IS zu analysieren, wurde per Auge eingeschätzt, ob die Fusion des CD63-pHuji positiven Vesikels in der Mitte des Lifact-eGFP-Rings oder auf dem Lifact-eGFP Ring erfolgte. Es mussten CTL aus der Analyse ausgeschlossen werden, weil sich die Fusion CD63-pHuji positiver Vesikel per Auge nicht eindeutig zu ordnen ließ, sodass 41 CTL beurteilt wurden. Von 92 CD63-pHuji positiven Fusionsereignissen traten 9 auf dem Aktin-Ring und 83 im Zentrum des Aktin-Rings auf. Das ergibt eine Verteilung von $10,2 \pm 3,9\%$ CD63-pHuji positiven Fusionsereignissen auf dem Aktin-Ring gegenüber $89,8 \pm 3,9\%$ CD63-pHuji positiven Fusionsereignissen im Zentrum des Aktin-Rings ($N_{\text{Maus}} = 3$; $N_{\text{Zellen}} = 41$; $N_{\text{Fusion}} = 92$; $*** p < 0,001$) (Abbildung 11c). Um die Position der CD63-pHuji positiven Vesikel genauer zu untersuchen, definierten wir 3 Zonen in der IS zum Zeitpunkt der Fusion des CD63-pHuji positiven Vesikels: Wie in Abbildung 11b beispielhaft dargestellt, markierten wir von außen den Lifact-eGFP-Ring, diesen markierten Ring verkleinerten wir um den Faktor 0,7 zum mittleren Ring und um den Faktor 0,5 zum inneren Ring. Von 52 analysierten CTL mit 118

CD63-pHuji positiven Fusionsereignissen fanden 8 CD63-pHuji positive Fusionsereignisse in der äußeren Zone, 30 in der mittleren Zone und 80 in der inneren Zone statt ($N_{\text{Maus}} = 3$; $N_{\text{Zellen}} = 52$; $N_{\text{Fusion}} = 118$) (Abbildung 11d).

4.5 Fusionsereignisse von CD63-pHuji positiven Vesikeln und Granzym B-mTFP

Nachdem wir im Ko-Lokalisationsversuch eine deutliche Ko-Lokalisation von CD63-pHuji und GzmB festgestellt und darüber hinaus die Fusion CD63-pHuji positiver Vesikel im Zentrum des Aktin-Rings beobachteten hatten, entschieden wir uns in einem Versuch mittels Echtzeit-Mikroskopie genauer zu beobachten, ob bei der Fusion von CD63-pHuji positiven Vesikeln auch eine Freisetzung von GzmB stattfindet. Hierfür nutzten wir CTL aus der Milz von GzmB-mTFP-Knock-In-Mäusen (Chitirala et al. 2020). 3 bis 6 Tage nach der Isolation wurden die CTL mit CD63-pHuji transfiziert. Die Transfektionseffizienz lag bei 42,1% ($N_{\text{Maus}} = 3$; $N_{\text{Zellen}} = 535$). Ab 12 Stunden nach Transfektion wurden die CTL mittels TIRFM aufgenommen. Mit einem 488 nm- und einem 561-nm-Laser wurden GzmB-mTFP und CD63-pHuji gleichzeitig angeregt, um detektiert zu werden. 31,1% der CTL, die CD63-pHuji überexprimierten, zeigten insgesamt 176 CD63-pHuji positive Fusionsereignisse ($N_{\text{Maus}} = 3$; $N_{\text{Zellen}} = 225$). CD63-pHuji positive Fusionsereignisse wurden auf eine Ko-Lokalisation mit GzmB-mTFP untersucht und daraufhin, ob sowohl CD63-pHuji als auch GzmB-mTFP freigesetzt wurden. Die Freisetzung von GzmB-mTFP wurde definiert durch einen Abfall von GzmB-mTFP um mindestens 50% in 200 Millisekunden und dessen vollständiges Verschwinden in 400 Millisekunden. Von 176 CD63-pHuji positiven Fusionsereignissen waren 139 GzmB-mTFP positiv und 37 GzmB-mTFP negativ. In Abbildung 12a, 12b sowie 12c werden hierfür repräsentative Fusionsereignisse, die mit einem Pfeil markiert wurden, dargestellt sowie jeweils die dazugehörigen Verläufe der Fluoreszenzintensitäten für CD63-pHuji und GzmB-mTFP. Mit $76,6 \pm 4,34\%$ GzmB-positiven gegenüber $23,4 \pm 4,34\%$ GzmB-negativen Fusionsereignissen waren signifikant mehr CD63-pHuji positive Fusionsereignisse auch positiv auf GzmB-mTFP ($N_{\text{Maus}} = 3$; $N_{\text{Zellen}} = 70$; $N_{\text{Fusion}} = 176$; *** $p < 0,001$) (Abbildung 12d). Bei 139 CD63-pHuji positiven Fusionsereignissen mit Nachweis von GzmB-mTFP zeigte sich in 30 Fällen eine alleinige Exozytose von CD63-pHuji positiven Vesikeln und in 109 Fällen die Exozytose von CD63-pHuji positiven Vesikeln mit gleichzeitiger Freisetzung von GzmB mTFP. In $22,8 \pm 4,66\%$ der Fälle kam es nur zur Frei-

setzung von CD63-pHuji und in $77,2 \pm 4,66\%$ zur Freisetzung sowohl von CD63-pHuji als auch von GzmB-mTFP ($N_{\text{Maus}} = 3$; $N_{\text{Zellen}} = 60$; $N_{\text{Fusion}} = 139$; *** $p < 0,001$). Die zur weiteren Quantifizierung der CD63-pHuji positiven Fusionsereignisse berechnete mittlere Anstiegszeit betrug $0,41 \pm 0,04$ Sekunden ($N_{\text{Maus}} = 3$; $N_{\text{Zellen}} = 70$; $N_{\text{Fusion}} = 171$) (Abbildung 12e). Mit den Abfallzeiten von CD63-pHuji und GzmB-mTFP wurde ein Korrelationsplot mit Darstellung der Abfallzeiten bei Fusion mit gemeinsamer Freisetzung von CD63-pHuji und GzmB-mTFP in hellgrau, bei alleiniger Freisetzung von CD63-pHuji in Magenta und bei alleiniger Freisetzung von GzmB-mTFP in Türkis erstellt (Abbildung 12f) ($N_{\text{Maus}} = 3$; $N_{\text{Zellen}} = 70$; $N_{\text{Fusion}} = 173$). Hier fällt auf, dass die Freisetzung von GzmB-mTFP hauptsächlich durch kurze Abfallzeiten bis 1 Sekunde gekennzeichnet sind, wo hingegen es bei der Freisetzung von CD63-pHuji Abfallzeiten, die über 10 Sekunden betragen, gibt. Zu beachten ist, dass in 10 Fällen wo GzmB-mTFP und CD63-pHuji zusammen freigesetzt wurden, auch bei der Freisetzung von GzmB-mTFP längere Abfallzeiten beobachtet wurden.

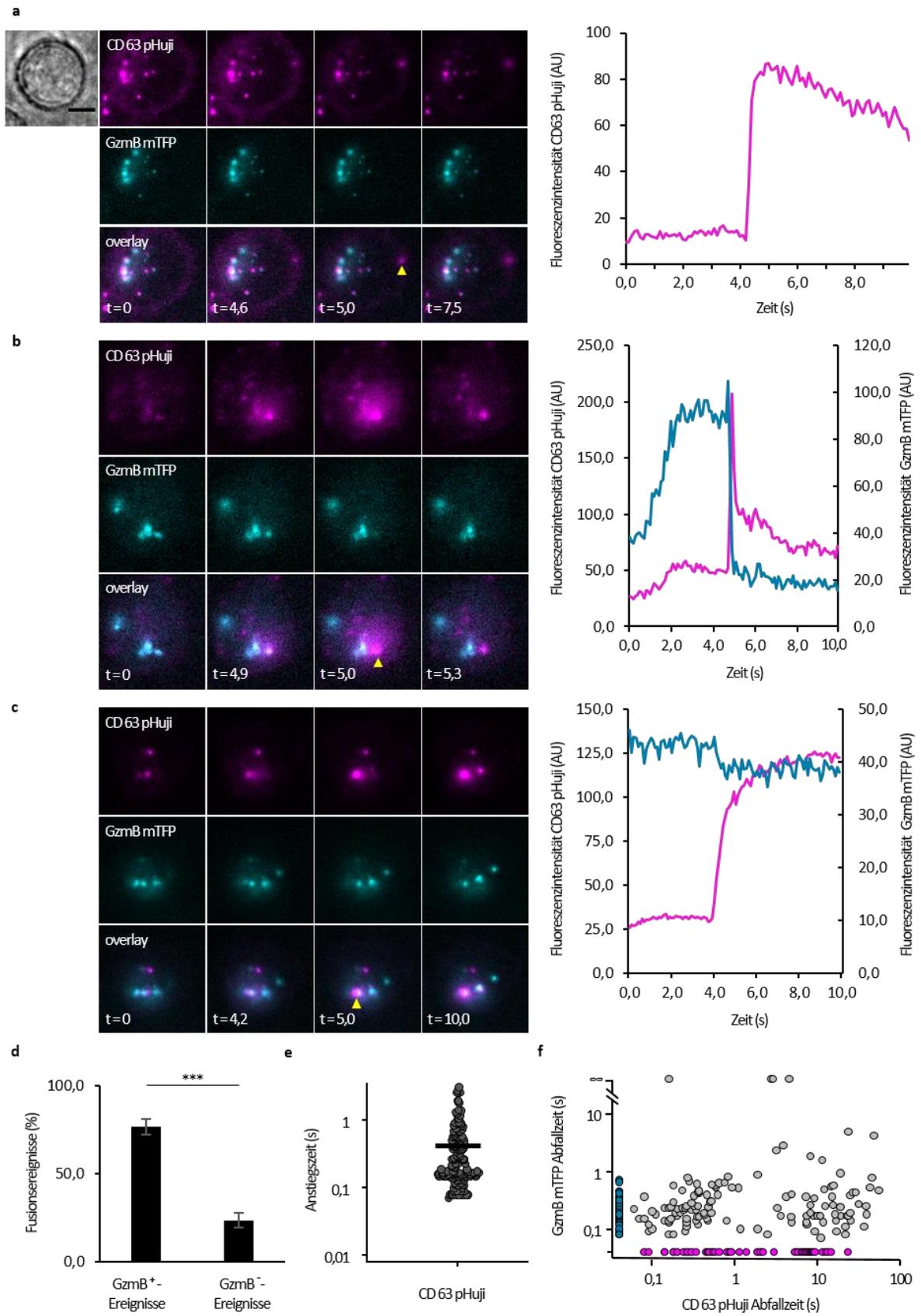


Abbildung 12: Untersuchung von Fusionsereignissen CD63-pHuji bzw. Granzym B-TFP positiver Vesikel in cytotoxischen T-Zellen (CTL) mittels interner Totalreflexionsfluoreszenzmikroskopie (TIRFM) an der Immunsynapse (IS)

a), b), c) Abbildungen von repräsentativen CTL isoliert aus der GranzymB-mTFP-Knock-in-Maus, die CD63-pHuji überexprimieren. Die CTL wurden zur Ausbildung einer IS auf CD3-beschichtete Deckgläser gegeben und mit TIRFM aufgenommen, um zu untersuchen, ob fusionierende CD63 positive Vesikel auch GzmB-mTFP enthalten. Maßstabsbalken: 5 μm . In **a** ist ein repräsentatives Fusionsereignis von einem CD63-pHuji positiven, GzmB-mTFP negativen Vesikel dargestellt. Rechts davon wurde der zeitliche Verlauf der Fluoreszenzintensität von CD63-pHuji dargestellt. In **b** wurde ein repräsentatives Fusionsereignis eines Vesikels, das CD63-pHuji und GzmB-mTFP positiv ist dargestellt. Anhand des zeitlichen Verlaufs (rechts) der Fluoreszenzintensität von CD63-pHuji (Magenta) und von GzmB-mTFP (Türkis) ist erkennbar, dass beide Proteine freigesetzt werden. In **c** wurde ein repräsentatives Fusionsereignis eines CD63-pHuji und GzmB-mTFP positiven Vesikels dargestellt, in dem das CD63 freigesetzt wurde, jedoch nicht das GzmB-mTFP. Dies ist anhand des zeitlichen Verlaufs der Fluoreszenzintensitäten (rechts) von beiden fluoreszierenden Proteinen erkennbar. **d)** Anteil GzmB-positiver (GzmB^+) Ereignisse und GzmB-negativer (GzmB^-) Ereignisse in Bezug auf alle CD63-pHuji-Fusionsereignisse in Prozent ($N_{\text{Maus}} = 3$; $N_{\text{Zellen}} = 70$; $N_{\text{Fusion}} = 174$; *** $p < 0,001$). **e)** Streupunktdiagramm der Anstiegszeit der Fluoreszenzintensität der CD63-pHuji positiven Vesikel. **f)** Korrelationsplot der Abfallzeiten der Fluoreszenzintensität von GzmB-mTFP und von CD63-pHuji. In Türkis dargestellt sind die Abfallzeiten der GzmB-mTFP positiven Fusionsereignisse ohne Nachweis von CD63 pHuji. In Magenta dargestellt sind die Abfallzeiten der CD63 pHuji positiven Fusionsereignisse ohne Nachweis von GzmB-mTFP. In hellgrau dargestellt sind die Abfallzeiten der GzmB- und CD63 pHuji positiven Fusionsereignisse.

5 Diskussion

5.1 Höhere Ko-Lokalisation zwischen CD63 und Granzym B als zwischen CD63 und CD81

In den letzten Jahrzehnten ist die Immunologie immer stärker in den Fokus des wissenschaftlichen und medizinischen Interesses gerückt, unter anderem weil ein Weg gefunden werden konnte, mithilfe des Immunsystems maligne Zellen zu bekämpfen. Aber auch die Forschung über Exosomen hat an Interesse gewonnen: Zum einen können durch Krebszellen ausgeschüttete Exosomen einen immunsupprimierenden Einfluss auf das Immunsystem nehmen (Chen et al., 2018), zum anderen gibt es Versuche, von T-Zellen ausgeschüttete extrazelluläre Vesikel (EVs) für die Krebstherapie zu entwickeln (Hong et al., 2021). Im Rahmen dieser Arbeit haben wir CD63 als möglichen Marker für Exosomen von cytotoxischen T-Zellen (CTL) untersucht. Zunächst wurde die Ko-Lokalisation von CD63-pHuji positiven Vesikeln mit CD81 pHluorin und Granzym B (GzmB) als Marker von cytotoxischen Granula (engl. cytotoxic granules, CG) mittels „Structured illumination“-Mikroskopie (SIM) in CTL untersucht. Sowohl CD63 als auch CD81 gelten als Marker für Exosomen (Raposo und Stoorvogel, 2013; Verweij et al., 2018), jedoch wurde CD63 auch auf CGs nachgewiesen (Peters et al., 1991). Insofern war die nachgewiesene hohe Ko-Lokalisation zwischen CD63-pHuji und GzmB, gefärbt mit einem anti-GzmB-Antikörper gekoppelt an Alexa-647, interessant. Erstaunlicherweise war die Ko-Lokalisation zwischen den beiden Exosomenmarkern CD63 und CD81 nicht besonders ausgeprägt. Jedoch wurde 2021 durch Han et al. ebenfalls nachgewiesen, dass die Ko-Lokalisation zwischen CD63 und CD81 auf EVs von HEK293-Zellen, von MCF-Zellen und von B16BL6-Zellen nicht übermäßig hoch ist: 11% der EVs waren positiv auf CD63, CD81 und CD9 und weniger als 3% der EVs waren CD63-CD81 positiv und CD9 negativ. Mit 34% war der Anteil an nur CD63 positiven EVs hoch (Han et al., 2021). Jedoch untersuchten Han et al. bereits ausgeschüttete EVs, während in dieser Arbeit die Ko-Lokalisation von CD63 und CD81 in intrazellulären Vesikeln, d.h. in multivesikulären Körpern (engl. multivesicular bodies, MVBs) oder Multi core granules (MCGs), untersucht wurde. Somit belegen die Ergebnisse dieser Arbeit, dass CD63 und CD81 in CTL selten auf denselben Vesikeln vorkommen.

5.2 Variable Verweilzeiten von CD63-pHuji positiven Vesikeln an der Immunsynapse vor Fusion

Nachfolgend stellte sich die Frage, wie wir die CD63-pHuji positiven Vesikel weiter untersuchen wollten. Zur Untersuchung von Exosomen ist eine viel genutzte Technik die Isolation der Exosomen mittels Ultrazentrifugation aus dem Überstand (Théry et al., 2006). Mittels interner Totalreflexionsfluoreszenzmikroskopie (TIRFM) untersuchten Verweij et al. an HeLa-Zellen, die mit CD63-pHluorin transfiziert waren, die Fusion von MVBs und somit die Freisetzung von Exosomen (Verweij et al., 2018). Auch unser Interesse galt der Frage, wie Echtzeit-Mikroskopie der Fusion CD63-pHuji positiver Vesikel in CTL aussieht und wo diese Fusionsereignisse stattfinden, sodass wir uns ebenfalls für TIRFM entschieden. Mit CD3-beschichteten Deckgläsern werden CTL stimuliert und zum Ausbilden einer Immunsynapse (IS) auf dem Deckglas angeregt, wo in der sekretorischen Zone Degranulation stattfindet (Stinchcombe, 2001). Weil sich mit TIRFM Ereignisse nahe des Deckglases besonders gut beobachten lassen, ist TIRFM ein geeignetes Instrument für unsere Fragestellung. Bei der Beobachtung CD63-pHuji positiver Fusionsereignisse konnten wir feststellen, dass einige Vesikel lange Zeit vor der Fusion an der IS sichtbar waren, während andere sehr schnell Fusion zeigten. Die Zeit, die Vesikel an der IS vor Fusion sichtbar waren, haben wir in dieser Arbeit als Verweilzeit bezeichnet. Man könnte stattdessen auch von Andockzeit der CD63-pHuji positiven Vesikel sprechen. Unter andockten Vesikeln versteht man Vesikel, die an der Plasmamembran schwach gebunden und somit sichtbar sind, bevor sie für die Fusion vorbereitet werden (engl. priming) und schließlich eine Fusionspore bilden, um ihren Inhalt freizusetzen (Becherer und Rettig, 2006; Verhage und Sørensen, 2008). Für CGs wurde durch Ming et al. eine durchschnittliche Verweildauer von 28,5 Sekunden festgestellt, bei einer starken Variabilität von unter 1 Sekunde bis 296 Sekunden (Ming et al., 2015). Auch für CD63-pHuji positive Fusionsereignisse von CTL, die aus der GzmB-mTFP-Knock-In-Maus gewonnen wurden, fällt eine große Bandbreite der Verweilzeiten zwischen wenigen Millisekunden und mehr als hundert Sekunden auf bei einer mittleren Verweilzeit von $14,1 \pm 2,4$ Sekunden. Jedoch gab es auch viele Ereignisse, wo es direkt nach Erscheinen des CD63-pHuji positiven Vesikels zur Fusion kam. Für Fusionsereignisse unmittelbar nach Erscheinen des Vesikels wurde von Verhage et al. der Begriff „Crash-Fusion“ eingeführt (Verhage, 2008). Wenn man

$\leq 0,5$ Sekunden als Grenzwert für Crash-Fusion nimmt, betrug der Anteil von „Crash“-Fusion an CD63-pHuji positiven Fusionsereignissen 41,1 % ($N_{\text{Maus}} = 3$, $N_{\text{Zellen}} = 69$, $N_{\text{Fusion}} = 163$). Die Zeit entspricht nicht der Studie von Mahmood et al. bei der die Freisetzung CD63-pHluorin positiver Exosomen aus MVBs durch A549-Zellen untersucht wurde und eine minimale Andockzeit von 1 Sekunde nachgewiesen wurde (Mahmood et al., 2023). „Crash-fusion“ Ereignisse fanden sowohl bei doppelt CD63-pHuji und GzmB-mTFP positiven Ereignissen wie auch bei GzmB-negativen CD63-pHuji positiven Fusionsereignissen statt. Anhand der Verweilzeit ist eine Zuordnung der CD63-pHuji positiven Fusionsereignisse zu einem bestimmten Vesikel-Typ daher nicht möglich. Hierfür ist eine weitere Charakterisierung notwendig.

5.3 Zwei Typen von CD63-pHuji positiven Fusionsereignissen

Bei der Analyse der CD63-pHuji positiven Fusionsereignisse konnten wir hauptsächlich zwei Typen von Fusionen feststellen. Der erste Typ zeigt einen schnellen Anstieg sowie einen schnellen Abfall der Fluoreszenzintensität. Beim zweiten Typ kommt es nach einem schnellen Anstieg der Fluoreszenzintensität zu einem langsamen Abfall der Fluoreszenzintensität. Eine mögliche Erklärung hierfür ist, dass es sich um die Fusion verschiedener CD63-pHuji positiver Vesikel handelt. Estl et al. konnten ebenfalls für Synaptobrevin2-pHuji als wichtigstem v-SNARE von CGs kurze Fusionsereignisse und lange Fusionsereignisse mit langsamem Abfall der Fluoreszenzintensität von Synaptobrevin2-pHuji beobachten, wobei der Anteil an langen Fusionsereignissen gering war. Wenn der Schwellenwert bei einer Sekunde liegt, entsprachen ca. 15% aller Synaptobrevin2-pHuji positiven Fusionsereignisse einem langsamen Abfall (Estl et al., 2020). In dieser Arbeit zeigten 23% aller CD63-positiven Fusionsereignisse aus den Experimenten, in dem CD63-pHuji überexprimierende CTL aus Wildtyp-Mäusen untersucht wurden, einen langsamen Abfall. Bei den Experimenten mit CTL, die aus der GzmB-Knock-In-Maus gewonnen wurden, war der Anteil mit langsamem Abfall mit 49% sogar höher. Eine mögliche Erklärung für die Unterschiede zwischen den Versuchsreihen in dieser Arbeit ist die Variabilität zwischen den Kulturen ($N_{\text{Maus}} = 1$, $n_{\text{Zellen}} = 45$, $n_{\text{Fusion}} = 120$ für die Experimente mit CD63-pHuji Überexpression, $N_{\text{Maus}}=3$, $n_{\text{Zellen}}= 70$, $n_{\text{Fusion}} = 174$ für die Experimente mit CD63-pHuji Überexpression in GzmB-mTFP-Knock-In-CTL). Bei beiden Versuchsreihen war der Anteil an Fusionsereignissen mit langsamem Abfall höher als der von Estl et al. Zwischen den in dieser

Arbeit beschriebenen schnelleren CD63-pHuji positiven Fusionsereignissen und den schnellen Synaptobrevin2-pHuji positiven Fusionsereignissen von Estl et al. besteht eine Ähnlichkeit, sodass es sich bei den schnelleren CD63-pHuji positiven Fusionsereignissen möglicherweise um die Fusion von SCGs mit Freisetzung löslicher cytotoxischer Proteine handelt. Bei der Untersuchung CD63-pHluorin positiver Fusionsereignisse von HeLa-Zellen konnten Verweij et al. nachweisen, dass es sich um die Fusion von CD63-pHluorin positiven MVBs mit Freisetzung von CD63-pHluorin positiven Exosomen handelte. Dabei wurden hauptsächlich länger andauernde Signale von CD63-pHluorin beobachtet (Verweij et al., 2018). In HeLa-Zellen scheint CD63 ein spezifischer Marker für MVBs und Exosomen zu sein. Für CTL wurde CD63 jedoch auf CGs nachgewiesen, weshalb sie auch als sekretorische Lysosomen bezeichnet werden (Peters et al., 1991; Schmidt et al., 2009). Mittlerweile ist bekannt, dass es zwei Klassen von CGs gibt: CGs mit einem elektronendichten Kern (engl. single core granules, SCG), die lösliche cytotoxische Proteine freisetzen, und CGs mit mehreren elektronendichten Kernen und teilweise mit einem multivesikulären Anteil (engl. multi core granules, MCG), die supramolekulare Angriffspartikel (engl. supramolecular attack particles, SMAP) und Exosomen freisetzen (Chang et al., 2022). Aufgrund der Beobachtung von hauptsächlich langen Fusionsereignissen postulierten Verweij et al. eine unterschiedliche Fusionskinetik bei der Fusion von MVBs mit Freisetzung von Exosomen verglichen mit der Fusionskinetik bei der Freisetzung löslicher Proteine (Verweij et al., 2018). Während für Synaptobrevin2-pHuji - einem Protein auf der CG-Membran - hauptsächlich schnelle Fusionsereignisse von Estl et al. beobachtet wurden und von Verweij et al. für MVBs hauptsächlich lange MVB-Fusionsereignisse nachgewiesen wurden, wurden in dieser Arbeit sowohl schnelle als auch lange CD63-pHuji positive Fusionsereignisse beobachtet (Estl et al., 2020; Verweij et al., 2018). Dies könnte dahingehend interpretiert werden, dass es sich bei den CD63-pHuji positiven Fusionsereignissen mit einer Abfallzeit von <1 Sekunde um die Degranulation von SCGs und bei den Fusionsereignissen mit Abfallzeiten >1 Sekunde um MCGs oder MVBs handelt. Bebelman et al. berichteten über unvollständige MVB-Fusionsereignisse sichtbar gemacht durch an pHluorin-gekoppelte Tetraspanine (TSPANS), bei denen auf einen Anstieg der Fluoreszenzintensität kein oder nur ein unvollständiger Abfall der Fluoreszenzintensität folgt. Sie verglichen diese Ereignisse mit „Kiss-and-run“-Exozytose von synaptischen Vesikeln, bei der es lediglich zu einem kurzen Öffnen der Fusionspore mit Abgabe des Vesikel-Inhalts aber

nicht zu einem Verschmelzen des Vesikels mit der Membran kommt. Dieses Phänomen erklärten sie mit einer unvollständigen Fusion von MVBs mit keiner oder nur teilweiser Freisetzung von Exosomen (Bebelman et al., 2020). Auch in dieser Arbeit sahen wir CD63-pHuji positive Fusionsereignisse ohne Abfall der Fluoreszenzintensität oder nur mit einem unvollständigen Abfall der Fluoreszenzintensität. Da bekannt ist, dass „Kiss-and-run“ bei der Exozytose verschiedener Vesikel auftreten kann, lässt dies keinen Rückschluss auf die Zuordnung CD63-pHuji positiver Fusionsereignisse zu. Teilweise beobachteten wir im Bereich eines CD63-pHuji positiven Vesikels, das bereits Fusion gezeigt hatte, einen weiteren starken Anstieg der Fluoreszenzintensität und einen optischen Austritt von kleineren Vesikeln. Eine mögliche Erklärung hierfür ist, dass CD63-pHuji positive Exosomen aus dem Inneren des fusionierten Vesikels beim Austritt näher ans Deckglas diffundieren und daher die Fluoreszenzintensität ansteigt. Eine weitere Erklärung ist, dass es zunächst zu einer unvollständigen Fusion gekommen war und im weiteren Verlauf eine vollständige Fusion auftritt. Allgemein kann anhand der Fusionskinetik CD63-pHuji positiver Fusionsereignisse bereits eine erste Zuordnung in SCGs für die kurzen Ereignisse und MCGs sowie MVBs für die langen Ereignisse vorgenommen werden.

5.4 Calcium ist ein Trigger für CD63-pHuji positive Fusionsereignisse

Calcium ist notwendig für die Exozytose verschiedener Vesikel. Der Nachweis, dass Calcium wichtig für die Zytolyse durch CTL ist, gelang Plaut et al. bereits in den 1970ern (Plaut et al., 1976). Es reichen bereits relativ geringe Mengen an Calcium für die Zytolyse der TC durch CTL aus. Die gängige Meinung ist, dass die Zytolyse mittels Fas/Fas-Ligand-Signalweg weniger Calcium benötigt als die Zytolyse der TC durch Perforin und Granzyme (Kaschek et al., 2021). Die Freisetzung von CGs ist jedoch ebenfalls in niedriger Calciumlösung möglich, weshalb vermutet wurde, dass Calcium eine zweite Welle an CG-Fusionen auslöst (Sleiman et al., 2020). Für Exosomen konnte nachgewiesen werden, dass Calcium deren Freisetzung unterstützt. Dabei spielt sowohl Calcium aus intrazellulären Speichern als auch Calcium aus dem extrazellulären Raum eine Rolle (Savina et al., 2003). In dieser Arbeit konnten wir nachweisen, dass Calcium ein wichtiger Trigger für die Fusion CD63-pHuji positiver Vesikel ist. Es zeigten signifikant mehr CTL CD63-pHuji positive Fusionsereignisse in 10 mM - haltiger Calciumlösung als in $\approx 0,1 \mu\text{M}$ - haltiger Calciumlösung. Dies ließ sich in der ersten

Versuchsreihe mit TIRFM sehr deutlich nachweisen, in dem CTL nach einer Einzeltransfektion CD63-pHuji überexprimierten. Aber auch CTL mit Ko-Expression von CD63-pHuji und Lifeact-eGFP zeigten signifikant mehr CD63-pHuji positive Fusionsereignisse in 10 mM - Calciumlösung als in $\approx 0,1 \mu\text{M}$ - Calciumlösung. Allerdings bestand durchaus eine Abweichung zwischen beiden Experimenten. Eine mögliche Erklärung hierfür ist, dass es eine gewisse Variabilität zwischen den Kulturen gibt ($N_{\text{Maus}} = 2$, $n_{\text{Zellen}} = 47$ für die Experimente mit CD63-pHuji-Expression, $N_{\text{Maus}} = 3$, $n_{\text{Zelle}} = 57$ für die Experimente mit CD63-pHuji- und Lifeact-eGFP-Ko-Expression). Interessanterweise war vor allem die Anzahl der CTL, die CD63-pHuji positive Fusionen zeigte, in 10 mM - haltiger Calciumlösung gegenüber $\approx 0,1 \mu\text{M}$ - haltiger Calciumlösung erhöht, während die höhere extrazelluläre Calciumkonzentration keinen wesentlichen Einfluss auf die durchschnittliche Anzahl der CD63-pHuji positiven Fusionsereignisse pro CTL hatte. Calcium scheint also mehr CTL zur Fusion CD63-pHuji positiver Vesikel anzuregen. Da die Fusion von CG und MVBs gleichermaßen durch eine intrazelluläre Erhöhung der Calciumkonzentration eingeleitet wird (Kaschek et al., 2021; Savina et al., 2003), ist die Tatsache, dass Calcium ein Trigger für die CD63-pHuji positive Fusionsereignisse war, nicht ausreichend, um zu klären, ob diese Fusionsereignisse von CGs oder MVBs stammen.

5.5 CD63-pHuji positive Fusionsereignisse finden vor allem im Zentrum des Aktin-Rings statt

In Bezug auf die IS spielt Aktin eine wichtige Rolle: Es ist vor allem im distalen supramolekularen Aktivierungscluster (dSMAC) und im peripheren supramolekularen Aktivierungscluster enthalten (pSMAC). Zum einen bewirken retrograde Bewegungen des Aktins im dSMAC, dass Mikrocluster aus T-Zellrezeptoren (engl. t-cell receptor, TCR) in den zentralen supramolekularen Aktivierungscluster (cSMAC) gelangen (Yi et al., 2012), zum anderen kann die Dichte des kortikalen Aktins regulierend auf die Degranulation von CGs wirken (Ritter et al., 2017). Um die Position der CD63-pHuji positiven Fusionsereignisse in der IS zuordnen zu können, entschieden wir uns für eine fluoreszierende Markierung des filamentösen Aktins (F-Aktin) in lebenden CTL mit Lifeact-eGFP, das in der Echtzeit-Mikroskopie als Standardmethode für die Färbung von F-Aktin eingesetzt wird (Flores et al., 2019). Mithilfe dieses Experiments konnten wir nachweisen, dass CD63-pHuji positive

Fusionsereignisse vorwiegend im Aktin-armen Bereich der IS sichtbar waren. Bei dem beobachteten Bereich könnte es sich um die sekretorische Zone zwischen den Adhäsionsmolekülen im pSMAC und dem cSMAC handeln (Stinchcombe et al., 2001). Für CGs ist bekannt, dass sie in der sekretorischen Zone degranulieren, sodass es sich bei dem geringen Anteil von $10,2 \pm 3,9\%$ der CD63-pHuji positiven Fusionsereignissen auf dem Aktin-Ring um Fusionsereignisse von MVBs handeln könnte.

Zu bemerken ist, dass die Überexpression von Lifeact-eGFP möglicherweise einen Einfluss auf das Sekretionsverhalten der CTL hatte. Im Vergleich zu der Einzeltransfektion mit CD63-pHuji, wo die CTL durchschnittlich $3,2 \pm 0,7$ Fusionsereignisse zeigten, wiesen die CTL mit Ko-Expression von CD63-pHuji und Lifeact-eGFP mit durchschnittlich $2,2 \pm 0,3$ Fusionsereignissen pro Zelle weniger CD63-pHuji positive Fusionsereignisse auf. Außerdem waren Anstiegszeit und Abfallzeit der CD63-pHuji positiven Fusionsereignisse von CTL mit Ko-Expression von CD63-pHuji und Lifeact-eGFP länger, mit einer durchschnittlichen Anstiegszeit von $0,5 \pm 0,05$ Sekunden und einer durchschnittlichen Abfallzeit von $10,7 \pm 1,5$ Sekunden. Riedl et al. konnten in vivo und in vitro keinen Einfluss von Lifeact auf filamentöses Aktin feststellen (Riedl et al., 2008). Jedoch wurde durch Courtemanche et al. ein konzentrationsabhängiger Einfluss durch Lifeact-mCherry und mEGFP-Lifeact auf Aktinfilamente in Hefezellen nachgewiesen (Courtemanche et al., 2016). Auch von Flores et al. konnte nach Transduktion von Lifeact-TagGFP2 in menschlichen mesenchymalen Stammzellen (engl. human mesenchymal stem cells, hMSCs) eine Veränderung des Aktin-Zytoskeletts und ein Einfluss auf das Mikrotubuli-Netzwerk beobachtet werden (Flores et al., 2019). Weil sowohl Dichte des Aktins als auch die Polarisation des Mikrotubuli-Organisationszentrum (MTOC) zur IS für die Degranulation von CGs wichtig sind (Dustin et al., 2010; Ritter et al., 2017), wäre ein Einfluss auf CD63-pHuji positive Fusionsereignisse durch Lifeact-eGFP denkbar.

5.6 Einteilung der CD63-pHuji positiven Fusionsereignisse

Bereits seit Jahrzehnten wird untersucht, wie CTL eine Zielzelle (engl. target cell, TC) angreifen und zerstören. Der Kontakt einer CTL mit der TC führt dazu, dass durch die Fusion von SCGs an der IS die enthaltenen löslichen cytotoxischen Proteine wie Perforin und GzmB und durch die Fusion von MCGs an der IS SMAPs freigesetzt werden, sodass die TC eliminiert wird (Chang

et al., 2022). Außerdem kann die TC durch den Fas/Fas-Ligand-Signalweg abgetötet werden (Waring und Müllbacher, 1999). Berichte über cytotoxisch wirkende Exosomen, beispielsweise von genetisch veränderten T-Zellen mit einem chimären Antigenrezeptor (engl. chimeric antigen receptor, CAR) oder natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) (Fu et al., 2019; Kim et al., 2023) weisen darauf hin, dass es noch weitere Mechanismen gibt, mit denen cytotoxische Zellen TC angreifen. Der elektronenmikroskopische Nachweis von einem vesikulären Anteil in >20% der MCGs durch Chang et al. spricht dafür, dass bei der Fusion von MCGs neben SMAPs auch Exosomen freigesetzt werden können (Chang et al., 2022). Für die in dieser Arbeit untersuchten CD63-pHuji positiven Vesikel, die von CTL ausgeschüttet werden, gibt es mehrere Möglichkeiten. Die 1. Möglichkeit ist, dass es sich bei den $23,4 \pm 4,34$ % GzmB-mTFP negativen CD63-pHuji positiven Fusionsereignissen um Fusion von MVB mit Freisetzung von (cytotoxischen) Exosomen handelt. In unserer Arbeitsgruppe gelang Nadia Alawar der Nachweis von CD63 mittels Westernblot auf von CTL ausgeschütteten Exosomen, die mit Ultrazentrifugation aus dem Zellüberstand von CTL gewonnen wurden (mündliche Mitteilung, unpublizierte Daten). Es ist daher nachgewiesen, dass CTL CD63-pHuji positive Exosomen freisetzen. Um abschließend zu beweisen, dass diese GzmB-mTFP negativen, CD63-pHuji positiven Fusionsereignisse tatsächlich Exosomen freisetzen, sind jedoch weitere Untersuchungen notwendig. Es wäre auch interessant zu untersuchen, ob von CTL ausgeschüttete CD63-pHuji positive Exosomen cytotoxisch wirken. Als 2. Möglichkeit kommt infrage, dass es sich bei den Fusionsereignissen mit Freisetzung von CD63-pHuji gemeinsam mit GzmB um SCGs, also um herkömmliche CGs, handelt, bei denen CD63 in der Vesikelmembran ist (Peters et al., 1991). Als 3. Option könnte es sich bei den Fusionsereignissen von CD63-pHuji positiven Vesikeln mit Nachweis von GzmB, aber ohne Abfall von GzmB-mTFP um die Fusion von MCGs mit Freisetzung von SMAPs handeln, weil nachgewiesen wurde, dass GzmB in SMAPs über einen längeren Zeitraum an der IS sichtbar sein kann (Chang et al., 2022).

Um von CTL ausgeschüttete CD63-pHuji positive Vesikel weiter zu charakterisieren und nachzuweisen, dass es sich hierbei tatsächlich teilweise um Exosomen aus MVBs handelt, ist noch weitere Forschung notwendig. Interessante Fragen, die in der Zukunft untersucht werden könnten, sind: Haben CTL tatsächlich mehrere Untergruppen an CD63-pHuji positiven

Vesikeln, wie diese Arbeit nahelegt? Gibt es CD63-pHuji positive Vesikel mit Nachweis anderer Exosomenmarker in CTL? Hierfür wären Experimente mit fixierten CTL, die CD63-pHuji überexprimieren und Immunfärbungen von Exosomenmarkern wie etwa Alix oder TSG-101 geeignet. Es wäre interessant zu untersuchen, ob es sich bei CD81 um den spezifischeren Marker für MVBs und Exosomen von CTL handelt. Die geringe Ko-Lokalisation von CD81-pHluorin mit GzmB, die in dieser Arbeit nachgewiesen wurde, könnte darauf hindeuten. Eine interessante Frage ist auch, ob CD81-pHluorin positive Fusionsereignisse an der IS auftreten. Echtzeit-Mikroskopie von stimulierten CTL mit Ko-Expression von CD63-pHuji und CD81-pHluorin könnte Aufschluss darüber geben, ob der geringe Anteil von Vesikeln mit Ko-Lokalisation von CD63-pHuji und CD81-pHluorin gemeinsam an der IS fusioniert und ihren Inhalt - möglicherweise Exosomen - freisetzt. Sowohl für CD81-positive Vesikel als auch für CD63-positive Vesikel stellt sich die Frage, ob sie auch außerhalb der IS beispielsweise am distalen Pol der CTL fusionieren.

Die Ergebnisse dieser Arbeit lassen den Schluss zu, dass CD63 in CTL auf beiden Klassen von CGs und auf MVBs vorkommt und somit für CTL kein spezifischer Marker für MVBs und Exosomen ist. Auch wenn es sich bei CD63 in CTL nicht um einen spezifischen Marker für MVBs handelt, lassen sich mit den Ergebnissen dieser Arbeit verschiedene Erkenntnisse gewinnen:

1. Die Fusionskinetik für Fusion von MVBs und MCGs scheint mit einer langsamen Abfallzeit ähnlich zu sein, während bei der Fusion von SCGs sowohl Anstiegs- als auch Abfallzeit der Fluoreszenzintensität kürzer sind.
2. Durch Calcium werden CTL zur Fusion CD63-pHuji positiver Vesikel angeregt.
3. CD63-pHuji positive Fusionsereignisse finden vor allem innerhalb des Aktin-Rings statt.

6 Literaturverzeichnis

- Abbas, A.K., K.M. Murphy, und A. Sher. 1996. Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nature*. 383:787-793, DOI: 10.1038/383787a0
- Aust, G. 2020. Blut und lymphatische Organe - Grundlagen. *In* Duale Reihe Anatomie. G. Aumüller, G. Aust, J. Engele, J. Kirsch, G. Maio, A. Mayerhofer, . . . H.-G. Zilch, editors. Georg Thieme Verlag KG, Stuttgart. 165-192. ISBN: 978-3-13-241753-3.
- Baj-Krzyworzeka, M., R. Szatanek, K. Weglarczyk, J. Baran, B. Urbanowicz, P. Brański, . . . M. Zembala. 2006. Tumour-derived microvesicles carry several surface determinants and mRNA of tumour cells and transfer some of these determinants to monocytes. *Cancer Immunology Immunotherapy*. 55:808-818, DOI: 10.1007/s00262-005-0075-9.
- Bálint, Š., S. Müller, R. Fischer, B.M. Kessler, M. Harkioliaki, S. Valitutti, und M.L. Dustin. 2020. Supramolecular attack particles are autonomous killing entities released from cytotoxic T cells. *Science*. 368:897-901, DOI: 10.1126/science.aay9207.
- Bebelman, M.P., P. Bun, S. Huvneers, G. van Niel, D.M. Pegtel, und F.J. Verweij. 2020. Real-time imaging of multivesicular body–plasma membrane fusion to quantify exosome release from single cells. *Nature protocols*. 15:102-121, DOI: <https://doi.org/10.1038/s41596-019-0245-4>.
- Becherer, U., und J. Rettig. 2006. Vesicle pools, docking, priming, and release. *Cell and tissue research*. 326:393-407, DOI: <https://doi.org/10.1007/s00441-006-0243-z>.
- Blanchard, N., D. Lankar, F. Faure, A. Regnault, C. Dumont, G. Raposo, und C. Hivroz. 2002. TCR activation of human T cells induces the production of exosomes bearing the TCR/CD3/ζ complex. *The Journal of Immunology*. 168:3235-3241, DOI: 10.4049/jimmunol.168.7.3235.
- Burkhardt, J.K., S. Hester, C.K. Lapham, und Y. Argon. 1990. The lytic granules of natural killer cells are dual-function organelles combining secretory and pre-lysosomal compartments. *Journal of Cell Biology*. 111:2327-2340, DOI: 10.1083/jcb.111.6.2327.
- Caby, M.-P., D. Lankar, C. Vincendeau-Scherrer, G. Raposo, und C. Bonnerot. 2005. Exosomal-like vesicles are present in human blood plasma. *International immunology*. 17:879-887, DOI: 10.1093/intimm/dxh267.
- Campi, G., R. Varma, und M.L. Dustin. 2005. Actin and agonist MHC–peptide complex–dependent T cell receptor microclusters as scaffolds for signaling. *The Journal of experimental medicine*. 202:1031-1036, DOI: 10.1084/jem.20051182.
- Céspedes, P.F., A. Jainarayanan, L. Fernández-Messina, S. Valvo, D.G. Saliba, E. Kurz, . . . M.L. Dustin. 2022. T-cell trans-synaptic vesicles are distinct and carry greater effector content than constitutive extracellular vesicles. *Nature Communications*. 13:3460, DOI: <https://doi.org/10.1038/s41467-022-31160-3>.

- Chang, H.-F., C. Schirra, M. Ninov, U. Hahn, K. Ravichandran, E. Krause, . . . J. Rettig. 2022. Identification of distinct cytotoxic granules as the origin of supramolecular attack particles in T lymphocytes. *Nature Communications*. 13:1029, DOI: 10.1038/s41467-022-28596-y.
- Charrin, S., S. Jouannet, C. Boucheix, und E. Rubinstein. 2014. Tetraspanins at a glance. *Journal of cell science*. 127:3641-3648, DOI: 10.1242/jcs.154906.
- Chen, G., A.C. Huang, W. Zhang, G. Zhang, M. Wu, W. Xu, . . . W. Guo. 2018. Exosomal PD-L1 contributes to immunosuppression and is associated with anti-PD-1 response. *Nature*. 560:382-386, <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0392-8>.
- Chitirala, P., H.-F. Chang, P. Martzloff, C. Harenberg, K. Ravichandran, M.H. Abdulreda, . . . J. Rettig. 2020. Studying the biology of cytotoxic T lymphocytes in vivo with a fluorescent granzyme B-mTFP knock-in mouse. *Elife*. 9:e58065, DOI: 10.7554/eLife.58065.
- Clayton, A., P.J. Mitchell, S. Linnane, M.D. Mason, und Z. Tabi. 2008. Human tumor-derived exosomes down-modulate NKG2D expression. *The Journal of Immunology*. 180:7249-7258, DOI: 10.4049/jimmunol.180.11.7249.
- Colombo, M., G. Raposo, und C. Théry. 2014. Biogenesis, secretion, and intercellular interactions of exosomes and other extracellular vesicles. *Annual review of cell and developmental biology*. 30:255-289, DOI: 10.1146/annurev-cellbio-101512-122326.
- Courtemanche, N., T.D. Pollard, und Q. Chen. 2016. Avoiding artefacts when counting polymerized actin in live cells with LifeAct fused to fluorescent proteins. *Nature cell biology*. 18:676-683, DOI: 10.1038/ncb3351.
- Das, V., B. Nal, A. Dujancourt, M.-I. Thoulouze, T. Galli, P. Roux, . . . A. Alcover. 2004. Activation-induced polarized recycling targets T cell antigen receptors to the immunological synapse; involvement of SNARE complexes. *Immunity*. 20:577-588, DOI: 10.1016/s1074-7613(04)00106-2.
- de Saint Basile, G., G. Ménasché, und A. Fischer. 2010. Molecular mechanisms of biogenesis and exocytosis of cytotoxic granules. *Nature Reviews Immunology*. 10:568-579, DOI: 10.1038/nri2803.
- Dustin, M.L. 2014. The immunological synapse. *Cancer Immunology Research*. 2:1023-1033, DOI: 10.1158/2326-6066.Cir-14-0161.
- Dustin, M.L., A.K. Chakraborty, und A.S. Shaw. 2010. Understanding the structure and function of the immunological synapse. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*. 2:a002311, DOI: 10.1101/cshperspect.a002311.
- Dustin, M.L., und D.R. Colman. 2002. Neural and immunological synaptic relations. *Science*. 298:785-789, DOI: 10.1126/science.1076386

- Estl, M., P. Blatt, X. Li, U. Becherer, H.-F. Chang, J. Rettig, und V. Pattu. 2020. Various stages of immune synapse formation are differently dependent on the strength of the TCR stimulus. *International Journal of Molecular Sciences*. 21:2475, DOI: 10.3390/ijms21072475.
- Flores, L.R., M.C. Keeling, X. Zhang, K. Sliogeryte, und N. Gavara. 2019. Lifeact-TagGFP2 alters F-actin organization, cellular morphology and biophysical behaviour. *Scientific reports*. 9:3241, DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-019-40092-w>.
- Fu, W., C. Lei, S. Liu, Y. Cui, C. Wang, K. Qian, . . . S. Hu. 2019. CAR exosomes derived from effector CAR-T cells have potent antitumour effects and low toxicity. *Nature communications*. 10:4355, DOI: <https://doi.org/10.1038/s41467-019-12321-3>.
- Gasser, O., und J.r.A. Schifferli. 2004. Activated polymorphonuclear neutrophils disseminate anti-inflammatory microparticles by ectocytosis. *Blood*. 104:2543-2548, DOI: 10.1182/blood-2004-01-0361.
- Geiger, B., D. Rosen, und G. Berke. 1982. Spatial relationships of microtubule-organizing centers and the contact area of cytotoxic T lymphocytes and target cells. *The Journal of Cell Biology*. 95:137-143, DOI: 10.1083/jcb.95.1.137.
- Guescini, M., S. Genedani, V. Stocchi, und L.F. Agnati. 2010. Astrocytes and Glioblastoma cells release exosomes carrying mtDNA. *Journal of Neural Transmission* 117:1-4, DOI: 10.1007/s00702-009-0288-8.
- Gustafsson, M.G.L., L. Shao, P.M. Carlton, C.-J.R. Wang, I.N. Golubovskaya, W.Z. Cande, . . . J.W. Sedat. 2008. Three-dimensional resolution doubling in wide-field fluorescence microscopy by structured illumination. *Biophysical journal*. 94:4957-4970, DOI: 10.1529/biophysj.107.120345
- Han, C., H. Kang, J. Yi, M. Kang, H. Lee, Y. Kwon, . . . J. Park. 2021. Single-vesicle imaging and co-localization analysis for tetraspanin profiling of individual extracellular vesicles. *Journal of Extracellular Vesicles*. 10:e12047, DOI: 10.1002/jev2.12047.
- Hong, J., M. Kang, M. Jung, Y.Y. Lee, Y. Cho, C. Kim, . . . B.S. Kim. 2021. T-cell-derived nanovesicles for cancer immunotherapy. *Advanced Materials*. 33:2101110, DOI: <https://doi.org/10.1002/adma.202101110>.
- Hsieh, C.-S., S.E. Macatonia, C.S. Tripp, S.F. Wolf, A. O'Garra, und K.M. Murphy. 1993. Development of TH1 CD4+ T cells through IL-12 produced by *Listeria*-induced macrophages. *Science*. 260:547-549, DOI: 10.1126/science.8097338.
- Huang, X., T. Yuan, M. Tschannen, Z. Sun, H. Jacob, M. Du, . . . L. Wang. 2013. Characterization of human plasma-derived exosomal RNAs by deep sequencing. *BMC Genomics*. 14:319, DOI: 10.1186/1471-2164-14-319.
- Ismail, N., Y. Wang, D. Dakhlallah, L. Moldovan, K. Agarwal, K. Batte, . . . C.B. Marsh. 2013. Macrophage microvesicles induce macrophage differentiation and miR-223 transfer.

- Blood, The Journal of the American Society of Hematology*. 121:984-995, DOI: 10.1182/blood-2011-08-374793.
- Iwasaki, A., und R. Medzhitov. 2015. Control of adaptive immunity by the innate immune system. *Nature Immunology*. 16:343-353, DOI: 10.1038/ni.3123.
- Johnstone, R.M., M. Adam, J.R. Hammond, L. Orr, und C. Turbide. 1987. Vesicle formation during reticulocyte maturation. Association of plasma membrane activities with released vesicles (exosomes). *Journal of Biological Chemistry*. 262:9412-9420, DOI: [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)48095-7](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)48095-7).
- Kaschek, L., S. Zöphel, A. Knörck, und M. Hoth. 2021. A calcium optimum for cytotoxic T lymphocyte and natural killer cell cytotoxicity, in: *Seminars in Cell & Developmental Biology*: Elsevier), 10-18, DOI: <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2020.12.002>.
- Kim, I.-Y., H.Y. Kim, H.-W. Song, J.-O. Park, Y.H. Choi, und E. Choi. 2023. Functional enhancement of exosomes derived from NK cells by IL-15 and IL-21 synergy against hepatocellular carcinoma cells: The cytotoxicity and apoptosis in vitro study. *Heliyon*, DOI: <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2023.e16962>.
- Kowal, J., M. Tkach, und C. Théry. 2014. Biogenesis and secretion of exosomes. *Current Opinion in Cell Biology*. 29:116-125, DOI: 10.1016/j.ceb.2014.05.004.
- Krämer-Albers, E.-M., und C. Frühbeis. 2013. Lieferung auf Abruf: Exosomen als „Care“-Pakete von Gliazellen für gestresste Neurone. *Neuroforum*. 19:146-155, DOI: <https://doi.org/10.1515/nf-2013-0403>.
- Laulagnier, K., D. Grand, A. Dujardin, S. Hamdi, H. Vincent-Schneider, D. Lankar, . . . M. Record. 2004. PLD2 is enriched on exosomes and its activity is correlated to the release of exosomes. *FEBS letters*. 572:11-14, DOI: 10.1016/j.febslet.2004.06.082.
- Lugini, L., S. Cecchetti, V. Huber, F. Luciani, G. Macchia, F. Spadaro, . . . S. Fais. 2012. Immune surveillance properties of human NK cell-derived exosomes. *The Journal of Immunology*. 189:2833-2842, DOI: <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1101988>.
- Lüllmann-Rauch, R., und E. Asan. 2019. Taschenlehrbuch Histologie. Georg Thieme Verlag KG, Stuttgart. ISBN: 978-3-13-242529-3.
- Mahmood, A., Z. Otruba, A.W. Weisgerber, M.D. Palay, M.T. Nguyen, B.L. Bills, und M.K. Knowles. 2023. Exosome secretion kinetics are controlled by temperature. *Biophysical journal*. 122:1301-1314, DOI: 10.1016/j.bpj.2023.02.025
- Masson, D., und J. Tschopp. 1985. Isolation of a lytic, pore-forming protein (perforin) from cytolytic T-lymphocytes. *Journal of Biological Chemistry*. 260:9069-9072, DOI: [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(17\)39328-6](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(17)39328-6).
- McAndrews, K.M., und R. Kalluri. 2019. Mechanisms associated with biogenesis of exosomes in cancer. *Molecular cancer*. 18:1-11, DOI: 10.1186/s12943-019-0963-9

- Ming, M., C. Schirra, U. Becherer, D.R. Stevens, und J. Rettig. 2015. Behavior and properties of mature lytic granules at the immunological synapse of human cytotoxic T lymphocytes. *PLoS One*. 10:e0135994, DOI: 10.1371/journal.pone.0135994.
- Mittelbrunn, M., C. Gutiérrez-Vázquez, C. Villarroja-Beltri, S. González, F. Sánchez-Cabo, M.Á. González, . . . F. Sánchez-Madrid. 2011. Unidirectional transfer of microRNA-loaded exosomes from T cells to antigen-presenting cells. *Nature communications*. 2:1-10, DOI: 10.1038/ncomms1285
- Monks, C.R., B.A. Freiberg, H. Kupfer, N. Sciaky, und A. Kupfer. 1998. Three-dimensional segregation of supramolecular activation clusters in T cells. *Nature*. 395:82-86, DOI: 10.1038/25764
- Morel, L., M. Regan, H. Higashimori, S.K. Ng, C. Esau, S. Vidensky, . . . Y. Yang. 2013. Neuronal exosomal miRNA-dependent translational regulation of astroglial glutamate transporter GLT1. *Journal of Biological Chemistry*. 288:7105-7116, DOI: 10.1074/jbc.M112.410944.
- Oehmcke, S., M. Mörgelin, J. Malmström, A. Linder, M. Chew, H. Thorlacius, und H. Herwald. 2012. Stimulation of blood mononuclear cells with bacterial virulence factors leads to the release of pro-coagulant and pro-inflammatory microparticles. *Cellular microbiology*. 14:107-119, DOI: 10.1111/j.1462-5822.2011.01705.x
- Peters, P.J., J. Borst, V. Oorschot, M. Fukuda, O. Krähenbühl, J. Tschopp, . . . H.J. Geuze. 1991. Cytotoxic T lymphocyte granules are secretory lysosomes, containing both perforin and granzymes. *The Journal of experimental medicine*. 173:1099-1109, DOI: 10.1084/jem.173.5.1099.
- Pisitkun, T., R.-F. Shen, und M.A. Knepper. 2004. Identification and proteomic profiling of exosomes in human urine. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 101:13368-13373, DOI: 10.1073/pnas.0403453101
- Plaut, M., J.E. Bubbers, und C.S. Henney. 1976. Studies on the Mechanism of Lymphocyte-Mediated Cytolysis: VII. Two Stages in the T Cell-Mediated Lytic Cycle with Distinct Cation Requirements. *The Journal of Immunology*. 116:150-155, DOI: <https://doi.org/10.4049/jimmunol.116.1.150>.
- Qiu, Y., Y. Yang, R. Yang, C. Liu, J.-M. Hsu, Z. Jiang, . . . M.-C. Hung. 2021. Activated T cell-derived exosomal PD-1 attenuates PD-L1-induced immune dysfunction in triple-negative breast cancer. *Oncogene*. 40:4992-5001, DOI: 10.1038/s41388-021-01896-1
- Raposo, G., H.W. Nijman, W. Stoorvogel, R. Liejendekker, C.V. Harding, C.J.M. Melief, und H.J. Geuze. 1996. B lymphocytes secrete antigen-presenting vesicles. *Journal of Experimental Medicine*. 183:1161-1172, DOI: 10.1084/jem.183.3.1161.
- Raposo, G., und W. Stoorvogel. 2013. Extracellular vesicles: exosomes, microvesicles, and friends. *Journal of Cell Biology*. 200:373-383, DOI: 10.1083/jcb.201211138

- Riedl, J., A.H. Crevenna, K. Kessenbrock, J.H. Yu, D. Neukirchen, M. Bista, . . . R. Wedlich-Soldner. 2008. Lifeact: a versatile marker to visualize F-actin. *Nature methods*. 5:605-607, DOI: 10.1038/nmeth.1220
- Ritter, A.T., K.L. Angus, und G.M. Griffiths. 2013. The role of the cytoskeleton at the immunological synapse. *Immunological reviews*. 256:107-117, DOI: 10.1111/imr.12117.
- Ritter, A.T., S.M. Kapnick, S. Murugesan, P.L. Schwartzberg, G.M. Griffiths, und J. Lippincott-Schwartz. 2017. Cortical actin recovery at the immunological synapse leads to termination of lytic granule secretion in cytotoxic T lymphocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 114:E6585-E6594, DOI: 10.1073/pnas.1710751114.
- Saliba, D.G., P.F. Céspedes-Donoso, Š. Bálint, E.B. Compeer, K. Korobchevskaya, S. Valvo, . . . M.L. Dustin. 2019. Composition and structure of synaptic ectosomes exporting antigen receptor linked to functional CD40 ligand from helper T cells. *Elife*. 8:e47528, DOI: <https://doi.org/10.7554/eLife.47528>.
- Savina, A., M. Furlán, M. Vidal, und M.I. Colombo. 2003. Exosome release is regulated by a calcium-dependent mechanism in K562 cells. *Journal of Biological Chemistry*. 278:20083-20090, DOI: 10.1074/jbc.M301642200
- Schmidt, H., C. Gelhaus, R. Lucius, M. Nebendahl, M. Leippe, und O. Janssen. 2009. Enrichment and analysis of secretory lysosomes from lymphocyte populations. *BMC immunology*. 10:1-12, DOI: 10.1186/1471-2172-10-41.
- Seo, N., Y. Shirakura, Y. Tahara, F. Momose, N. Harada, H. Ikeda, . . . H. Shiku. 2018. Activated CD8+ T cell extracellular vesicles prevent tumour progression by targeting of lesional mesenchymal cells. *Nature communications*. 9:435, DOI: <https://doi.org/10.1038/s41467-018-02865-1>.
- Shi, J., Y. Ma, J. Zhu, Y. Chen, Y. Sun, Y. Yao, . . . J. Xie. 2018. A Review on Electroporation-Based Intracellular Delivery. *Molecules*. 23, DOI: 10.3390/molecules23113044.
- Shi, L., S. Mai, S. Israels, K. Browne, J.A. Trapani, und A.H. Greenberg. 1997. Granzyme B (GraB) Autonomously Crosses the Cell Membrane and Perforin Initiates Apoptosis and GraB Nuclear Localization. *Journal of Experimental Medicine*. 185:855-866, DOI: 10.1084/jem.185.5.855.
- Sleiman, M., D.R. Stevens, P. Chitirala, und J. Rettig. 2020. Cytotoxic granule trafficking and fusion in synaptotagmin7-deficient cytotoxic T lymphocytes. *Frontiers in immunology*. 11:1080, DOI: 10.3389/fimmu.2020.01080
- Stinchcombe, J.C., G. Bossi, S. Booth, und G.M. Griffiths. 2001. The immunological synapse of CTL contains a secretory domain and membrane bridges. *Immunity*. 15:751-761, DOI: 10.1016/s1074-7613(01)00234-5.

- Stinchcombe, J.C., E. Majorovits, G. Bossi, S. Fuller, und G.M. Griffiths. 2006. Centrosome polarization delivers secretory granules to the immunological synapse. *Nature*. 443:462-465, DOI: 10.1038/nature05071.
- Stoorvogel, W., G.J. Strous, H.J. Geuze, V. Oorschot, und A.L. Schwartz. 1991. Late endosomes derive from early endosomes by maturation. *Cell*. 65:417-427, DOI: 10.1016/0092-8674(91)90459-c.
- Street, J.M., P.E. Barran, C.L. Mackay, S. Weidt, C. Balmforth, T.S. Walsh, . . . J.W. Dear. 2012. Identification and proteomic profiling of exosomes in human cerebrospinal fluid. *Journal of translational medicine*. 10:1-7, DOI: 10.1186/1479-5876-10-5
- Stuffers, S., C. Sem Wegner, H. Stenmark, und A. Brech. 2009. Multivesicular endosome biogenesis in the absence of ESCRTs. *Traffic*. 10:925-937, DOI:10.1111/j.1600-0854.2009.00920.x.
- Swain, S.L., A.D. Weinberg, M. English, und G. Huston. 1990. IL-4 directs the development of Th2-like helper effectors. *Journal of Immunology*. 145:3796-3806.
- Thakur, B.K., H. Zhang, A. Becker, I. Matei, Y. Huang, B. Costa-Silva, . . . D. Lyden. 2014. Double-stranded DNA in exosomes: a novel biomarker in cancer detection. *Cell research*. 24:766-769, DOI: 10.1038/cr.2014.44
- Thompson, N.L., T.P. Burghardt, und D. Axelrod. 1981. Measuring surface dynamics of biomolecules by total internal reflection fluorescence with photobleaching recovery or correlation spectroscopy. *Biophysical journal*. 33:435-454, DOI: 10.1016/S0006-3495(81)84905-3
- Valadi, H., K. Ekström, A. Bossios, M. Sjöstrand, J.J. Lee, und J.O. Lötvall. 2007. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nature cell biology*. 9:654-659, DOI: 10.1038/ncb1596
- Van Niel, G., S. Charrin, S. Simoes, M. Romao, L. Rochin, P. Saftig, . . . G. Raposo. 2011. The tetraspanin CD63 regulates ESCRT-independent and-dependent endosomal sorting during melanogenesis. *Developmental cell*. 21:708-721, DOI: 10.1016/j.devcel.2011.08.019.
- Varma, R., G. Campi, T. Yokosuka, T. Saito, und M.L. Dustin. 2006. T cell receptor-proximal signals are sustained in peripheral microclusters and terminated in the central supramolecular activation cluster. *Immunity*. 25:117-127, DOI: 10.1016/j.immuni.2006.04.010.
- Verhage, M., und J.B. Sørensen. 2008. Vesicle docking in regulated exocytosis. *Traffic*. 9:1414-1424, DOI: 10.1111/j.1600-0854.2008.00759.x.
- Verweij, F.J., M.P. Bebelman, C.R. Jimenez, J.J. Garcia-Vallejo, H. Janssen, J. Neefjes, . . . D.M. Pegtel. 2018. Quantifying exosome secretion from single cells reveals a modulatory role for GPCR signaling. *The Journal of cell biology*. 217:1129-1142, DOI: 10.1083/jcb.201703206

- Verweij, F.J., C. Revenu, G. Arras, F. Dingli, D. Loew, D.M. Pegtel, . . . G. van Niel. 2019. Live tracking of inter-organ communication by endogenous exosomes in vivo. *Developmental Cell*. 48:573-589. e574, DOI: 10.1016/j.devcel.2019.01.004.
- Waldenström, A., N. Genneback, U. Hellman, and G. Ronquist. 2012. Cardiomyocyte microvesicles contain DNA/RNA and convey biological messages to target cells. *Public Library of Science one*. 7:e34653, DOI: 10.1371/journal.pone.0034653
- Walzog, B., und J. Fandrey. 2019. Blut: Ein flüssiges Organ. In *Physiologie*. R. Klinke, H.-C. Pape, und S. Silbernagl, editors. Thieme, Stuttgart. 270-305. 978-3-13-242394-7.
- Wang, X., H. Shen, Q. He, W. Tian, A. Xia, und X.-J. Lu. 2019. Exosomes derived from exhausted CD8+ T cells impaired the anticancer function of normal CD8+ T cells. *Journal of medical genetics*. 56:29-31, DOI: 10.1136/jmedgenet-2018-105439
- Waring, P., und A. Müllbacher. 1999. Cell death induced by the Fas/Fas ligand pathway and its role in pathology. *Immunology and cell biology*. 77:312-317, DOI: 10.1046/j.1440-1711.1999.00837.x
- Willms, E., H.J. Johansson, I. Mäger, Y. Lee, K.E.M. Blomberg, M. Sadik, . . . S. El Andaloussi. 2016. Cells release subpopulations of exosomes with distinct molecular and biological properties. *Scientific reports*. 6:22519, DOI: 10.1038/srep22519.
- Wollert, T., und J.H. Hurley. 2010. Molecular mechanism of multivesicular body biogenesis by ESCRT complexes. *Nature*. 464:864-869, DOI: 10.1038/nature08849
- Yáñez-Mó, M., P.R.-M. Siljander, Z. Andreu, A.B. Zavec, F.E. Borràs, E.I. Buzas, . . . O. De Wever. 2015. Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions. *Journal of Extracellular Vesicles*. 4:27066, DOI: 10.3402/jev.v4.27066.
- Yi, J., X.S. Wu, T. Crites, und J.A. Hammer III. 2012. Actin retrograde flow and actomyosin II arc contraction drive receptor cluster dynamics at the immunological synapse in Jurkat T cells. *Molecular biology of the cell*. 23:834-852, DOI: 10.1091/mbc.E11-08-0731
- Zitvogel, L., A. Regnault, A. Lozier, J. Wolfers, C. Flament, D. Tenza, . . . S. Amigorena. 1998. Eradication of established murine tumors using a novel cell-free vaccine: dendritic cell derived exosomes. *Nature medicine*. 4:594-600, DOI: 10.1038/nm0598-594

7 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, ohne deren Unterstützung diese Dissertation nicht zustande gekommen wäre.

Mein Dank gilt Prof. Dr. Jens Rettig, der mir die Möglichkeit gab, meine Dissertation in seiner Arbeitsgruppe zu machen.

Von ganzem Herzen möchte ich PD Dr. Ute Becherer danken, die im Verlauf die Betreuung meiner Dissertation übernommen hat und meine Doktormutter wurde. Ich danke ihr für ihre großartige Unterstützung bei der Lösung verschiedenster Probleme, für wissenschaftliche und inhaltliche Diskussionen und ihre unglaubliche Geduld. Danke auch für die mühevollen Arbeit des Korrekturlesens, die konstruktiven Verbesserungsvorschläge und die Hilfe beim Erstellen meiner Abbildungen!

Darüber hinaus gilt mein Dank dem Zweitgutachter für die Beurteilung dieser Arbeit.

Vielen Dank an PD Dr. Elmar Krause und Dr. Claudia Schirra für den wissenschaftlichen Input und ihre Unterstützung! Ein großes Dankeschön geht an die technischen Assistentinnen: Margarete Klose, die die in dieser Arbeit genutzten Plasmide kloniert hat, Nicole Rothgerber, Anja Bergsträßer, Silke Bruns und Katrin Sandmeier. Als nächstes möchte ich mich bei Praneeth Chitirala und Keerthana Ravichandra für die Einführung in die verschiedenen Arbeitstechniken bedanken. Herzlichen Dank an Nadia Alawar für ihre Freundschaft, für wissenschaftliche Diskussionen und private Gespräche. Ich danke auch Angelina Staudt, Olga Ratai, Paloma Martzloff, Marie-Louise Wirkner und Michael Estl für ihre Gesellschaft in den Mittagspausen und im Doktorandenzimmer.

Meinem Mann Anwar Rasuli danke ich für seine Liebe und für seine Unterstützung in jeder Lebenslage. Vielen Dank an meine Eltern, die mich stets unterstützt haben und an mich geglaubt haben. Meinem Vater danke ich auch herzlich für die sprachliche Korrektur dieser Dissertation. Zuletzt danke ich meinen Schwestern und meinen Freunden dafür, dass sie Teil meines Lebens sind.

8 Lebenslauf/Vita

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

Tag der Promotion: 02. Dezember 2024

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

Erstgutachter: PD Dr. Ute Becherer

Zweitgutachter: Prof. Dr. Markus Hoth

