

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

Calciumsignale und Zytotoxizität humaner natürlicher Killerzellen

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades
eines Doktors der Naturwissenschaften
der Medizinischen Fakultät
der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES
2026

vorgelegt von

Lea Kaschek

Geboren am 24.05.1996 in Saarbrücken

Inhalt

Zusammenfassung	V
Abstract.....	VII
1 Einleitung	1
1.1 NK-Zellen im Immunsystem	1
1.1.1 Charakterisierung.....	2
1.1.2 Aktivierung und Rezeptorbalance	4
1.1.3 Ablauf der Zytotoxizität	5
1.1.4 Mechanismen der Zielzellabtötung	7
1.2 Calcium in NK-Zellen	9
1.2.1 Ca^{2+} als universeller Second Messenger.....	9
1.2.2 Ca^{2+} und Zytotoxizität in NK-Zellen	10
1.2.3 Weitere Funktionen von Ca^{2+} in NK-Zellen.....	13
1.2.4 Messung von Ca^{2+} in einzelnen Zellen	14
1.2.5 Messung von Ca^{2+} in NK-Zellen	15
1.3 NK-Zellen im klinischen Kontext	16
1.3.1 NK-assoziierte Krankheiten	16
1.3.2 NK-Therapie.....	17
1.4 Zielsetzung	19
2 Material und Methoden	20
2.1 Material.....	20
2.1.1 Geräte und Instrumente	20
2.1.2 Zellgenerierung und Zellkultivierung.....	20
2.1.3 Calciumfarbstoffe und Fluoreszenzfarbstoffe	21
2.1.4 Antikörper und FACS-Färbungen	21
2.1.5 Chemikalien und Inhibitoren.....	21
2.1.6 Platten und Verbrauchsmaterialien	22
2.1.7 Lösungen	22
2.2 Methoden.....	23
2.2.1 Ethikanträge.....	23
2.2.2 Isolierung und Kultivierung von humanen NK-Zellen	23
2.2.3 Durchflusszytometrische Analysen	25
2.2.4 Zelllinien und Kulturbedingungen.....	25
2.2.5 Färbung von NK-Zellen	28
2.2.6 Analysen im Plattenlesegerät	29

2.2.7	Ca ²⁺ Messungen im Cell-Observer	32
2.2.8	Phototoxizitätsmessungen im Cell-Observer.....	34
2.2.9	Analyse des Zielzellsterbens auf Einzelzellebene mittels pCasper im Celldiscoverer 7.....	35
2.2.10	Automatisierte Zellanalyse	36
2.2.11	Parallele Messung von Ca ²⁺ Signalen mittels Fura-10 und Apoptose-Sensor pCasper im Celldiscoverer 7	37
2.2.12	Software.....	40
2.2.13	Statistische Analysen	41
3	Ergebnisse.....	43
3.1	Etablierung von Fura-10 als Calcium-Sensor in primären humanen NK-Zellen	43
3.1.1	Anregung und Emission der Farbstoffe.....	44
3.1.2	Untersuchung der ratiometrischen Eigenschaften mit dem Cell Observer.....	45
3.1.3	Eignung der Ca ²⁺ Farbstoffe während Zytotoxizitätsmessungen	53
3.1.4	Zusammenfassende Analyse der fünf Fura-Farbstoffe	56
3.1.5	Etablierung von Ca ²⁺ Messungen mit Fura-10 in Kombination mit pCasper in Zielzellen im Celldiscoverer 7.....	57
3.2	Messung von Ca ²⁺ -Signalen in primären NK-Zellen.....	63
3.2.1	Ca ²⁺ -Signale während verschiedener Tötungsmechanismen.....	64
3.2.2	Auswirkung von CMA auf Ca ²⁺ -Signale	71
3.2.3	Ca ²⁺ -Signale bei antikörperabhängiger Zytotoxizität	75
3.3	Analyse von Zytotoxizität und Ca ²⁺ -Signalen in CAR NK-Zellen	81
3.3.1	Untersuchung der Zytotoxizität von CAR NK-Zellen	81
3.3.2	Untersuchung der Ca ²⁺ -Signale in CAR NK-Zellen.....	88
4	Diskussion	96
4.1	Etablierung von Ca ²⁺ -Messungen in primären NK-Zellen	96
4.1.1	Auswahl geeigneter Farbstoffe.....	96
4.1.2	Bewertungskriterien für ratiometrische Ca ²⁺ -Indikatoren	97
4.1.3	Vergleich und Auswahl des geeigneten Fura-Farbstoffs	99
4.1.4	Limitationen und methodische Einordnung der Fura-10 Etablierung	101
4.2	Ca ²⁺ -Signale in primären NK-Zellen	102
4.2.1	Zusammenfassung der experimentellen Daten.....	102
4.2.2	Ein Modell der Ca ²⁺ -abhängigen NK-Zell-Zytotoxizität.....	104
4.2.3	Limitationen der [Ca ²⁺] _{int} -Messung in primären NK-Zellen	111
4.2.4	Perspektiven und Implikationen der [Ca ²⁺] _{int} -Messung in primären NK-Zellen..	113
4.3	Einfluss der CAR-Expression auf Ca ²⁺ -Signale und Zytotoxizität	114

4.3.1	Zytotoxizität von CAR NK-Zellen	114
4.3.2	Ca ²⁺ Signale von CAR NK-Zellen.....	115
4.3.3	Klinische Relevanz und Implikationen der Analysen in CAR NK-Zellen.....	117
5	Literaturverzeichnis	120
6	Anhang	133
6.1	Abbildungsverzeichnis	133
6.2	Tabellenverzeichnis	135
6.3	Abkürzungsverzeichnis	136
6.4	Automatisierte Analyse der Plattenleser-basierten Zytotoxizitätsassays.....	139
6.5	Statistische Analysen der Ca ²⁺ -Signale.....	147
	Publikationen.....	153
	Danksagung	155
	Lebenslauf	156

Zusammenfassung

Zytotoxische T-Lymphozyten (CTL) und natürliche Killerzellen (NK) sind wichtige Eckpfeiler bei der Abtötung von Krebszellen. Ihre Funktion wird maßgeblich durch calciumabhängige Signale reguliert. Während Calciumsignale in T-Zellen relativ gut untersucht sind, ist über deren Rolle in NK-Zellen, insbesondere während der dynamischen Interaktion und Abtötung von Krebszellen, bislang vergleichsweise wenig bekannt. Ziel dieser Arbeit war es daher, Ca^{2+} -Signale in primären humanen NK-Zellen während der Abtötung von Krebszellen auf Einzelzellebene zu untersuchen. Ferner sollte deren Bedeutung im Kontext moderner Immuntherapien, insbesondere CAR-modifizierter NK-Zellen, analysiert werden.

Hierzu wurde zunächst ein geeignetes experimentelles System etabliert, das die simultane Messung intrazellulärer Ca^{2+} -Signale in NK-Zellen und des Zelltodes von Krebszellen in Echtzeit ermöglicht. Dabei zeigte sich, dass NK-Zellen, wie auch in der Literatur beschrieben, sehr empfindlich auf jeglichen Zellstress reagieren. Ein zentraler methodischer Bestandteil war daher die Auswahl eines geeigneten Ca^{2+} -Indikators für primäre NK-Zellen. Der häufig verwendete Standardfarbstoff Fura-2 wies zwar einen großen dynamischen Bereich auf, führte jedoch aufgrund der erforderlichen UV-Anregung mit Wellenlängen bis zu 340 nm zu einer signifikanten Beeinträchtigung der NK-Zell-Zytotoxizität. Durch den systematischen Vergleich verschiedener Fura-Derivate konnte Fura-10 als geeigneter Kompromiss zwischen Signalqualität, Stabilität und geringer Phototoxizität identifiziert werden. In Kombination mit dem pCasper-System zur Detektion von Zielzellapoptose und -nekrose wurde dieser Ansatz um die gleichzeitige Erfassung des Zielzellschicksals erweitert.

Die Analyse primärer NK-Zellen zeigte, dass verschiedene Formen der Zielzellabtötung, darunter Apoptose und Nekrose, mit charakteristischen Ca^{2+} -Signaldynamiken assoziiert sind. Ein transientes Ca^{2+} -Signal ist notwendig für zytotoxische Prozesse, jedoch nicht hinreichend für eine erfolgreiche Zielzellabtötung. Ein klarer Schwellenwert zur Unterscheidung zwischen erfolgreichen und ineffizienten Interaktionen konnte nicht identifiziert werden. Stattdessen deuten die Daten auf ein probabilistisches Modell hin, in dem die Höhe des Ca^{2+} -Signals die Wahrscheinlichkeit eines Zytotoxizitätsereignisses moduliert, ohne dessen Ausgang deterministisch festzulegen.

Im Gegensatz dazu ist die Dauer des Ca^{2+} -Signals eng mit dem Verlauf des Abtötungsprozesses verknüpft. Schnell verlaufende nekrotische Ereignisse gehen mit einer raschen Abnahme des Ca^{2+} -Signals einher, während langanhaltende Kontakte ohne Zytotoxizität durch persistierende

Ca^{2+} -Signale gekennzeichnet sind. Dies legt nahe, dass die Terminierung von Ca^{2+} -Signalen nicht primär durch intrinsische Programme der NK-Zelle gesteuert wird, sondern durch Rückkopplungssignale der Zielzelle beeinflusst ist.

Die Untersuchung CAR-modifizierter NK-Zellen belegte, dass die Expression eines CD19-spezifischen CAR die Wahrscheinlichkeit erfolgreicher Zielzellabtötung deutlich erhöht. Gleichzeitig bleiben die grundlegenden Mechanismen der calciumabhängigen NK-Zell-Zytotoxizität erhalten. CAR NK-Zellen weisen erhöhte Ca^{2+} -Signale bei antigenabhängigen Interaktionen auf, während basale Ca^{2+} -Spiegel und die Abklingkinetik unverändert bleiben, verglichen mit untransfizierten NK-Zellen. Dies spricht dafür, dass die CAR-Signaltransduktion primär die Aktivierungsschwelle verschiebt, ohne die zugrunde liegenden Effektorprogramme zu verändern. Auch die natürliche, CAR-unabhängige Zytotoxizität bleibt erhalten.

Die Ergebnisse dieser Arbeit liefern somit ein konsistentes Modell, in dem Ca^{2+} -Signale als regulatorische Größe fungieren, die die Wahrscheinlichkeit zytotoxischer Entscheidungen beeinflusst, während die konkrete Ausführung der Zielzellabtötung durch zusätzliche Faktoren bestimmt wird. Dieses Modell lässt sich sowohl auf primäre NK-Zellen als auch auf CAR NK-Zellen übertragen.

Über die grundlegenden mechanistischen Erkenntnisse hinaus haben die Ergebnisse auch translationalen Charakter. Die Beobachtung, dass CAR NK-Zellen ihre natürliche calciumabhängige Regulation beibehalten und keine globale Hyperaktivierung zeigen, unterstreicht ihr Potenzial als sichere Alternative zu CAR T-Zellen. Die Ergebnisse betonen zudem die Notwendigkeit eines vertieften Verständnisses intrazellulärer Ca^{2+} -Dynamiken, um deren gezielte Modulation als potenziellen therapeutischen Ansatz bewerten zu können.

Abstract

Calcium Signals and Cytotoxicity in Human Natural Killer Cells

Cytotoxic T lymphocytes (CTL) and natural killer cells (NK cells) are key effector cells in the elimination of cancer cells. Their function critically depends on calcium-dependent signal transduction. While calcium signaling in T cells has been studied extensively, comparatively little is known about its role in NK cells, particularly during dynamic interactions with target cells and the process of cancer cell killing. The aim of this work was therefore to investigate Ca^{2+} signals in primary human NK cells during the killing of cancer cells at the single-cell level. Furthermore, their relevance in the context of modern immunotherapies, in particular CAR-modified NK cells, was analyzed.

To this end, an experimental system was initially established that enables the simultaneous measurement of intracellular Ca^{2+} signals in NK cells and target cell death in real time. It was found that NK cells, as also described in literature, are highly sensitive to any form of cellular stress. A central methodological component was therefore the selection of a suitable Ca^{2+} indicator for primary NK cells. The commonly used standard dye Fura-2 exhibited a large dynamic range but led to a significant impairment of NK cell cytotoxicity due to the required UV excitation at wavelengths up to 340 nm. Through the systematic comparison of various Fura derivatives, Fura-10 was identified as a suitable compromise between signal quality, stability, and low phototoxicity. In combination with the pCasper system for the detection of target cell apoptosis and necrosis, this approach was extended to include simultaneous assessment of target cell fate.

The analysis of primary NK cells showed that different types of target cell killing, including apoptosis and necrosis, are associated with characteristic Ca^{2+} signal dynamics. A transient Ca^{2+} signal is necessary for cytotoxic processes but not sufficient for successful target cell killing. A clear threshold to distinguish between successful and inefficient interactions could not be identified. Instead, the data suggest a probabilistic model in which the amplitude of the Ca^{2+} signal modulates the probability of a cytotoxic event without deterministically defining its outcome.

In contrast, the duration of the Ca^{2+} signal is closely linked to the course of the killing process. Fast necrotic events are associated with a rapid decline of the Ca^{2+} signal, whereas long-lasting contacts without cytotoxicity are characterized by persistent Ca^{2+} signals. These observations

suggest that the termination of Ca^{2+} signals is not primarily controlled by intrinsic programs of the NK cell but is influenced by feedback signals from the target cell.

The investigation of CAR-modified NK cells showed that the expression of a CD19-specific CAR significantly increases the probability of successful target cell killing. At the same time, the fundamental mechanisms of calcium-dependent NK cell cytotoxicity remain preserved. CAR NK cells exhibit increased Ca^{2+} signals during antigen-dependent interactions, while basal Ca^{2+} levels and decay kinetics remain unchanged compared to untransfected NK cells. This suggests that CAR signaling primarily shifts the activation threshold without altering the underlying effector programs. Natural, CAR-independent cytotoxicity is also preserved.

The results of this work therefore provide a consistent model in which Ca^{2+} signals function as a regulatory parameter that influences the probability of cytotoxic decisions, while the actual execution of target cell killing is determined by additional factors. This model can be applied to both primary NK cells and CAR NK cells.

Beyond the fundamental mechanistic insights, the results also have translational character. The observation that CAR NK cells retain their natural calcium-dependent regulation and do not exhibit global hyperactivation highlights their potential as a safer alternative to CAR T cells. The results further emphasize the need for a deeper understanding of intracellular Ca^{2+} dynamics in order to evaluate their targeted modulation as a potential therapeutic approach.

1 Einleitung

Das Immunsystem stellt eine fundamentale Voraussetzung für das Überleben vielzelliger Organismen dar und entwickelte sich früh im Verlauf der Evolution (Yatim and Lakkis, 2015; Litman et al., 2005). Bereits in einfachen Organismen sowie in Pflanzen finden sich grundlegende Mechanismen der Immunabwehr, die dem Schutz vor äußeren und inneren Gefahren dienen. Zu den äußeren Bedrohungen zählen insbesondere Pathogene wie Bakterien, Viren und Pilze sowie toxische Substanzen, während innere Gefahren vor allem durch entartete oder geschädigte körpereigene Zellen entstehen können.

Im Laufe der Evolution entwickelte sich das Immunsystem zu einem hochkomplexen Netzwerk aus zellulären und humoralen Komponenten, die zusammenarbeiten, um eine effektive und kontrollierte Abwehrreaktion zu gewährleisten. Beim Menschen wird das Immunsystem traditionell in zwei funktionelle Bereiche unterteilt: die angeborene und die adaptive Immunität. Während die angeborene Immunantwort eine schnelle und weitgehend unspezifische Reaktion ermöglicht, zeichnet sich die adaptive Immunität durch Antigenspezifität und die Ausbildung eines immunologischen Gedächtnisses aus. Inzwischen ist bekannt, dass beide Systeme eng miteinander verknüpft sind und sich funktionell gegenseitig beeinflussen (Murphy & Weaver, 2017; Yatim & Lakkis, 2015).

Während die adaptive Immunität vor allem durch T- und B-Lymphozyten vermittelt wird, spielen in der angeborenen Immunität verschiedene Zelltypen eine Rolle, darunter Makrophagen, dendritische Zellen, Granulozyten und natürliche Killerzellen (NK-Zellen). NK-Zellen sind schon während einer frühen Phase der Immunantwort in der Lage, virusinfizierte oder transformierte Zellen ohne vorherige Sensibilisierung direkt zu erkennen und zu eliminieren (Murphy & Weaver, 2017).

1.1 NK-Zellen im Immunsystem

NK-Zellen wurden erstmals in den 1970er Jahren als eigenständige Lymphozytenpopulation beschrieben, nachdem beobachtet wurde, dass unstimulierte Lymphozyten eine „natürliche“ Zytotoxizität gegenüber Tumorzellen aufweisen. Unabhängig voneinander identifizierten mehrere Arbeitsgruppen Zellen, die ohne vorherige Sensibilisierung Zielzellen abtöten konnten

Kapitel 1 Einleitung

und sich dabei von T- und B-Lymphozyten unterscheiden (Herberman et al., 1975; Kiessling et al., 1975).

Aktuelle Schätzungen zeigen, dass es etwa 2×10^{10} NK-Zellen im menschlichen (männlichen, 73 kg schweren) Körper gibt, wovon etwa 30 % in der Leber, 9 % im Blut und 4 % im lymphatischen System zirkulieren (Sender et al., 2023). NK-Zellen werden klassischerweise dem angeborenen Immunsystem zugeordnet und tragen wesentlich zur frühen Kontrolle virusinfizierter und maligner Zellen bei. Im Gegensatz zu T- und B-Zellen, die über antigenspezifische Rezeptoren verfügen, erkennen NK-Zellen ihre Zielzellen über ein Repertoire keimbahnkodierter aktivierender und inhibierender Rezeptoren (Vivier et al., 2008).

Trotz dieser Einordnung weisen NK-Zellen funktionelle Eigenschaften auf, die über eine rein unspezifische Immunantwort hinausgehen. Ihre Aktivität wird auch durch extrazelluläre Faktoren wie Zytokine reguliert, beispielsweise von Interleukin-15 (IL-15), das von dendritischen Zellen oder Makrophagen produziert wird. Des Weiteren wurde beschrieben, dass NK-Zellen einen Reifungs- und Anpassungsprozess durchlaufen, „Education“ genannt (Vivier et al., 2011). Zudem zeigen NK-Zellen Formen eines immunologischen Gedächtnisses, das sowohl immunregulatorische als auch zytotoxische Funktionen umfasst (Schuster et al., 2024).

1.1.1 Charakterisierung

NK-Zellen entstehen aus $CD34^+$ hämatopoetischen Stammzellen im Knochenmark und durchlaufen mehrere Differenzierungsstufen über lymphoide Vorläuferzellen bis hin zu funktionell reifen NK-Zellen. Neben dem Knochenmark tragen auch sekundäre lymphatische Organe zur Reifung und funktionellen Prägung von NK-Zellen bei, wodurch eine zusätzliche Ebene der funktionellen Diversifizierung entsteht (S. Chen et al., 2024; Geiger & Sun, 2016; Vivier et al., 2011).

Im peripheren Blut und in Geweben lassen sich zwei Hauptsubpopulationen von NK-Zellen unterscheiden, die anhand der Expression des Oberflächenmarkers CD56 klassifiziert werden: $CD56^{\text{bright}}$ und $CD56^{\text{dim}}$ NK-Zellen. $CD56^{\text{bright}}$ NK-Zellen sind primär immunregulatorisch aktiv und zeichnen sich durch eine hohe Zytokinproduktion aus, während $CD56^{\text{dim}}$ NK-Zellen die dominante zytotoxische Population darstellen und durch hohe Expression von CD16 zusätzlich zur antikörperabhängigen zellvermittelten Zytotoxizität befähigt sind (Caligiuri, 2008).

Kapitel 1 Einleitung

Während lange Zeit angenommen wurde, dass CD56^{bright} NK-Zellen Vorläufer der CD56^{dim} Population darstellen (Caligiuri, 2008), deuten neuere Daten darauf hin, dass alternative Entwicklungswege existieren könnten sowie eine erhebliche funktionelle und phänotypische Diversität, die über die klassische Einteilung hinaus reicht (S. Chen et al., 2024; Crinier et al., 2018). Rebuffet et al. (2024) schlagen beispielsweise nach RNA-Sequenzierung auf Einzelzellebene drei Untergruppen von NK-Zellen im Blut vor (NK1, NK2 und NK3). NK1 sind die klassischen zytotoxisch aktiven NK-Zellen (CD16⁺, KIR⁺, hohe Mengen an Perforin und Granzym), NK2 die regulatorischen NK-Zellen (CD56^{bright}, KIR⁻, hohe Zytokinproduktion) und NK3 die „adaptiven“ NK-Zellen (CD57⁺, NKG2C⁺, KIR⁺; *memory-like*).

Ein entscheidendes Merkmal der NK-Zellfunktion ist die Fähigkeit, zwischen gesunden und pathologisch veränderten Zellen zu unterscheiden. Diese Entscheidung basiert nicht auf einem einzelnen Signal, sondern auf der Integration multipler aktivierender und inhibierender Reize (Long et al., 2013; Vivier et al., 2008). Bereits auf dieser Ebene wird deutlich, dass NK-Zellen komplexe Entscheidungsprozesse durchlaufen, deren molekulare Grundlagen bislang nur unvollständig verstanden sind.

Die funktionelle Aktivität von NK-Zellen wird zusätzlich durch Entwicklungs- und Reifungsprozesse beeinflusst. Während ihrer Entwicklung im Knochenmark durchlaufen NK-Zellen eine sogenannte „Education“ oder „Lizenzierung“, bei der die Interaktion mit körpereigenem MHC-I ihre spätere Reaktionsfähigkeit bestimmt (Vivier et al., 2011). Lizenzierte NK-Zellen zeigen eine erhöhte zytotoxische Aktivität, während nicht-lizenzierte Zellen eine niedrigere Reaktivität aufweisen (Z. Wu et al., 2021).

Neben ihrer direkten zytotoxischen Aktivität stellen NK-Zellen auch eine wichtige Quelle immunmodulatorischer Zytokine dar. Insbesondere die Produktion von Interferon- γ , aber auch weiterer Mediatoren wie TNF- α oder GM-CSF, ermöglicht es NK-Zellen, andere Immunzellen zu aktivieren und die Immunantwort zu formen. Somit übernehmen NK-Zellen sowohl Effektorfunktionen als auch regulatorische Funktionen und tragen wesentlich zur Koordination der angeborenen und adaptiven Immunantwort bei (S. Chen et al., 2024; Vivier et al., 2008). Gleichzeitig sind sie in der Lage, immunsuppressive Faktoren wie Transforming Growth Factor- β (TGF- β) und Interleukin-10 (IL-10) zu produzieren, wodurch sie entzündliche Reaktionen begrenzen und zur Gewebemöostase beitragen (S. Chen et al., 2024).

1.1.2 Aktivierung und Rezeptorbalance

Die Aktivierung von NK-Zellen basiert auf einem fein abgestimmten Gleichgewicht zwischen aktivierenden und inhibierenden Signalen. Im Gegensatz zu T- und B-Zellen, die über hochspezifische Antigenrezeptoren verfügen, treffen NK-Zellen ihre funktionellen Entscheidungen auf Grundlage der Integration multipler, gleichzeitig wirkender Rezeptor-Ligand-Interaktionen. Dieses Prinzip der „Rezeptorbalance“ ermöglicht es NK-Zellen, zwischen gesunden körpereigenen und veränderten Zielzellen zu unterscheiden (Caligiuri, 2008; Vivier et al., 2008).

Inhibierende Rezeptoren sind entscheidend für die Erkennung gesunder Zellen und die Vermeidung unerwünschter NK-Zell-Aktivierung. Sie erkennen überwiegend körpereigene MHC-Klasse-I-Moleküle und vermitteln negative Stimuli, die aktivierende Signalwege unterdrücken. Zu den wichtigsten inhibierenden Rezeptoren gehören die Killer-cell Immunoglobulin-like Receptors (KIR) sowie der CD94/NKG2A-Komplex. Während KIR polymorphe klassische HLA-Klasse-I-Moleküle erkennen, bindet NKG2A bevorzugt an das nicht-klassische MHC-Molekül HLA-E, wodurch unterschiedliche Ebenen der Selbsterkennung abgedeckt werden. Die intrazellulären Domänen dieser Rezeptoren enthalten „immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motifs“ (ITIMs), die nach Ligandenbindung phosphoryliert werden und zur Rekrutierung von Phosphatasen wie SHP-1 führen. Diese inhibieren aktivierende Signalwege durch Dephosphorylierung zentraler Signalmoleküle wie VAV1 oder Crk (Y. Chen et al., 2020; Long et al., 2013). Dieses Zusammenspiel bildet die molekulare Grundlage der sogenannten „Missing-self“-Erkennung: Eine reduzierte Expression von MHC-Klasse-I-Molekülen führt zu einem Verlust inhibierender Signale und erhöht damit die Wahrscheinlichkeit einer NK-Zell-Aktivierung (Perera Molligoda Arachchige, 2021).

Für das Auslösen einer zytotoxischen Antwort reicht das Fehlen inhibierender Signale nicht aus, vielmehr ist eine zusätzliche Aktivierung über stimulierende Rezeptoren erforderlich (Bryceson & Long, 2008). Zu den wichtigsten aktivierenden Rezeptoren zählen NKG2D, natürliche Zytotoxizitätsrezeptoren (NCRs; NKp30, NKp44, NKp46) sowie Korezeptoren wie DNAM-1 (CD226) und 2B4 (CD244) (Lanier, 2005; Long et al., 2013). Diese Rezeptoren erkennen häufig stressinduzierte Liganden oder pathogenassoziierte Veränderungen auf Zielzellen und vermitteln ihre Signale über Adapterproteine mit ITAMs, die nach Aktivierung eine Signalkaskade über Kinasen wie SYK und ZAP-70 initiieren (Watzl & Long, 2010).

Kapitel 1 Einleitung

NKG2D bindet beispielsweise an Stressliganden wie MICA oder MICB, deren Expression durch zellulären Stress oder DNA-Schäden induziert wird (Mistry & O’Callaghan, 2007).

Ein wesentliches Merkmal der NK-Zellaktivierung ist die Notwendigkeit synergistischer Signalintegration. Einzelne aktivierende Rezeptoren sind in der Regel nicht ausreichend, um eine vollständige Effektorfunktion auszulösen, sondern wirken in Kombination verstärkend. Experimentelle Arbeiten konnten zeigen, dass die gleichzeitige Aktivierung mehrerer Rezeptoren zu einer deutlich erhöhten zytotoxischen Antwort führt. Gleichzeitig sind inhibierende Signale in der Lage, selbst starke aktivierende Reize zu überlagern und eine Aktivierung zu verhindern (Lanier, 2005; Long et al., 2013).

Eine besondere Stellung nimmt der Fc-Rezeptor CD16 (FcγRIIIa) ein, der die antikörperabhängige zellvermittelte Zytotoxizität (ADCC) ermöglicht. CD16 erkennt IgG-opsonierte Zielzellen und kann im Gegensatz zu vielen anderen aktivierenden Rezeptoren bereits als einzelner Rezeptor eine starke Aktivierung auslösen, die bis zur Degranulation der NK-Zelle führt (Bryceson et al., 2009).

Die Entscheidung über Aktivierung oder Inhibition erfolgt somit nicht binär, sondern als Ergebnis der Integration multipler Signale, deren relative Stärke und zeitliche Dynamik den funktionellen Output bestimmen. Dieses Prinzip deutet darauf hin, dass NK-Zellen komplexe, kontextabhängige Entscheidungsprozesse durchlaufen. Welche intrazellulären Signalmechanismen diese Prozesse steuern und wie sie in spezifische Effektorfunktionen übersetzt werden, ist bislang nicht vollständig verstanden und ist Gegenstand aktueller Forschung (Bryceson et al., 2009; Long et al., 2013; Vivier et al., 2011)

1.1.3 Ablauf der Zytotoxizität

Die zytotoxische Funktion von NK-Zellen ist ein hochregulierter, mehrstufiger Prozess, der es ihnen ermöglicht, infizierte oder transformierte Zielzellen effizient zu erkennen und zu eliminieren. Dieser Prozess umfasst eine koordinierte Abfolge funktioneller Schritte, die von der Migration der NK-Zelle bis zur gezielten Induktion des Zielzellsterbens reichen (Murphy & Weaver, 2017).

Im Rahmen von Entzündungsreaktionen fördern vaskuläre Veränderungen und endotheliale Aktivierung die Einwanderung von Immunzellen in entzündetes oder tumoröses Gewebe (Wakasugi et al., 2024). Für die Rekrutierung von NK-Zellen spielen dabei insbesondere

Kapitel 1 Einleitung

Chemokine und Zytokine eine zentrale Rolle. Hierzu exprimieren sie eine Vielzahl von Chemokinrezeptoren wie CXCR1, CXCR2 und CX3CR1, die inflammatorische Signale erkennen. Beispielsweise wird CXCL8 (Interleukin-8), welches unter anderem von Makrophagen produziert wird, über CXCR1 detektiert und induziert eine gerichtete Migration entlang eines Konzentrationsgradienten. Neben klassischen Chemokinen reagieren NK-Zellen auch auf weitere Mediatoren wie Chemerin oder Sphingosin-1-Phosphat (Maghazachi, 2010; Walzer, Chiossone, et al., 2007a; Walzer, Jaeger, et al., 2007b). Zusätzlich fördern Zytokine wie IL-2, IL-12, IL-15, IL-21 sowie Typ-I-Interferone die Aktivierung und funktionelle Vorbereitung der NK-Zellen, wodurch ihre zytotoxische Kapazität erhöht wird (Degli-Esposti and Smyth, 2005; Long, 2007).

Im Gewebe kommt es zum initialen Kontakt zwischen NK-Zelle und potenzieller Zielzelle, die durch Adhäsionsmoleküle wie LFA-1 stabilisiert wird (Barber & Long, 2003). In dieser Phase erfolgt die Integration aktivierender und inhibierender Signale, die über die Aktivierung der NK-Zelle entscheiden. Überwiegen aktivierende Signale, wird eine zytotoxische Antwort initiiert, dominieren inhibierende Signale, wird der Kontakt wieder gelöst (Bryceson et al., 2006a).

Bei ausreichender Aktivierung bildet sich eine immunologische Synapse aus, eine hochorganisierte Kontaktzone zwischen NK-Zelle und Zielzelle, die eine gerichtete Signalübertragung und Granulafreisetzung ermöglicht (Dustin, 2014; Dustin & Long, 2010). Diese Struktur weist funktionelle Parallelen zur immunologischen Synapse von CD8⁺ T-Zellen auf, unterscheidet sich jedoch in ihrer Dynamik und Stabilität, wobei NK-Zellen häufig transientere Kontakte herstellen (Deguine et al., 2010).

Im Anschluss erfolgt die Polarisierung der NK-Zelle, bei der das Mikrotubuli-organisierende Zentrum (MTOC) sowie die lytischen Granula zur immunologischen Synapse ausgerichtet werden. Die Granula werden entlang des Zytoskeletts zur Synapse transportiert und schließlich exozytiert (Becherer & Rettig, 2006; Dustin, 2007). Dabei werden Perforin und Granzym freigesetzt, die in die Zielzelle eindringen und so deren Zelltod auslösen. Dieser Perforin/Granzym-vermittelte Mechanismus stellt den dominanten zytotoxischen Effektormechanismus dar. Ergänzend können NK-Zellen auch Todesrezeptor-vermittelte Signalwege nutzen, insbesondere über Fas (CD95) oder TRAIL, die ebenfalls zur Induktion von Apoptose beitragen (Prager & Watzl, 2019).

Kapitel 1 Einleitung

Neben der direkten Zytotoxizität sezernieren NK-Zellen auch Zytokine wie TNF- α und IFN- γ sowie Chemokine wie MIP-1 α und MIP-1 β . Dadurch rekrutieren und aktivieren sie weitere Immunzellen (Fehniger et al., 1999). Dabei unterscheiden sich die Aktivierungsschwellen verschiedener Effektorprogramme. Während die Freisetzung von Chemokinen bereits bei relativ geringer Aktivierung erfolgen kann, erfordern Degranulation und Zytokinproduktion stärkere und länger anhaltende Signale (Bryceson et al., 2009).

Nach erfolgter Induktion des Zielzellsterbens löst sich die NK-Zelle von der Zielzelle. Dieser Prozess ist aktiv reguliert und stellt einen entscheidenden Schritt für die Aufrechterhaltung der zytotoxischen Funktion dar (Netter et al., 2017). Ein Teil der NK-Zellen ist anschließend in der Lage, weitere Zielzellen zu erkennen und zu eliminieren. Dieses wiederholte Abtöten mehrerer Zielzellen wird als „serial killing“ bezeichnet und NK-Zellen, die mehrere Zielzellen nacheinander eliminieren, als „serial killer“ (Vanherberghen et al., 2013).

Diese Abfolge verdeutlicht, dass die Zytotoxizität von NK-Zellen kein einzelnes Ereignis darstellt, sondern das Ergebnis eines dynamischen, mehrstufigen Prozesses ist, der durch die Integration extrazellulärer Signale und intrazellulärer Signalwege gesteuert wird. Ein entscheidender regulatorischer Faktor dieses Prozesses ist die intrazelluläre Ca²⁺-Signaltransduktion, die insbesondere für die Exozytose lytischer Granula essenziell ist und im weiteren Verlauf dieser Arbeit im Detail untersucht wird.

1.1.4 Mechanismen der Zielzellabtötung

Die Zytotoxizität von NK-Zellen kann grundsätzlich in zwei Hauptmechanismen unterteilt werden: Die Induktion von Apoptose über Todesrezeptoren sowie die Freisetzung lytischer Granula. Beide Mechanismen tragen zur Eliminierung von Zielzellen bei, wobei der Perforin/Granzym-vermittelte Weg über die lytischen Granula als dominanter Abtötungsmechanismus gilt (Kägi et al., 1994).

Der erste Mechanismus basiert auf der Interaktion von membranständigen Liganden der NK-Zelle mit sogenannten Todesrezeptoren auf der Zielzelle. Zu den wichtigsten Liganden zählen der Fas-Ligand (CD95L) sowie TRAIL (TNF-related apoptosis-inducing ligand), wobei der Fas-Ligand häufiger exprimiert wird (Smyth et al., 2005; Zhu et al., 2016). Die Bindung dieser Liganden an ihre jeweiligen Rezeptoren auf der Zielzelle führt zur Aktivierung der extrinsischen Apoptosekaskade, bei der über Adapterproteine Initiatorcaspasen aktiviert werden (Khosravi-Far and Esposti, 2004).

Kapitel 1 Einleitung

Der zweite Mechanismus erfolgt über die Exozytose lytischer Granula. Diese spezialisierten sekretorischen Lysosomen enthalten unter anderem das porenbildende Protein Perforin sowie verschiedene Subtypen der Serinproteasen Granzym (Osińska et al., 2014; Smyth et al., 2005). Nach Transport entlang der Mikrotubuli werden die Granula an der immunologischen Synapse exozytiert (Stinchcombe & Griffiths, 2014). Dieser Prozess weist funktionelle Ähnlichkeiten zur Neurotransmitterfreisetzung auf, verläuft jedoch deutlich langsamer und erstreckt sich über mehrere Minuten (Krzewski & Strominger, 2008).

Nach der Freisetzung lagert sich Perforin an die Membran der Zielzelle an und bildet dort Poren. Dieser Prozess ist abhängig von Faktoren wie pH-Wert und Calciumkonzentration (Voskoboinik et al., 2015). Die Poren ermöglichen das Eindringen von Granzymen in die Zielzelle. Insbesondere Granzym B spielt eine wesentliche Rolle, indem es Procaspasen durch proteolytische Spaltung aktiviert und so die Caspasen-Kaskade initiiert (Grossman et al., 2003). Dies führt zur Aktivierung von Initiator- und Effektorcaspasen, wie Caspase-3, die schließlich zentrale zelluläre Strukturen wie das Zytoskelett sowie Kern- und Mitochondrienmembranen zerstören. Die Zielzelle stirbt dabei durch Apoptose, wobei die Zellmembran zunächst intakt bleibt und apoptotische Körperchen gebildet werden, die anschließend phagozytiert werden können. Im Gegensatz zur Nekrose wird dadurch eine Entzündungsreaktion weitgehend vermieden (Kerr et al., 1972; Voskoboinik et al., 2015).

Bei hoher Perforinkonzentration oder unzureichender Kontrolle der Membranschädigung kann es jedoch auch zu einer direkten nekrotischen Lyse der Zielzelle kommen. In diesem Fall führt die Porenbildung zu einem unkontrollierten Einstrom von Wasser entlang osmotischer Gradienten, wodurch die Zelle anschwillt und schließlich lysiert (Voskoboinik & Trapani, 2006). Die Freisetzung zellulärer Bestandteile kann eine lokale Entzündungsreaktion auslösen und umliegendes Gewebe schädigen.

Ein wichtiger Aspekt der Zielzelltötung ist, dass NK-Zellen selbst nicht durch die freigesetzten zytotoxischen Moleküle geschädigt werden. Dies wird durch mehrere Schutzmechanismen gewährleistet. Zum einen erfolgt die Freisetzung der Granula stark gerichtet in den synaptischen Spalt, wodurch die Exposition der NK-Zelle minimiert wird. Zum anderen exprimieren NK-Zellen Proteine wie Serpin B9, die die Wirkung von Granzym B inhibieren. Außerdem schützen sich zytotoxische Zellen vor ihrem eigenen Perforin, indem ihre Zellmembran eine hohe Lipidordnung sowie Phosphatidylserin aufweist, was die Porenbildung von Perforin reduziert (Rudd-Schmidt et al., 2019). Zusätzlich verfügen zytotoxische Immunzellen über effiziente Mechanismen zur schnellen Reparatur ihrer Plasmamembran, die unter anderem

Kapitel 1 Einleitung

Ca^{2+} -abhängig sind und sie widerstandsfähiger gegenüber Perforin-vermittelten Schäden machen. Tumorzellen benutzen ähnliche Mechanismen, um resistenter gegenüber zytotoxischen Lymphozyten zu werden (Keefe et al., 2005).

1.2 Calcium in NK-Zellen

1.2.1 Ca^{2+} als universeller Second Messenger

Calcium (Ca^{2+}) nimmt eine besondere Stellung unter den intrazellulären Signalmolekülen ein. Obwohl es sich chemisch um ein Metallion handelt, wird es in der Zellbiologie primär als universeller Second Messenger betrachtet, der in nahezu allen Zelltypen und Geweben eine zentrale Rolle spielt (Berridge et al., 2003; Clapham, 2007). Ca^{2+} -Signale regulieren eine Vielzahl biologischer Prozesse, die von Zellaktivierung und Proliferation bis hin zu Differenzierung, Genexpression und Apoptose reichen. Dabei wird die Information nicht allein durch die absolute Ca^{2+} -Konzentration kodiert, sondern auch durch die zeitliche Dynamik der Signale, einschließlich Amplitude, Dauer und Frequenz (Clapham, 2007).

Die Nutzung von Ca^{2+} als Signalmolekül muss jedoch im Kontext seiner potenziellen Zytotoxizität betrachtet werden. Hohe intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentrationen ($[\text{Ca}^{2+}]_{\text{int}}$) können zelluläre Strukturen schädigen und den Zelltod auslösen. Im Verlauf der Evolution wurden daher Mechanismen entwickelt, die eine strikte Kontrolle der Ca^{2+} -Homöostase ermöglichen. Diese Kontrolle bildet die Grundlage dafür, dass Ca^{2+} nicht nur toleriert, sondern gezielt als Signal genutzt werden kann (Berridge et al., 2003).

Die besondere Funktion von Ca^{2+} beruht auch auf stark ausgeprägten Konzentrationsgradienten zwischen verschiedenen zellulären Kompartimenten. Während die freie Ca^{2+} -Konzentration im Zytosol unter Ruhebedingungen bei etwa 100 nM liegt, finden sich im endoplasmatischen Retikulum deutlich höhere Konzentrationen im μM - bis mM-Bereich (Zheng et al., 2023). Auch der extrazelluläre Raum weist mit etwa 1–2 mM eine wesentlich höhere Ca^{2+} -Konzentration auf. Im Blut finden sich etwa 1,2 mM ungebundenes und 2,4 mM Gesamtcalcium. Diese Gradienten ermöglichen schnelle und präzise Änderungen der $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{int}}$ und damit eine hochdynamische Signalübertragung (Clapham, 2007).

Die Regulation der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration erfolgt über ein fein abgestimmtes Zusammenspiel aus Ca^{2+} -Einstrom über Plasmamembrankanäle, Freisetzung aus intrazellulären Speichern sowie aktivem Export und intrazellulärer Pufferung. Zusätzlich wird

Kapitel 1 Einleitung

die räumliche Reichweite zytosolischer Ca^{2+} -Signale durch Diffusion und die Bindung an zelluläre Puffer bestimmt, wodurch Ca^{2+} häufig lokal begrenzt wirkt (Allbritton et al., 1992). Dabei fungiert Ca^{2+} als „zweischneidiges Signal“: Niedrige bis moderate Konzentrationsanstiege sind typischerweise mit Zellaktivierung und Proliferation assoziiert, während hohe oder anhaltende Ca^{2+} -Signale apoptotische Prozesse induzieren können (Berridge et al., 2003). Die Rolle von Ca^{2+} als Signalmolekül ist evolutionär hoch konserviert und findet sich sowohl in einfachen Organismen als auch in komplexen Vielzellern.

1.2.2 Ca^{2+} und Zytotoxizität in NK-Zellen

Spätestens seit den 1970er Jahren ist bekannt, dass Ca^{2+} eine wesentliche Rolle für die Zytotoxizität des Immunsystems spielt (Kaschek et al., 2021; Mael et al., 1970). Die meisten Erkenntnisse basieren auf Analysen in CTL, aber auch die zytotoxische Funktion von NK-Zellen wird maßgeblich durch intrazelluläre Ca^{2+} -Signale reguliert. Während die initiale Kontaktbildung und die Rezeptoraktivierung weitgehend unabhängig von ausgeprägten Ca^{2+} -Anstiegen erfolgen können, ist die nachgeschaltete Effektorantwort entscheidend von der Generierung und Regulation intrazellulärer Ca^{2+} -Signale abhängig (Feske et al., 2015, 2012; Maul-Pavicic et al., 2011).

Die zentralen Komponenten des Ca^{2+} -Einstroms sind die STIM-Proteine als Sensoren für den Ca^{2+} -Gehalt des endoplasmatischen Retikulums (Liou et al., 2005) sowie ORAI-Proteine als porenformendes Element in der Plasmamembran (Feske et al., 2006; Prakriya et al., 2006). Diese vermitteln den sogenannten „speicherentleerungs-aktivierten Calciumeinstrom“ (store-operated calcium entry; SOCE), der den Hauptweg für den Ca^{2+} -Einstrom in T- und NK-Zellen darstellt (Maul-Pavicic et al., 2011) und auch in anderen zytotoxischen Lymphozyten von entscheidender Bedeutung ist (Zweifach, 2000).

Neben dem SOCE tragen weitere Kanäle zur Regulation der Ca^{2+} -Homöostase bei, darunter TRP-Kanäle, P2X-Rezeptoren sowie spannungsabhängige Ca^{2+} -Kanäle. Letztere scheinen in NK-Zellen jedoch primär regulatorische Funktionen zu übernehmen, anstatt direkt als Ca^{2+} -Kanäle zu wirken (Erdogmus et al., 2022). Auch mitochondriale Transporter wie der „mitochondrial Ca^{2+} uniporter“ (MCU) und der $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher (NCLX) sowie Pumpen wie SERCA und PMCA tragen zur Feinregulation der $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{int}}$ bei (Trebak & Kinet, 2019).

Ein besonderer Ca^{2+} -Kanal ist der mechanosensitive Ionenkanal PIEZO1, der in der Zellmembran lokalisiert ist. Eine erhöhte Steifigkeit von Zielzellen kann zu einer verstärkten

Kapitel 1 Einleitung

Aktivierung von PIEZO1 führen, was mit einer erhöhten Ca^{2+} -Signalgebung sowie einer gesteigerten Abtötungs-Effizienz einhergeht, während weichere Tumorzellen eine reduzierte NK-Zell-Aktivität begünstigen (Yanamandra et al., 2024).

Die funktionelle Kopplung zwischen Rezeptoraktivierung, Ca^{2+} -Signaltransduktion und der Auslösung der zytotoxischen Effektorantwort ist in Abbildung 1 schematisch dargestellt (modifiziert nach Kaschek et al., 2021).

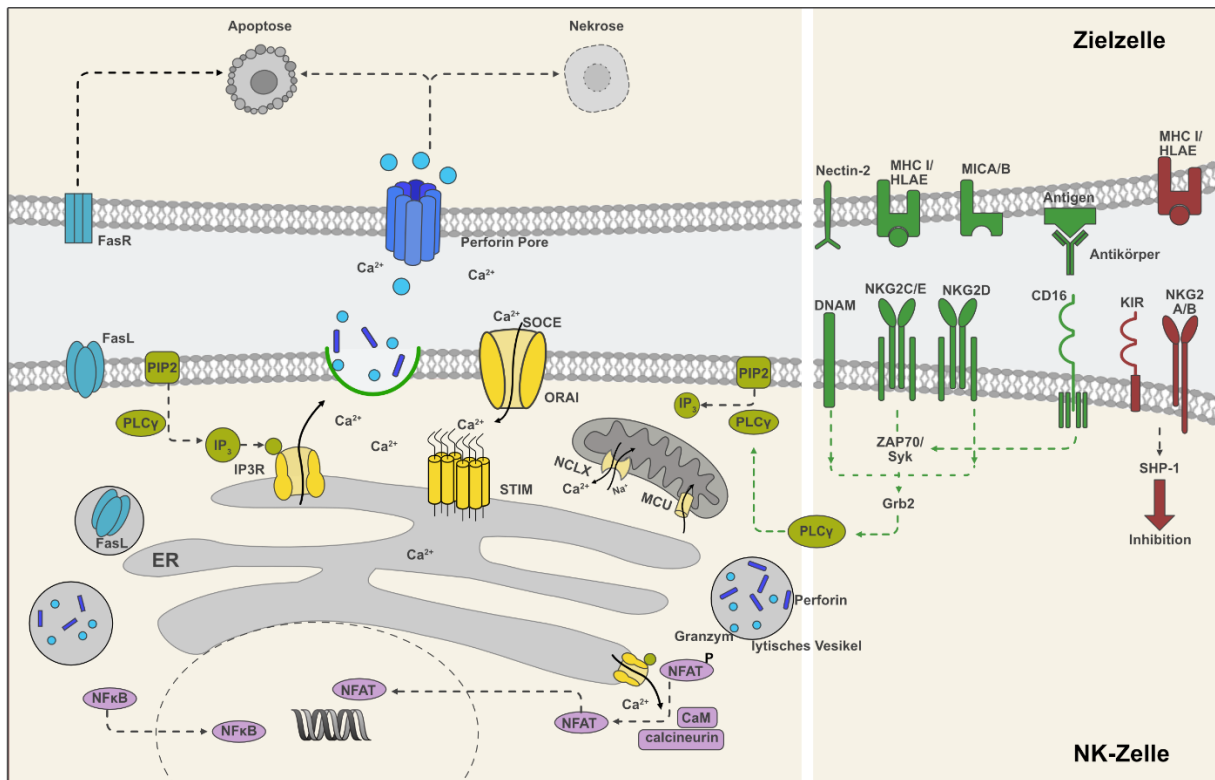


Abbildung 1: Schematische Darstellung der Ca^{2+} -abhängigen Aktivierung und Zytotoxizität von NK-Zellen.

Dargestellt ist eine NK-Zelle (unten) in Kontakt mit einer Zielzelle (oben). Rechts sind wichtige aktivierende und inhibitorische Rezeptor-Ligand-Interaktionen an der immunologischen Synapse gezeigt. Aktivierende Signale führen über ZAP70/Syk, Grb2 und PLCγ zur Bildung von IP_3 aus PIP_2 . IP_3 vermittelt die Freisetzung von Ca^{2+} aus dem endoplasmatischen Retikulum über den IP_3 -Rezeptor. Die Entleerung der intrazellulären Speicher aktiviert über STIM den store-operated calcium entry (SOCE) durch ORAI-Kanäle. Der Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration ist entscheidend für die Exozytose lytischer Vesikel mit Perforin und Granzymen sowie für die Aktivierung von Calcineurin/NFAT-abhängigen Signalwegen. Links sind die zytotoxischen Effektorwege dargestellt, einschließlich Perforin-vermittelter Porenbildung, Granzym-Wirkung und FasL/FasR-vermittelter Signalübertragung, die in der Zielzelle zu apoptotischen oder nekrotischen Verläufen führen können. Eigene Darstellung, modifiziert nach Kaschek et al. (2021).

Nach Aktivierung über Rezeptoren wie CD16, NKG2D oder DNAM-1 werden intrazelluläre Signalkaskaden über ITAM-haltige Adapterproteine initiiert, die über Kinasen wie SYK und ZAP-70 zur Aktivierung der Phospholipase-Cγ (PLCγ) führen (Long et al., 2013; Vivier et al., 2011). PLCγ spaltet das Membranlipid Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP_2) in die beiden Second Messenger Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP_3) und Diacylglycerol (DAG). Während DAG vor allem Protein-Kinase-C-abhängige Signalwege aktiviert, diffundiert IP_3 im

Kapitel 1 Einleitung

Zytosol und bindet an IP₃-Rezeptoren in der Membran des endoplasmatischen Retikulums (ER) (Berridge et al., 2003).

Die Bindung von IP₃ führt zur Öffnung dieser Kanäle und zur Freisetzung von Ca²⁺ aus dem ER in das Zytosol. Aufgrund des starken Konzentrationsgradienten zwischen ER und Zytosol resultiert daraus ein schneller, jedoch transientser Anstieg der [Ca²⁺]_{int} (Clapham, 2007).

Der Abfall der Ca²⁺-Konzentration im ER wird durch die stromalen Interaktionsmoleküle STIM1 und STIM2 detektiert, die als Ca²⁺-Sensoren in der ER-Membran fungieren. Bei sinkender Ca²⁺-Konzentration verändern STIM-Proteine ihre Konformation, oligomerisieren und translozieren in Bereiche des ER, die in unmittelbarer Nähe zur Plasmamembran liegen. Dort interagieren sie mit ORAI-Kanälen, insbesondere ORAI1, und induzieren deren Öffnung (Feske et al., 2006; Hogan et al., 2010). Der daraus resultierende SOCE ermöglicht den kontinuierlichen Ca²⁺-Einstrom aus dem extrazellulären Raum und ist essenziell für die Aufrechterhaltung länger andauernder Ca²⁺-Signale (Feske, 2007; Prakriya & Lewis, 2015).

Die resultierende Erhöhung der zytosolischen Ca²⁺-Konzentration ist essenziell für die Auslösung der zytotoxischen Effektorphase (Maul-Pavicic et al., 2011). Lytische Granula, die Perforin und Granzym enthalten, werden nach Aktivierung entlang des Zytoskeletts zur immunologischen Synapse transportiert und dort in unmittelbarer Nähe zur Plasmamembran positioniert (Stinchcombe et al., 2006). Die Fusion dieser Granula mit der Plasmamembran erfolgt über einen SNARE-abhängigen Mechanismus, der strukturelle Parallelen zur Neurotransmitterfreisetzung aufweist (Krzewski & Strominger, 2008).

Vesikuläre SNARE-Proteine vermitteln gemeinsam mit membranständigen SNAREs die Fusion lytischer Granula mit der Plasmamembran. Für NK-Zellen ist belegt, dass Syntaxin 11 ein eigenes intrazelluläres Kompartiment markiert, das zur immunologischen Synapse rekrutiert wird und dort mit zytotoxischen Granula kolokalisiert (Dabrazhynetskaya et al., 2012). Ergänzende mechanistische Hinweise aus humanen zytotoxischen T-Zellen zeigen, dass weitere SNARE-Proteine wie Vti1b und VAMP7 an Docking- und Fusionschritten lytischer Granula beteiligt sind (Chitirala et al., 2019; Qu et al., 2011). Voraussetzung für diesen Prozess ist die korrekte Positionierung der lytischen Granula an der Plasmamembran, die durch Rab27a reguliert wird (Ménasché et al., 2000). Anschließend erfolgt das sogenannte Vesikel-Priming, bei dem Munc13-4 eine wichtige Rolle spielt und die Fusionsbereitschaft der Granula herstellt. Defekte in diesem Protein führen zu einer stark eingeschränkten Degranulation (Feldmann et al., 2003). Die eigentliche Fusion der Granula mit der Plasmamembran ist ein Ca²⁺-abhängiger

Kapitel 1 Einleitung

Prozess, der eine präzise zeitliche und räumliche Kontrolle der Granulafreisetzung ermöglicht (Schwarz et al., 2013).

Zur Beendigung des Signals und zur Wiederherstellung des basalen Zustands wird Ca^{2+} aktiv aus dem Zytosol entfernt. Dies erfolgt über Plasmamembran- Ca^{2+} -ATPasen (PMCA) sowie durch SERCA-Pumpen, die Ca^{2+} zurück in das endoplasmatische Retikulum transportieren. Diese Mechanismen gewährleisten eine präzise Kontrolle der Ca^{2+} -Homöostase und verhindern eine Überaktivierung oder zelluläre Schädigung (Zheng et al., 2023). Zudem tragen sie auch zur zeitlichen Formung von Ca^{2+} -Signalen bei. Für T-Zellen wurde gezeigt, dass die PMCA-Aktivität die Dynamik und Stabilität von Ca^{2+} -Signalen mitbestimmen kann (Bautista et al., 2002).

Sowohl in CTL als auch in NK-Zellen ist belegt, dass bereits moderate Erhöhungen der $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{int}}$ ausreichen, um eine maximale zytotoxische Aktivität zu erreichen, während höhere Ca^{2+} -Spiegel die Effizienz der Zielzellabtötung nicht weiter steigern und sogar reduzieren können (Zhou et al., 2018). Das deutet darauf hin, dass Ca^{2+} nicht nur als Aktivierungssignal fungiert, sondern als fein regulierter Modulator, der unterschiedliche funktionelle Programme steuert (Kaschek et al., 2021).

Die funktionelle Bedeutung dieser Mechanismen wird durch die Analyse genetischer Defekte unterstrichen. Mutationen in Komponenten der Ca^{2+} -Signaltransduktion, insbesondere in ORAI1 oder STIM1, führen zu einem gestörten SOCE und resultieren in schweren kombinierten Immundefizienzen (Feske et al., 2006; Maul-Pavicic et al., 2011). Ebenso führen Defekte in der vesikulären Exozytose, beispielsweise durch Mutationen in Munc13-4, Syntaxin-11 oder weiteren Komponenten des SNARE-Systems, zur familiären hämophagozytischen Lymphohistiozytose (FHL), die durch eine stark eingeschränkte zytotoxische Funktion von NK- und T-Zellen gekennzeichnet ist (de Saint Basile et al., 2010).

1.2.3 Weitere Funktionen von Ca^{2+} in NK-Zellen

Neben seiner zentralen Rolle in der Auslösung der zytotoxischen Effektorantwort erfüllt Ca^{2+} in NK-Zellen eine Vielzahl weiterer regulatorischer Funktionen. Als universeller Second Messenger steuert Ca^{2+} dabei sowohl kurzfristige zelluläre Prozesse als auch längerfristige Veränderungen der Zellfunktion (Feske et al., 2012; Hogan et al., 2010).

Ein wichtiger Aspekt ist die Regulation der Zytokinproduktion. Erhöhte $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{int}}$ führen über Ca^{2+} -abhängige Signalwege zur Aktivierung von Transkriptionsfaktoren wie dem „nuclear

Kapitel 1 Einleitung

factor of activated T cells“ (NFAT). Nach Aktivierung durch Calmodulin und die Phosphatase Calcineurin transloziert NFAT in den Zellkern und induziert die Expression verschiedener Zytokine, darunter TNF α , IFN- γ und GM-CSF (Feske et al., 2012; Hogan et al., 2003). Die Aktivität von NFAT ist dabei eng an die Dauer und Stärke der Ca²⁺-Signale gekoppelt.

Darüber hinaus ist Ca²⁺ an der Regulation der Zellmigration beteiligt. Dynamische Ca²⁺-Signale beeinflussen die Organisation des Zytoskeletts sowie die Aktivität von Adhäsionsmolekülen und tragen so zur gerichteten Bewegung von NK-Zellen bei. Insbesondere SOCE wird mit der Regulation von Zellmotilität und Immunzellmigration in Verbindung gebracht (Feske et al., 2012). Auch die Proliferation und die Aktivierung von NK-Zellen werden durch Ca²⁺-abhängige Signalwege moduliert. Zytokine wie IL-2 oder IL-15 können intrazelluläre Ca²⁺-Signale auslösen und so funktionelle Antworten verstärken. Ca²⁺ wirkt hierbei als integrativer Signalvermittler, der unterschiedliche Stimuli in koordinierte zelluläre Reaktionen umsetzt (Marr et al., 2025).

Schließlich spielt Ca²⁺ auch eine Rolle bei der Regulation des Zellüberlebens. Während moderate und zeitlich begrenzte Ca²⁺-Signale mit Aktivierung und Funktion assoziiert sind, können anhaltend erhöhte Ca²⁺-Konzentrationen apoptotische Prozesse in NK-Zellen selbst induzieren (Berridge et al., 2003).

Zusammenfassend fungiert Ca²⁺ in NK-Zellen als zentraler Integrator verschiedenster Signale, der über die Regulation von Genexpression, Zellmigration und Zellschicksal weit über die unmittelbare zytotoxische Funktion hinausgeht.

1.2.4 Messung von Ca²⁺ in einzelnen Zellen

Die quantitative Analyse von [Ca²⁺]_{int} auf Einzelzellebene wurde maßgeblich durch die Entwicklung fluoreszenzbasierter Indikatoren ermöglicht. Während frühe Ansätze auf indirekten Methoden wie Isotopenmessungen oder Mikroelektroden basierten, erlaubten fluoreszierende Ca²⁺-Sensoren seit den 1980er Jahren erstmals eine direkte und dynamische Analyse von Ca²⁺-Signalen in lebenden Zellen auf Einzelzellebene (Tsien, 1981). Einen entscheidenden Meilenstein stellte die Einführung des ratiometrischen Ca²⁺-Indikators Fura-2 dar (Grynkiewicz et al., 1985), der bis heute als Standardmethode für in vitro Messungen gilt.

Klassische chemische Ca²⁺-Indikatoren wie Fura-2 basieren auf Ca²⁺-bindenden Chelatoren, meist auf Grundlage von BAPTA. Die Bindung von Ca²⁺ führt zu charakteristischen

Kapitel 1 Einleitung

Änderungen der Fluoreszenzeigenschaften, wodurch Rückschlüsse auf die $[Ca^{2+}]_{int}$ möglich sind. Ein wesentlicher Vorteil ratiometrischer Indikatoren liegt in der Messung des Emissionsverhältnisses bei zwei Anregungswellenlängen. Dieses Verhältnis ist weitgehend unabhängig von Faktoren wie Farbstoffkonzentration, Zellgröße oder ungleichmäßiger Beladung und ermöglicht somit besonders robuste und vergleichbare Messungen (Grynkiewicz et al., 1985).

Neben ratiometrischen existieren nicht-ratiometrische Indikatoren wie Fluo-4, die durch höhere Signalintensitäten und bessere zeitliche Auflösung charakterisiert sind, jedoch stärker von experimentellen Bedingungen abhängen. Die Wahl des geeigneten Indikators stellt daher stets einen Kompromiss zwischen Sensitivität, zeitlicher Auflösung und quantitativer Genauigkeit dar.

Ein wichtiger Parameter für die Auswahl von Ca^{2+} -Indikatoren ist deren Dissoziationskonstante (K_d), die den optimal messbaren Konzentrationsbereich definiert. Da sich Ca^{2+} -Konzentrationen zwischen zellulären Kompartimenten erheblich unterscheiden, müssen Indikatoren entsprechend angepasst werden. Während hochaffine Sensoren zur Messung zytosolischer Ca^{2+} -Signale geeignet sind, erfordern Messungen in Ca^{2+} -reichen Kompartimenten wie dem ER Indikatoren mit geringerer Affinität (Gerasimenko & Tepikin, 2005).

Neben chemischen Farbstoffen haben sich genetisch kodierte Ca^{2+} -Indikatoren („genetically encoded calcium indicators“, GECIs) etabliert, die auf Ca^{2+} -bindenden Proteinen wie Calmodulin oder Troponin basieren. Beispiele hierfür sind GCaMP- oder Twitch-Sensoren (T.-W. Chen et al., 2013; Miyawaki et al., 1997; Thestrup et al., 2014). Diese ermöglichen insbesondere Langzeitmessungen sowie in vivo Analysen und erlauben eine gezielte Expression in spezifischen Zellpopulationen. Allerdings kann die notwendige genetische Modifikation insbesondere in primären Immunzellen experimentelle Limitationen mit sich bringen (Friedmann et al., 2019).

1.2.5 Messung von Ca^{2+} in NK-Zellen

Im Vergleich zu anderen Immunzelltypen existieren bislang nur vergleichsweise wenige Arbeiten zur direkten Messung intrazellulärer Ca^{2+} -Signale in primären humanen oder murinen NK-Zellen (Kaschek et al., 2026). Die bisher publizierten Studien nutzten überwiegend durchflusszytometrische Ansätze mit Indo-1, Fura-Red oder Fluo-Derivaten (Adib et al., 2023;

Kapitel 1 Einleitung

Bryceson et al., 2006b; Ganesan & Höglund, 2019, 2021; Grandclément et al., 2016; Lane et al., 2009; Y. Li et al., 2022; MacFarlane et al., 2010; Maul-Pavicic et al., 2011; Nguyen et al., 2016, 2017; Shenoy et al., 1993; Van Graft et al., 1993). Die mikroskopiebasierten Untersuchungen wurden überwiegend mit Fura-2 durchgeführt (Hess et al., 1993; Honda & Miyazaki, 1996; Olivas-Aguirre et al., 2023; Zhou et al., 2018). Zusätzlich ist zu berücksichtigen, dass nur wenige dieser Arbeiten bei physiologischer Temperatur von 37 °C durchgeführt wurden (Bryceson et al., 2006b; Ganesan & Höglund, 2019, 2021), obwohl Ca^{2+} -Signale stark temperaturabhängig sind (Müller et al., 2021).

Für die Untersuchung primärer NK-Zellen in vitro stellt Fura-2 weiterhin einen etablierten Standard dar. Allerdings erfordert Fura-2 eine Anregung im UV-Bereich, was mit potenziellen phototoxischen Effekten sowie Einschränkungen für Langzeit- und Hochdurchsatzmessungen verbunden ist (Robinson et al., 2023). Insgesamt bleibt die Wahl des geeigneten Ca^{2+} -Sensors stark vom jeweiligen experimentellen Kontext abhängig und erfordert eine sorgfältige Abwägung zwischen Sensitivität, zeitlicher Auflösung und biologischer Verträglichkeit.

1.3 NK-Zellen im klinischen Kontext

1.3.1 NK-assozierte Krankheiten

Die zentrale Rolle von NK-Zellen in der Immunabwehr wird insbesondere bei genetischen Defekten deutlich, die die NK-Zytotoxizität beeinträchtigen. Solche Störungen führen häufig zu schweren Immundefizienzen und liefern wichtige Einblicke in die molekularen Mechanismen der NK-Zell-vermittelten Zytotoxizität.

Studien an Patienten mit Mutationen in wesentlichen Komponenten des SOCE, insbesondere in den Proteinen ORAI1 und STIM1, zeigen, dass ein gestörter Ca^{2+} -Einstrom zu einer ausgeprägten Immundefizienz führt (Feske et al., 2006; Silva-Rojas et al., 2020). Betroffene Patienten entwickeln häufig bereits im frühen Kindesalter schwere, rezidivierende Infektionen, obwohl die Entwicklung und Differenzierung von Immunzellen weitgehend intakt ist. Neben Defekten in der Ca^{2+} -Signaltransduktion führen auch Störungen der zytotoxischen Effektormechanismen selbst zu schweren Krankheitsbildern. Eine wichtige Erkrankung im Zusammenhang mit gestörter NK-Zell-Funktion ist die hämophagozytische Lymphohistiozytose (HLH), ein lebensbedrohliches hyperinflammatorisches Syndrom, das durch eine unkontrollierte Aktivierung des Immunsystems gekennzeichnet ist. Die familiäre Form (FHL) stellt dabei die genetisch bedingte Variante dar und ist häufig auf Defekte in der

Kapitel 1 Einleitung

zytotoxischen Funktion von NK- und CD8⁺ T-Zellen zurückzuführen. Die zugrunde liegenden Mutationen betreffen unterschiedliche Schritte der NK-Zell-Zytotoxizität, darunter Defekte in Effektormolekülen wie Perforin (PRF1), Störungen der Granulabiogenese sowie Beeinträchtigungen der vesikulären Exozytose, beispielsweise durch Mutationen in Komponenten der SNARE-abhängigen Fusionsmaschinerie oder deren regulatorischen Faktoren.

Diese Erkrankungen verdeutlichen, dass die zytotoxische Funktion von NK-Zellen von einem fein abgestimmten Zusammenspiel mehrerer Prozesse abhängt. Bereits Störungen einzelner Komponenten können zu schwerwiegenden funktionellen Defiziten und lebensbedrohlichen Krankheitsverläufen führen.

1.3.2 NK-Therapie

In den letzten Jahren hat die Nutzung von Immunzellen in der Krebstherapie erheblich an Bedeutung gewonnen. Insbesondere Zelltherapien, bei denen Immunzellen ex vivo expandiert oder genetisch modifiziert und anschließend dem Patienten zurückgeführt werden, haben vielversprechende klinische Ergebnisse erzielt. Während sich der Fokus zunächst stark auf T-Zellen, insbesondere CAR T-Zellen, richtete, rücken zunehmend auch NK-Zellen und Makrophagen als alternative Effektorzellen in den Vordergrund (Vaja et al., 2026).

NK-Zellen besitzen mehrere Vorteile für therapeutische Anwendungen. Durch das „missing self“-Prinzip sind sie in der Lage, Tumorzellen zu erkennen und zu eliminieren, die sich der T-Zell-vermittelten Immunüberwachung entziehen. Zudem verursachen sie in der Regel keine Graft-versus-Host-Reaktionen und können unmittelbar funktionell aktiv sein (Chiossone & Vivier, 2022; Gierschek et al., 2024). NK-Zell-basierte Therapien umfassen sowohl Antikörper-basierte Ansätze, beispielsweise der anti-CD20 Antikörper Rituximab, als auch Zelltherapien. Letztere beinhalten autologe und allogene NK-Zellinfusionen, die aus verschiedenen Quellen wie peripherem Blut, Nabelschnurblut oder induzierten pluripotenten Stammzellen gewonnen und häufig ex vivo aktiviert werden (Vivier et al., 2024). Eine weitere etablierte Plattform stellt die NK-Zelllinie NK-92 dar, die sich durch hohe Zytotoxizität und gute Kultivierbarkeit auszeichnet (Gierschek et al., 2024). Erste genetische Modifikationen dieser Zelllinie bzw. der Zelllinie YT zur Expression chimärer Antigenrezeptoren wurden bereits früh beschrieben (Schirrmann & Pecher, 2002; Uherek et al., 2002).

Kapitel 1 Einleitung

Ein großer Fortschritt ist die Etablierung chimärer Antigenrezeptoren (CAR) in NK-Zellen. Frühere präklinische Studien konnten zeigen, dass CAR-modifizierte NK-Zellen gezielt Tumorantigene wie CD19 oder CD20 erkennen und eliminieren können (Müller et al., 2008; Boissel et al., 2009). Klinische Daten bestätigen dieses Potenzial. In einer ersten klinischen Studie mit CD19-spezifischen CAR NK-Zellen zeigten die meisten behandelten Patienten ein rasches Ansprechen. Darunter kam es zu mehreren vollständigen Remissionen bei gleichzeitig geringer Toxizität (Liu et al., 2020). Eine nachfolgende Phase-1/2-Studie mit allogenen, Nabelschnurblut-abgeleiteten CD19-CAR NK-Zellen bestätigte die gute Verträglichkeit und bestätigte die klinische Wirksamkeit bei CD19-positiven B-Zell-Malignomen (Marin et al., 2024).

Trotz dieser vielversprechenden Ergebnisse weisen CAR NK-Zellen im direkten Vergleich zu CAR T-Zellen teilweise eine geringere Zytokinproduktion und reduzierte anti-tumorale Effizienz auf (Egli et al., 2024). Aktuelle Forschungsansätze konzentrieren sich daher auf die Verbesserung der Persistenz und Funktionalität, beispielsweise durch zusätzliche Zytokinexpression oder genetische Modifikation inhibitorischer Signalwege (Bexte et al., 2023; Bexte et al., 2024). Insgesamt zeigen aktuelle klinische Studien, dass CAR NK-Zellen insbesondere bei hämatologischen Krebsarten wirksam sein können, während ihre Effektivität bei soliden Tumoren bislang begrenzt ist (Jørgensen et al., 2025). Neben CAR-basierten Ansätzen werden auch alternative Strategien zur gezielten Antigenerkennung untersucht, beispielsweise durch die Nutzung von Autoantigenen als funktionelle Bindungsdomänen zur Tumorerkennung (Bewarder et al., 2021).

Während NK-Zell-basierte Therapien zunächst vor allem im Kontext von Tumorerkrankungen entwickelt wurden, wird zunehmend ihr Potenzial auch über die Onkologie hinaus untersucht. Aufgrund ihrer Fähigkeit, gestresste, infizierte oder fehlregulierte Zellen ohne vorherige Antigensensibilisierung zu erkennen und zu eliminieren sowie gleichzeitig immunmodulatorische Zytokine zu produzieren, können NK-Zellen gezielt in unterschiedlichen Krankheitskontexten eingesetzt werden. Entsprechend werden NK-Zell-Therapien zunehmend für Anwendungen bei viralen Infektionen, Autoimmunerkrankungen, neurodegenerativen Erkrankungen und bei der Transplantationsmedizin untersucht, mit dem Ziel, pathogene Zellen zu eliminieren und die Gewebemöostase wiederherzustellen (Cayatte et al., 2026).

1.4 Zielsetzung

Natürliche Killerzellen (NK-Zellen) spielen eine entscheidende Rolle in der angeborenen Immunabwehr, indem sie infizierte oder entartete Zellen erkennen und eliminieren. Die zytotoxische Funktion dieser Zellen beruht auf einer komplexen Abfolge von Aktivierungs- und Effektormechanismen, deren präzise Regulation entscheidend für eine effektive Immunantwort ist. Dabei sind intrazelluläre Ca^{2+} -Signale von zentraler Bedeutung, insbesondere im Zusammenhang mit der Degranulation und der Freisetzung zytotoxischer Moleküle. Wie diese Ca^{2+} -Signale jedoch auf Einzelzellebene mit dem Verlauf von NK-Zell-Zielzell-Interaktionen verknüpft sind, ist bislang nur unzureichend verstanden.

Ziel dieser Arbeit war es daher, ein experimentelles System zu etablieren, das die gleichzeitige Analyse intrazellulärer Ca^{2+} -Signale und der zytotoxischen Aktivität von NK-Zellen auf Einzelzellebene ermöglicht. Eine wesentliche Voraussetzung hierfür war die Identifikation und Etablierung eines geeigneten ratiometrischen Ca^{2+} -Indikators für den Einsatz in primären humanen NK-Zellen. Zu diesem Zweck sollten verschiedene Ca^{2+} -Farbstoffe systematisch hinsichtlich ihrer Eignung für Live-Cell-Imaging-Experimente verglichen werden. Zur Analyse der Zielzellabtötung wurde der ausgewählte Ca^{2+} -Farbstoff mit dem Apoptose-Sensor pCasper kombiniert, der eine Differenzierung zwischen lebenden, apoptotischen und nekrotischen Zielzellen ermöglicht.

Mit diesem Setup sollte untersucht werden, wie sich intrazelluläre Ca^{2+} -Signale in primären humanen NK-Zellen während der Interaktion mit verschiedenen Zielzelllinien dynamisch verändern und in welchem Zusammenhang diese Signale mit den unterschiedlichen funktionellen Interaktionsverläufen stehen.

Darüber hinaus sollte das etablierte System auf genetisch modifizierte NK-Zellen mit chimären Antigenrezeptoren (CAR NK-Zellen) übertragen werden, um Ca^{2+} -Signalcharakteristika unter Bedingungen einer antigenspezifischen Aktivierung zu analysieren und mit natürlichen NK-Zellantworten zu vergleichen.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte und Instrumente

Tabelle 1: Geräte und Instrumente

Gerät	Hersteller
Celldiscoverer 7	Zeiss
Cell Observer A1	Zeiss
Evolve	Photometrics
Colibri LED	Zeiss
Lattice Light Sheet 7	Zeiss
CLARIOstar Plus	BMG Labtech
FACSVerse	BD Biosciences
CO2 Inkubator Heraeus	Thermo Fisher Scientific
Laminar-Flow Werkbank	HERAsage
AutoMACS	Miltenyi
Zellzähler Z2	Beckman Coulter
Luna FL (Dual fluorescece Cell Counter)	Logos
Pipetboy	Integra Biosciences
Vortex Genie 2	Scientific Industries
Vortex Thriller	Peqlab
Zentrifuge 5418	Eppendorf
Zentrifuge 5810 R	Eppendorf
Zentrifuge Universal 32 R	Hettich
ALT 160-4 NM (Waage)	Kern & Sohn GmbH

2.1.2 Zellgenerierung und Zellkultivierung

Tabelle 2: Material zur Zellgenerierung und Zellkultivierung

Name	Hersteller	Kat.-Nr.
RPMP-1640 Medium	Thermo Fisher Scientific	21875-034
AIM-V Medium	Thermo Fisher Scientific	12055-091
NK-MACS Medium	Miltenyi	130-114-429
Fetales Kälberserum (FCS)	PanBiotech	10270-106
Dulbecco's PBS (DPBS)	Thermo Fisher Scientific	14190-094
Bovine Serum Albumin (BSA)	Thermo Fisher Scientific	15561020
Humanes Serum AB	Pan Biotech	P40-3001
Penicillin/Streptomycin	Sigma Aldrich	P4333-100ML
Interleukin-2 (human)	Miltenyi Biotec	130-097-748
Interleukin-15 (human)	Miltenyi Biotec	130-095-760
Lymphozyten-Separationsmedium (1,077 g/ml)	PromoCell	C-44010
Hank's BSS	PAA Laboratories	H15-009
NK Cell Isolation Kit	Miltenyi	130-092-657
LD Säulen	Miltenyi	130-042-901

MACS SmartStrainer, 30 µm	Miltenyi	130-098-458
G418	Sigma Aldrich	A1720-5G

2.1.3 Calciumfarbstoffe und Fluoreszenzfarbstoffe

Tabelle 3: Calciumfarbstoffe und Fluoreszenzfarbstoffe

Name	Hersteller	Kat.-Nr.
Fura-2-AM	Thermo Fisher Scientific	F1221
Fura-PE3-AM	Santa Cruz	sc-203960
Fura-8-AM	biomol	77327
Fura-10-AM	biomol	21115
Fura-Red-AM	Thermo Fisher Scientific	F3021
Calcein-AM	Thermo Fisher Scientific	C3100MP
Deep Red Cell Tracker	Thermo Fisher Scientific	C34565
AO/PI-Zählfarbstoff (Acridin Orange und Propidium Iodid)	Logos	F23001

2.1.4 Antikörper und FACS-Färbungen

Tabelle 4: Antikörper und FACS-Färbungen

Antigen	Klon	Fluorochrom	Hersteller	Kat.-Nr.
anti-CD56	5.1.H11	APC	BioLegend	362504
anti-CD16	B73.1	PE	BioLegend	360705
anti-CD3	SK7	PerCP	BioLegend	344814
anti-CD14	M5E2	PE-Cy7	BioLegend	301814
anti-CD19	H1B19	Brilliant Violet 421	BioLegend	302234
anti-CD4	SK3	Brilliant Violet 421	BioLegend	344632
anti-CD8	SK1	FITC	BioLegend	344704
anti-CD45	HI30	Brilliant Violet 510	BioLegend	304036
7-AAD			Miltenyi	130-111-568
anti-CD19-CAR		Ohne (Biotin)	Miltenyi	130-129-550
anti-Biotin	REA746	PE	Miltenyi	130-110-951

2.1.5 Chemikalien und Inhibitoren

Tabelle 5: Chemikalien und Inhibitoren

Name	Hersteller	Kat.-Nr.
CaCl ₂ (Calcium Chlorid Dihydrat)	EMD Chemicals	208291
EGTA (Ethylenglycol-bis(β-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure)	Sigma-Aldrich	1001075307
EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure)	Sigma-Aldrich	102502507
HEPES (2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure)	Sigma-Aldrich	H-7523
Thapsigargin (TG)	Thermo Fisher Scientific	10226822
Ionomycin	Merck	407952-1M6
Concanamycin A	Santa Cruz	Sc-202111

BAPTA-AM	Thermo Fisher Scientific	B6769
Rituximab	Hexal AG	Klinikapotheke, Homburg
DMSO	Sigma-Aldrich	D4540-100ML
Triton X-100	Eurobio	18774
Tergitol	Sigma-Aldrich	15S9
Poly-L-Ornithin	Sigma-Aldrich	P3655
FACSClean Solution	BS Biosciences	340345
FACSFlow Sheath Fluid	BD Biosciences	342003
Immersionsöl 518F, Carl Zeiss	Fisher Scientific	10539438

2.1.6 Platten und Verbrauchsmaterialien

Tabelle 6: Platten und Verbrauchsmaterialien

Name	Hersteller	Kat.-Nr.
Schwarze 96-Well Mikrotiterplatte	Corning Falcon	353219
Schwarze 96-Well Mikrotiterplatte, klarer Boden (optimiert für Mikroskopie)	Revvity	6055300
Schwarze 384-Well Mikrotiterplatte, klarer Boden (optimiert für Mikroskopie)	Revvity	6057300
Glasdeckgläser (12 mm)	ORSATec	O2R251-D
Glasdeckgläser (25 mm)	ORSATec	O2R2515-D

Alltägliche Verbrauchsmaterialien wie Pipettenspitzen, serologische Pipetten, Zellkulturflaschen, 6- bis 96-Well Zellkulturplatten und Reaktionsgefäße wurden, soweit nicht anders angegeben, von VWR, BD und Sarstedt bezogen.

2.1.7 Lösungen

0 mM Ca²⁺ Ringer-Lösung

155 mM NaCl
10 mM Glukose
5 mM HEPES
5 mM MgCl₂
1 mM EGTA
pH 7,4

HEPES-Puffer

10 mM HEPES
10 mM NaCl
pH 7,4

2 mM Ca²⁺ Ringer-Lösung

155 mM NaCl
10 mM Glukose
5 mM HEPES
5 mM MgCl₂
2 mM CaCl₂
pH 7,4

Erythrozyten-Lysepuffer

155 mM NaCl
9,99 mM KHCO₃
130 µM EDTA
pH 7,3

2.2 Methoden

2.2.1 Ethikanträge

Im Rahmen dieser Arbeit wurden primäre NK-Zellen sowie periphere mononukleäre Blutzellen („peripheral blood mononuclear cells“, PBMCs) verwendet, die aus der Blutbank der klinischen Hämostaseologie und Transfusionsmedizin des Uniklinikums des Saarlandes stammten. Dies ist durch den Ethikantrag (84/15) genehmigt. Für die Verwendung der CD19-CAR NK-Zellen lag ein separates Ethikvotum vor (Goethe Universität Frankfurt, Nr. 329/10).

2.2.2 Isolierung und Kultivierung von humanen NK-Zellen

Primäre NK-Zellen

In dieser Arbeit wurden primäre NK-Zellen verwendet, die aus Blut gesunder Spender gewonnen wurden. Ausgangsmaterial waren Leukozytenreduktionskammern („leukocyte reduction system“, LRS), die von der Blutspendezentrale des Universitätsklinikums des Saarlandes zur Verfügung gestellt wurden (Institut für klinische Hämostaseologie und Transfusionsmedizin, Homburg).

Zunächst wurden periphere mononukleäre Blutzellen (PBMCs) mittels Dichtegradientenzentrifugation unter Verwendung eines Lymphozyten-Separationsmediums (Dichte 1,077 g/ml) gewonnen. Hierbei wurden die LRS-Kammern mit PBS verdünnt und bei $450 \times g$ für 30 Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert. Aufgrund ihrer höheren Dichte sedimentierten die Erythrozyten, während sich PBMCs als Interphase absetzten und isoliert werden konnten. Verbleibende Erythrozyten wurden durch Erythrozytenlyse entfernt, gefolgt von zwei Waschschritten zur Entfernung der Thrombozyten ($200 \times g$, 10 Minuten) (Knörck et al., 2018).

Die Isolation der NK-Zellen aus den PBMCs erfolgte anschließend durch negative magnetische Selektion unter Verwendung des NK Cell Isolation Kits. Dabei wurden zunächst Monozyten, Granulozyten und verbliebene Erythrozyten mithilfe von CD14-, CD15- und CD235A-MicroBeads und T-Zellen mittels CD3-MicroBeads entfernt. Die NK-Zellen wurden entweder manuell über magnetische Säulen oder automatisiert mit dem AutoMACS-System isoliert.

Die Reinheit der isolierten NK-Zellen wurde durch Durchflusszytometrie überprüft und lag für alle funktionellen Assays bei mindestens 85 %. NK-Zellen wurden in AIM-V-Medium mit 10 % fetalem Kälberserum kultiviert und mit 100 U/ml rekombinantem humanem Interleukin-2

Kapitel 2 Material und Methoden

stimuliert. Die Zellen wurden zwischen Tag 2 und Tag 6 nach Isolation experimentell eingesetzt.

CAR NK und NT NK-Zellen

CD19-CAR NK-Zellen (CAR NK) sowie nicht-transduzierte NK-Zellen (NT NK) wurden in der Arbeitsgruppe Ullrich von Alina Moter (Goethe-Universität Frankfurt) generiert, kultiviert, charakterisiert und für die in dieser Arbeit beschriebenen funktionellen Analysen zur Verfügung gestellt.

Primäre humane NK-Zellen gesunder Spender wurden aus peripheren mononukleären Blutzellen (PBMCs) isoliert und unter standardisierten Bedingungen kultiviert. Die PBMCs wurden zunächst mittels Dichtegradientenzentrifugation gewonnen. Die anschließende Anreicherung der NK-Zellen aus den PBMCs erfolgte mit dem EasySep Human NK Cell Enrichment Kit (STEMCELL Technologies). Danach wurden die Zellen in einem NK-spezifischen Medium kultiviert, das mit humanem Plasma, Antibiotika und Interleukin-15 supplementiert war. NK-Zellen wurden in regelmäßigen Abständen passagiert und für funktionelle Assays voraktiviert.

Zur Generierung von CD19-CAR NK-Zellen wurden primäre NK-Zellen zwei Tage nach Isolation genetisch modifiziert. Hierbei kamen entweder lentivirale Transduktion oder ein nicht-virales Sleeping-Beauty-Transposonsystem zum Einsatz, wobei in beiden Fällen dasselbe CD19-CAR-Transgen benutzt wurde. Der verwendete CAR bestand aus einer CD19-spezifischen scFv-Domäne (FMC63), einer 4-1BB-Kostimulationsdomäne und einer CD3 ζ -Signaldomäne. Zusätzlich war ein verkürzter epidermaler Wachstumsfaktorrezeptor (tEGFR) als Sicherheits- und Detektionsmarker in das Konstrukt integriert.

Die Expression des CAR-Konstrukts wurde durch Durchflusszytometrie anhand der tEGFR-Expression überprüft. Für Einzelzell-Live-Cell-Imaging-Experimente wurden CD19-CAR NK-Zellen vorab auf eine reine CAR-positive Population sortiert. Die Sortierung erfolgte basierend auf tEGFR-Expression innerhalb der CD56⁺CD3⁻-NK-Zellpopulation. Nicht-transduzierte NK-Zellen wurden parallel auf CD56⁺CD3⁻-Zellen sortiert, um vergleichbare experimentelle Bedingungen sicherzustellen.

Die Zellen wurden in NK-MACS-Medium kultiviert, ergänzt mit 1 % NK-MACS Supplements (Miltenyi Biotec), 5 % hitzeinaktiviertes humanes Plasma (RK-Blutspendedienst Baden-Württemberg-Hessen, Frankfurt am Main), 1 % Penicillin/Streptomycin (Thermo Scientific™) und 120 IU/ml IL-15 (Miltenyi Biotec).

Kapitel 2 Material und Methoden

Alle Messungen mit CAR und NT NK-Zellen erfolgten in Zusammenarbeit mit Alina Moter, Nadja Küchler und mir. Die genaue Aufteilung der Arbeit ist jeweils in den Abbildungsunterschriften angegeben.

Zellzählung

NK-Zellen wurden routinemäßig mit dem Zellzählgerät Luna gezählt. Unter Verwendung des Acridine Orange/PI-Farbstoffes wurde eine Lebend/Todzählung durchgeführt. Somit wurden Zelltrümmer, Erythrozyten und Thrombozyten bei der Zählung der PBMC nicht mitgezählt.

2.2.3 Durchflusszytometrische Analysen

Zur Charakterisierung der PBMC-Zusammensetzung sowie zur Bestimmung der Reinheit isolierter NK-Zellen wurde ein im Labor etabliertes 8-Farben-Panel verwendet (Knörck et al., 2018). Die Messungen erfolgten an einem FACSVerse Durchflusszytometer, die Auswertung mit FlowJo v10.8.1.

Zur Identifikation der Zellpopulationen wurden physikalische Parameter (FSC-A, FSC-H, SSC-A) sowie fluorochromkonjugierte monoklonale Antikörper eingesetzt, darunter anti-CD3-PerCP, anti-CD16-PE, anti-CD14-PE-Cy7, anti-CD56-APC, anti-CD8-FITC, anti-CD4-BV421, anti-CD45-BV510 und anti-CD19-BV421. Die Antikörper wurden für 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Zur Detektion der CAR-Expression auf CD19-CAR NK-Zellen wurde ein biotinylierter Anti-CD19-CAR-Antikörper verwendet, gefolgt von einer Färbung mit Anti-Biotin-PE. Die Analyse wurde von Nadja Küchler durchgeführt.

2.2.4 Zelllinien und Kulturbedingungen

In dieser Arbeit wurden die Zelllinien K562 (CCL-243), NALM-6 (DSMZ, #ACC128 freundlicherweise bereitgestellt von Adolfo Cavalié), WSU-DLBCL2 (DSMZ, #ACC575), Jurkat E6.1 (ATCC, TIB-152™) und TMD8 (Cellosaurus, CVCL_A442, freundlicherweise bereitgestellt von Lorenz Trümper, Göttingen) verwendet.

Zur Analyse des Zielzellsterbens auf Einzelzelebene wurden die jeweiligen Zielzelllinien stabil mit pCasper-basierten FRET-Apoptosesensoren ausgestattet (Backes et al., 2018). Abhängig von der Zelllinie kamen unterschiedliche pCasper-Varianten und Generierungsstrategien zum Einsatz (Tabelle 7: pCasper Zielzellen).

Die lentivirale Generierung von Luc2-pCasper-Zelllinien (u. a. K562-Luc2-pCasper, NALM-6-Luc2-pCasper und WSU-DLBCL2-Luc2-pCasper) erfolgte wie von Zöphel et al. (2024) beschrieben. Zelllinien, die über das Sleeping-Beauty-System stabilisiert wurden (SB-pCasper), basieren auf der Generierung gemäß Kaschek et al. (2026), wobei pCasper-

Kapitel 2 Material und Methoden

Minicircle- oder transposonbasierte Konstrukte eingesetzt wurden. Die plasmidbasierte Transfektion zur Generierung von Jurkat E6.1-pCasper erfolgte wie von Backes et al. (2018) beschrieben. Alle Zelllinien wurden bei 37 °C und 5 % CO₂ in RPMI-1640-Medium kultiviert, ergänzt mit 10 % fetalem Kälberserum (FBS) und 1 % Penicillin/Streptomycin. Für Jurkat-pCasper-Zellen wurde G418 (0,8 mg/ml) als Selektionsantibiotikum zugesetzt. Die Zielzelllinien wurden standardmäßig mit dem Zellzählgerät Z2 gezählt.

Tabelle 7: pCasper Zielzellen

Zelllinie	Konstrukt	Methode	Verwendeter Klon
K562	Luc2-pCasper	lentiviral	Klon G4
K562	SB-pCasper	Sleeping Beauty	Klon 43
NALM-6	Luc2-pCasper	lentiviral	Klon F7
WSU-DLBCL2	Luc2-pCasper	lentiviral	Klon F6
Jurkat E6.1	pCasper	Plasmid-Transfektion	Klon 8C4
Jurkat E6.1	MC-pCasper	Minicircle mit Sleeping Beauty	Population
TMD8	MC-pCasper	Minicircle mit Sleeping Beauty	K4.23

Das pCasper-Konstrukt besteht aus einem GFP und einem RFP, die über die Caspase-spaltbare Linkersequenz DEVD miteinander verbunden sind (Abbildung 2). In lebenden Zellen liegen beide Fluorophore räumlich eng beieinander, sodass nach Anregung von GFP ein Förster-Resonanzenergietransfer (FRET) auf RFP stattfinden kann. In der Überlagerung aus GFP-, FRET- und Durchlichtsignal erscheinen lebende Zellen dadurch orange. Während der Apoptose wird die DEVD-Sequenz durch Caspasen gespalten. Dadurch werden GFP und RFP räumlich voneinander getrennt, das FRET-Signal nimmt ab und die Zelle erscheint grün. Bei nekrotischen Zellen geht die Fluoreszenz weitgehend verloren, da mit dem Verlust der Membranintegrität auch eine Verdünnung des Konstrukts im Extrazellulärraum einhergeht.

Das pCasper-Konstruktes wurde in mehreren Publikationen verwendet und optimiert (D. Zöphel et al., 2023; S. Zöphel et al., 2024).

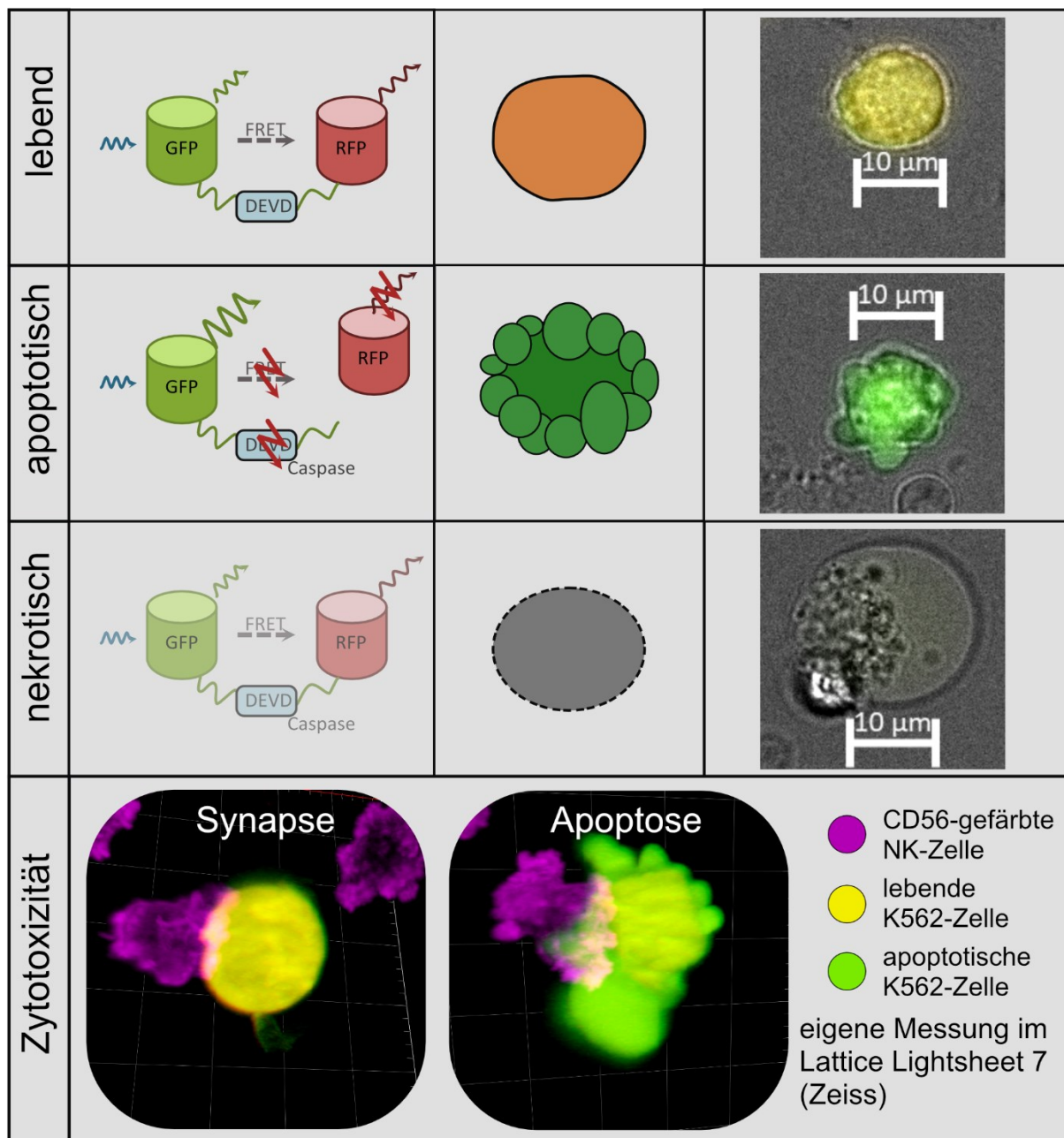


Abbildung 2: Funktionsweise des pCasper-Konstrukts

Dargestellt ist die Funktionsweise des pCasper-Konstrukts in Zielzellen. Die drei oberen Zeilen zeigen jeweils den Zustand lebender, apoptotischer und nekrotischer Zielzellen. Links ist schematisch das pCasper-Konstrukt mit GFP und RFP dargestellt, die über die Caspase-spaltbare DEVD-Sequenz verbunden sind. In lebenden Zellen kann FRET stattfinden; während der Apoptose wird die DEVD-Sequenz durch Caspasen gespalten, wodurch das FRET-Signal abnimmt; bei Nekrose geht die Fluoreszenz durch Verlust der Membranintegrität weitgehend verloren. In der mittleren Spalte ist jeweils der erwartete Phänotyp der Zielzelle in der Überlagerung aus GFP-, FRET- und Durchlichtsignal schematisch dargestellt. Rechts sind repräsentative Beispielaufnahmen pCasper-exprimierender Zielzellen gezeigt. Die untere Zeile zeigt 3D-Rekonstruktionen einer CD56-markierten NK-Zelle (magenta) in Kontakt mit einer K562-pCasper-Zielzelle im Lattice Lightsheet 7 (Zeiss). Links ist die Ausbildung der immunologischen Synapse, rechts eine apoptotische Zielzelle dargestellt.

2.2.5 Färbung von NK-Zellen

Beladung mit ratiometrischen Ca^{2+} -Farbstoffen

Zur Messung intrazellulärer Ca^{2+} -Signale wurden primäre NK-Zellen mit ratiometrischen Calciumfarbstoffen beladen. Die jeweiligen Fura-Indikatoren wurden als 1 mM Stammlösung in DMSO hergestellt, aliquotiert und bis zur Verwendung bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

Für die Beladung wurden die NK-Zellen in PBS mit 0,5 % BSA resuspendiert und mit den jeweiligen Farbstoffen in folgenden Endkonzentrationen inkubiert: Fura-2 AM und Fura-PE3 AM mit $2\text{ }\mu\text{M}$, Fura-8 AM und Fura-10 AM mit $0,5\text{ }\mu\text{M}$ sowie Fura-Red AM mit $1\text{ }\mu\text{M}$. Die Zellen wurden für 20 Minuten bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ inkubiert, um eine effiziente intrazelluläre Aufnahme der Farbstoffe zu gewährleisten. Nach der Inkubation wurden die Zellen zweimal gewaschen, um überschüssigen Farbstoff zu entfernen und anschließend in dem für das jeweilige Experiment vorgesehenen Medium resuspendiert.

Für funktionelle Ca^{2+} -Messungen während der NK-zellvermittelten Zytotoxizität in primären NK-Zellen, CD19-CAR NK-Zellen und nicht-transduzierten NK-Zellen wurde im weiteren Verlauf der Arbeit $1\text{ }\mu\text{M}$ Fura-10 eingesetzt.

Fluoreszenzmarkierung und CAR-Detektion

Zur Identifikation, Visualisierung und Unterscheidung von CD19-CAR NK-Zellen und nicht-transduzierten NK-Zellen wurden die Zellen vor ausgewählten Experimenten fluoreszenzmarkiert. Die Färbung erfolgte abhängig vom experimentellen Setup entweder zur Detektion der CAR-Expression, zur allgemeinen Zellmarkierung oder zur Membranvisualisierung.

Für die Detektion der CD19-CAR-Expression wurden NK-Zellen in PBS mit 0,5 % BSA resuspendiert. Pro Ansatz wurden $0,175 \times 10^6$ NK-Zellen in $100\text{ }\mu\text{l}$ Färbepuffer mit $2\text{ }\mu\text{l}$ eines biotinylierten Anti-CD19-CAR-Antikörpers inkubiert. Die Inkubation erfolgte für 10 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln. Nach einem Waschschrift wurden die Zellen in $350\text{ }\mu\text{l}$ PBS mit 0,5 % BSA resuspendiert und mit einem PE-konjugierten Anti-Biotin-Antikörper ($7\text{ }\mu\text{l}$ pro Ansatz) für 30 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurden die Zellen erneut gewaschen und in AIM-V-Medium resuspendiert.

Beladung mit Zelltrackerfarbstoff

Zur allgemeinen Visualisierung der NK-Zellen wurden diese mit Deep Red, einem fluoreszierenden Zelltrackerfarbstoff, markiert. Hierzu wurde der Farbstoff in einer Endkonzentration von $2\text{ }\mu\text{M}$ während der sekundären Antikörperinkubation zugegeben. Für

Kapitel 2 Material und Methoden

hochauflösende Live-Cell-Imaging-Experimente wurde eine zusätzliche Membranfärbung mit einem APC-konjugierten Anti-CD56-Antikörper durchgeführt. Die Inkubation erfolgte für 30 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln, gefolgt von einem Waschschrift in AIM-V-Medium.

2.2.6 Analysen im Plattenlesegerät

Alle fluorometrischen Messungen in Populationen wurden in einem CLARIOstar Plattenlesegerät durchgeführt. Es ermöglicht temperatur- und CO₂-kontrollierte Messungen sowie spektrale Anregungs- und Emissionsscans mit frei wählbaren Bandbreiten. Sämtliche Messungen erfolgten bei 37 °C, 5 % CO₂ und im Bottom-Reading-Modus unter Verwendung eines Spiral-Scans, um eine möglichst homogene Erfassung der Fluoreszenz über den gesamten Wellboden zu gewährleisten.

Sofern nicht anders angegeben, wurden pro Bedingung Duplikate oder Triplikate gemessen und für die Analyse gemittelt.

Spektrale Charakterisierung von Fura-Calciumfarbstoffen

Zur spektralen Charakterisierung der verschiedenen ratiometrischen Calciumindikatoren wurden primäre NK-Zellen mit den jeweiligen Fura-Farbstoffen beladen und in schwarzen 96-Well-Platten in einer Zelldichte von 250.000 Zellen/ml ausgesät. Ziel dieser Messungen war die Bestimmung der Anregungs- und Emissionsspektren der einzelnen Farbstoffe unter definierten Calcium-Bedingungen. Hierzu wurden drei experimentelle Bedingungen eingesetzt, die unterschiedliche intrazelluläre Calciumzustände repräsentieren. Zur Messung bei physiologischer extrazellulärer Calciumkonzentration wurde eine Lösung mit 0,5 mM CaCl₂ verwendet. Zur Erzeugung eines minimalen intrazellulären Calciumzustands wurde Calcium durch Zugabe von 1 mM EGTA chelatiert, während gleichzeitig 1 µM Thapsigargin und 4 µM Ionomycin eingesetzt wurden. Thapsigargin hemmt die SERCA-Pumpe und führt zur Entleerung intrazellulärer Calcium-Speicher, während Ionomycin als Calcium-Ionophor den passiven Calciumtransport über biologische Membranen ermöglicht. Zur Erzeugung einer möglichst hohen [Ca²⁺]_{int} wurden 20 mM CaCl₂ in Kombination mit Thapsigargin und Ionomycin eingesetzt.

Die spektralen Messungen erfolgten durch Anregungs- und Emissionsscans mit einer Schrittweite von 1 nm und Bandbreiten zwischen 8 und 20 nm. Die jeweils verwendeten Wellenlängenbereiche für die einzelnen Fura-Farbstoffe sind in Tabelle 8 dargestellt. Pro

Kapitel 2 Material und Methoden

Experiment wurden ein bis drei unabhängige Messungen durchgeführt, für die weitere Analyse gemittelt und auf die maximale gemessene Fluoreszenz normiert.

Tabelle 8: Messung von Anregungs- und Emissionsspektrum im Plattenlesegerät

Notiert sind die genutzten Anregungs- und Emissions-Wellenlängen sowie die Breite (übernommen aus Kaschek et al. (2026))

Farbstoff	Anregungs (Ex) Scan (nm)	Emission (Em) Scan (nm)
Fura-2 und Fura-PE3	Ex: 320/8 - 450/8, Em: 510/20	Ex: 360/16, Em: 400/12 - 600/12
Fura-8 und Fura-10	Ex: 340/10 - 490/10, Em: 522/16	Ex: 360/16, Em: 450/10 - 650/10
Fura-Red	Ex: 320/10 - 600/10, Em: 660/16	Ex: 448/16, Em: 480/10 - 740/10

Messung der Fluoreszenzabnahme

Zur Untersuchung der zeitabhängigen Fluoreszenzabnahme der verschiedenen Fura-Calciumfarbstoffe wurde die Fluoreszenz farbstoffbeladener NK-Zellen über einen längeren Zeitraum im Plattenlesegerät gemessen. Hierzu wurden 250.000 NK-Zellen pro Well in schwarzen 96-Well-Platten ausgesät. Die Messungen erfolgten über einen Zeitraum von bis zu 12 Stunden, um die Photostabilität der einzelnen Farbstoffe unter kontinuierlicher Anregung zu vergleichen.

Die Anregungs- und Emissionsparameter wurden entsprechend den zuvor bestimmten spektralen Eigenschaften der jeweiligen Farbstoffe gewählt. Fura-2 AM und Fura-PE3 AM wurden bei einer Anregung von 360/20 nm und einer Emission von 500/20 nm gemessen. Fura-8 AM und Fura-10 AM wurden bei 380/20 nm angeregt und ebenfalls bei 500/20 nm detektiert, während Fura-Red AM bei 450/20 nm angeregt und bei 660/20 nm emittiert wurde. Die Fluoreszenz wurde alle 10 Minuten über insgesamt 710 Minuten gemessen.

Zytotoxizitätsassay mit Calcein-AM

Die populationsbasierte Bestimmung der NK-zellvermittelten Zytotoxizität erfolgte mittels eines Calcein-AM-Freisetzungssassays, wie zuvor beschrieben (Kummerow et al., 2014). Zielzellen (K562, NALM-6 oder WSU-DLBCL2) wurden hierzu für 20 Minuten bei Raumtemperatur mit 500 nM Calcein-AM in AIM-V-Medium beladen. Nach der Beladung wurden die Zellen einmal gewaschen, um überschüssigen Farbstoff zu entfernen und anschließend in schwarzen 96-Well-Platten mit transparentem Boden in einer Dichte von $2,5 \times 10^4$ Zellen pro Well in einem Gesamtvolumen von 200 μ l ausgesät.

NK-Zellen wurden unmittelbar vor Messbeginn zugegeben und in definierten Effektor-zu-Zielzell-Verhältnissen mit den Zielzellen kokultiviert.

Kapitel 2 Material und Methoden

NK-Zellen wurden je nach experimentellem Ansatz entweder ungefärbt eingesetzt oder vor der Kokultivierung gemäß den oben beschriebenen Protokollen mit Fura-Farbstoffen oder einem Antikörper gegen die CD19-CAR-Expression gefärbt.

Zusätzlich zu den eigentlichen Zytotoxizitäts-Bedingungen wurden Kontrollen ohne Zellen (nur Medium) zur Bestimmung der Hintergrundfluoreszenz, Lebendkontrollen ohne Zugabe von NK-Zellen sowie Totkontrollen durch vollständige Zelllyse mittels Triton X-100 oder Tergitol mitgeführt. Die Fluoreszenz wurde über einen Zeitraum von vier Stunden alle zehn Minuten gemessen, um die zeitabhängige Abnahme der Calcein-Fluoreszenz als Maß für die Zielzelllyse zu erfassen. Die Anregung erfolgte bei 482/16 nm, die Emission wurde bei 530/40 nm detektiert.

Die Lyse berechnet sich nach folgender Formel:

$$Lyse_t (\%) = \frac{F_t - (T_t * I)}{I * (L_t - T_t)}$$

Mit

F_t : Fluoreszenz zum Zeitpunkt t

T_t : Fluoreszenz der Totkontrolle zum Zeitpunkt t

L_t : Fluoreszenz der Lebendkontrolle zum Zeitpunkt t

I_0 : Index, berechnet als $I_0 = \frac{F_0}{L_0}$

Die Auswertung der Zytotoxizitätsdaten erfolgte automatisiert mithilfe eines selbst programmierten MATLAB-Skripts (Quellcode ist im Anhang hinterlegt). Hierzu wurden sowohl die Rohdaten des Plattenlesegeräts als auch die jeweilige Plattenbelegung in Form von Excel-Tabellen eingelesen. Das Skript erkennt technische Duplikate oder Triplikate automatisch, zieht die Hintergrundfluoreszenz ab und berechnet für jede Bedingung die normierte Fluoreszenz, die prozentuale Zielzelllyse sowie die maximale Lyserate. Zusätzlich werden Abweichungen zwischen technischen Replikaten detektiert und entsprechend gekennzeichnet. Als Ergebnis werden graphische Darstellungen der zeitabhängigen prozentualen Lyse generiert. Der vollständige Quellcode des Programms ist im Anhang dieser Arbeit aufgeführt.

2.2.7 Ca^{2+} Messungen im Cell-Observer

Intrazelluläre Ca^{2+} -Messungen im Einzelzellformat wurden an einem Zeiss Cell Observer Mikroskop durchgeführt, das mit einer Colibri-LED-Lichtquelle und einer Evolve-EMCCD-Kamera ausgestattet ist. Die Experimente wurden bei 37 °C und 5 % CO_2 durchgeführt. Zur gezielten Manipulation der extrazellulären Ca^{2+} -Konzentration wurden Ringer-Lösungen mit verschiedener Ca^{2+} -Konzentration eingesetzt, die über eine Perfusionskammer appliziert wurden. Der Austausch der Lösungen erfolgte manuell mittels Spritze. Die Perfusionskammer ist so konstruiert, dass kein Absaugen an den Zellen erfolgte, sondern die jeweilige Lösung langsam eingebracht wurde, um mechanische Belastung und Zellverlust zu minimieren.

Für die Ca^{2+} -Messungen im Cell Observer wurden runde Glasdeckgläser mit einem Durchmesser von 25 mm verwendet. Zur Förderung der Zelladhärenz wurden die Deckgläser mit 50 μl einer 0,1 mg/ml Poly-L-Ornithin-Lösung beschichtet und für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Für die Experimente wurden 1×10^5 farbstoffbeladene NK-Zellen in 5 μl AIM-V-Medium auf die beschichteten Deckgläser pipettiert und für 30 Minuten inkubiert. Nach der Adhärenzphase wurden die Deckgläser in die Perfusionskammer des Mikroskops eingesetzt und anschließend unmittelbar für die Ca^{2+} -Messungen verwendet.

Charakterisierung der Fura-Indikatoren unter definierten Ca^{2+} -Bedingungen im Cell Observer bei variierender Belichtung

Zur Charakterisierung der ratiometrischen Fura-Signale unter niedrigen und hohen intrazellulären Ca^{2+} -Bedingungen wurden farbstoffbeladene NK-Zellen sequentiell mit definierten Ca^{2+} -Pufferlösungen perfundiert. Zunächst wurden die Zellen mit einer Lösung mit 0,5 mM CaCl_2 verwendet, um basale Ca^{2+} -Signale zu erfassen. Anschließend erfolgte eine Perfusion mit einer Ca^{2+} -freien Lösung, die 1 mM EGTA, 1 μM Thapsigargin und 4 μM Ionomycin enthielt, um stark reduzierte intrazelluläre Ca^{2+} -Signale zu erzeugen. Diese Phase wurde für 5 Minuten durchgeführt. Abschließend wurde eine Lösung mit 20 mM CaCl_2 in Kombination mit 1 μM Thapsigargin und 4 μM Ionomycin appliziert und für 10 Minuten gemessen, um hohe intrazelluläre Ca^{2+} -Signale zu induzieren. Thapsigargin hemmt die SERCA-Pumpe und verhindert so, dass Ca^{2+} zurück in intrazelluläre Speicher gepumpt wird. Ionomycin transportiert Ca^{2+} durch biologische Membranen und erleichtert so den Ausgleich von Ca^{2+} über Membranen hinweg. Beide Substanzen wurden sowohl unter Ca^{2+} -freien als auch unter Ca^{2+} -reichen Bedingungen eingesetzt, um die zelluläre Ca^{2+} -Regulation weitgehend zu

Kapitel 2 Material und Methoden

umgehen und definierte minimale beziehungsweise maximale intrazelluläre Ca^{2+} -Zustände zu erzeugen.

Für die mikroskopische Messung ratiometrischer Fura-Signale wurden die jeweiligen Anregungs- und Emissionseinstellungen farbstoffspezifisch gewählt. Die verwendeten LED-Wellenlängen, Intensitäten, Belichtungszeiten, Beam-Splitter sowie Emissionsfilter sind in Tabelle 9 zusammengefasst.

Tabelle 9: Anregungs- und Emissionseinstellungen für Ca^{2+} Imaging im Cell Observer
(übernommen aus Kaschek et al. (2026))

Farbstoff	Anregung Ch1 LED (Intensität, Anregungszeit) + Filter	Anregung Ch2 LED (Intensität, Anregungszeit) + Filter	Ch1:Ch2	Beam- splitter (BS)	Emissionsfilter
Fura-2 and Fura-PE3	365 nm LED (80 %, 2–300 ms) + 340/30 nm Filter	380 nm LED (30 %, 1–150 ms) + 380/10 nm Filter	2:1	BS 409 nm	510/90 nm
Fura-8 and Fura-10	365 nm LED (8 %, 0,15–60 ms) + 370/10 nm Filter	420 nm LED (8 %, 0,5–200 ms)	1:3,3	BS 458 nm	510/90 nm
Fura-Red	420 nm LED (30 %, 0,2–60 ms) + 427/15 nm Filter	505 nm LED (30 %, 1–300 ms) + 504/17 nm filter	1:5	BS 440, 520, 607 nm	464/18 nm, 542/18 nm, 639/30 nm

Analyse der Ca^{2+} -Daten aus dem Cell-Observer

Die Auswertung der ratiometrischen Ca^{2+} -Messungen basiert auf der Berechnung eines Fura-Verhältnisses (Fura-Ratio) aus zwei Anregungskanälen. Die Analyse erfolgte in zwei komplementären Auswerteansätzen.

Beim ersten Auswerteansatz wurde das Fura-Ratio zwischen den Kanälen pixelweise berechnet. Hierfür wurde die Bildanalyseplattform ImageJ/Fiji verwendet, wobei das Plugin „Ratio NaN“ eingesetzt wurde¹. Vor der Ratio-Berechnung wurde für jeden Kanal ein Hintergrundwert bestimmt. Hierzu wurden pro Bild zwei Hintergrund-Regionen (ROI) in zellfreien Bereichen definiert und deren mittlere Intensität als Hintergrundsignal verwendet. Zusätzlich wurde die Standardabweichung der Hintergrund-ROIs bestimmt. Für die Ratio-Berechnung im Plugin „Ratio NaN“ wurde ein Clipping-Schwellenwert definiert, der dem Hintergrundsignal plus zweimal der Standardabweichung entsprach. Pixelwerte unterhalb dieses Schwellenwertes

¹ <https://imagej.net/ij/plugins/ratio-plus.html>

Kapitel 2 Material und Methoden

wurden von der Ratio-Berechnung ausgeschlossen, um Artefakte durch sehr geringe Intensitäten und Rauschen zu vermeiden. Das ratiometrische Bild wurde als Verhältnis Kanal 1 zu Kanal 2 berechnet und für die Visualisierung mit einer einheitlichen Skala dargestellt. Aus diesem Ratio-Bild konnten dann mittels ROI die Ratiowerte jeder Zelle zu jedem Zeitpunkt bestimmt werden.

Beim zweiten Ansatz erfolgte zunächst die Bestimmung der Fluoreszenzintensitäten. Hierbei wurden für jede Zelle zu jedem Zeitpunkt manuell Zell-ROIs definiert und die mittlere Fluoreszenzintensität innerhalb der ROI getrennt für beide Anregungskanäle bestimmt. Der Hintergrund wurde kanalweise abgezogen, indem das jeweilige Hintergrundsignal von der mittleren Zellintensität subtrahiert wurde. Anschließend wurde für jede Zelle und jeden Zeitpunkt das Fura-Ratio als Quotient der mittleren Hintergrund-korrigierten Intensitäten von Kanal 1 und Kanal 2 berechnet. Dieser Ansatz liefert pro Zelle eine Ratio-Zeitreihe und ist weniger empfindlich gegenüber Pixelrauschen als rein pixelbasierte Verfahren.

Zur Beurteilung des nutzbaren Signalbereichs der einzelnen Fura-Indikatoren unter den im Cell Observer verwendeten Bedingungen wurde ein dynamischer Bereich bestimmt. Hierzu wurden die Ratio-Werte unter niedrigen Ca^{2+} -Bedingungen (Perfusion mit 0 mM Ca^{2+} sowie Thapsigargin/Ionomycin) durch die Ratio-Werte unter hohen Ca^{2+} -Bedingungen (Perfusion mit 20 mM Ca^{2+} mit Thapsigargin/Ionomycin) geteilt.

Für die pixelbasierte Analyse wurde sowohl der dynamische Bereich jeder einzelnen Zelle (Pixel-Ratio) bestimmt, als auch der dynamische Bereich aus dem Mittelwert der Fura-Ratios der Ca^{2+} -hohen und der Ca^{2+} -niedrigen Bedingung (gemitteltes Pixel-Ratio). Der dynamische Bereich bei der fluoreszenzbasierten Analyse wurde nur über die Mittelwerte berechnet (Fluoreszenz-Ratio). Zur Optimierung und Vergleichbarkeit der Belichtungsparameter diente das Signal-zu-Hintergrund-Verhältnis, definiert als Verhältnis der mittleren Zell- zur Hintergrundintensität, als Entscheidungskriterium für geeignete Belichtungszeiten.

2.2.8 Phototoxizitätsmessungen im Cell-Observer

Zur Untersuchung möglicher phototoxischer Effekte der verwendeten Fura-Indikatoren wurden Kokulturen aus NK-Zellen und E6.1-pCasper-Zielzellen in 96-Well-Platten angelegt. Das Effektor-zu-Zielzell-Verhältnis betrug hierbei 3:1 und es wurden 25.000 E6.1-pCasper Zellen pro Well verwendet. NK-Zellen wurden mit den jeweiligen Fura-Farbstoffen beladen und mit den zuvor bestimmten optimalen Belichtungszeiten (Signal-zu-Hintergrund-Verhältnis > 2) aufgenommen. Die verwendeten Anregungs- und Emissionsparameter für die Phototoxizitätsassays sind in Tabelle 10 zusammengefasst.

Kapitel 2 Material und Methoden

Während eines Beobachtungszeitraums von 3,5 Stunden wurde ratiometrisches Fura-Imaging im Minutenintervall durchgeführt. Zusätzlich wurden pCasper-Fluoreszenzsignale sowie Durchlichtbilder alle 30 Minuten aufgenommen, um die NK-zellvermittelte Zytotoxizität zu erfassen. Als Kontrolle dienten nicht gefärbte und nicht exponierte NK-Zellen des selben Spenders. In den Kontrollbedingungen wurde das Zielzellsterben ausschließlich anhand der pCasper-Fluoreszenz alle 30 Minuten quantifiziert. Ausgewertet wurde, wie viele Zielzellen zu jedem Zeitpunkt gestorben waren. Dies wurde manuell anhand der pCasper-Fluoreszenz analysiert.

Tabelle 10: Anregungs- und Emissionsparameter für Phototoxizitätsassays
(übernommen aus Kaschek et al. (2026))

Farbstoff	Anregung Ch1 LED (Intensität, Anregungszeit) + Filter	Anregung Ch2 LED (Intensität, Anregungszeit) + Filter	Beam-splitter (BS)	Emissionsfilter
Fura-2	365 nm LED (80 %, 140 ms) + 340/30 nm filter	380 nm LED (30 %, 70 ms) + 387/11 nm filter	BS 409 nm	510/90 nm
Fura-8	365 nm LED (8 %, 12 ms) + 370/10 nm filter	420 nm LED (8 %, 40 ms)	BS 458 nm	510/90 nm
Fura-10	365 nm LED (8 %, 4,5 ms) + 370/10 nm filter	420 nm LED (8 %, 15 ms)	BS 458 nm	510/90 nm
Fura-Red	420 nm LED (30 %, 35 ms) + 427/15 nm filter	505 nm LED (30 %, 175 ms) + 504/17 nm	BS 440 nm, 520 nm, 607 nm	464/18 nm, 542/18 nm, 639/30 nm
GFP	470 nm LED (5 %, 20 ms) + 470/40 nm		BS 495 nm	525/50 nm
RFP-FRET	470 nm LED (5 %, 50 ms) + 470/40 nm		BS 593 nm	630/75 nm

2.2.9 Analyse des Zielzellsterbens auf Einzelzellebene mittels pCasper im Celldiscoverer 7

Zur Analyse der NK-zellvermittelten Zytotoxizität auf Einzelzellebene wurden pCasper-exprimierende Zielzellen im Celldiscoverer 7 (Zeiss) mittels Live-Cell-Imaging untersucht. Für die Experimente wurden die Zielzellen in schwarzen 384-Well-Platten mit flachem Boden in einer Dichte von 9.000 bis 17.500 Zellen pro Well in 90 µl AIM-V-Medium ausgesät. CD19-CAR NK-Zellen sowie nicht-transduzierte NK-Zellen (NT NK) wurden vor der Kokultur fluoreszenzmarkiert. Die Detektion der CAR-Expression erfolgte wie oben beschrieben mittels biotinyliertem Anti-CD19-CAR-Antikörper und anschließender Färbung mit Anti-Biotin-PE. Zusätzlich wurden NK-Zellen mit einem Deep-Red-Zelltrackerfarbstoff markiert, um eine eindeutige Identifikation der Effektorzellen während der Bildanalyse zu ermöglichen. Nach der Färbung wurden die Zellen gewaschen, in AIM-V-Medium

Kapitel 2 Material und Methoden

resuspendiert und zu den Zielzellen gegeben, sodass ein Effektor-zu-Zielzell-Verhältnis (E:T) von 2:1 erreicht wurde.

Für die quantitative Einzelzell-Analyse wurden Zeitrafferaufnahmen über 4 Stunden mit 1-min-Intervall mit einem Plan-Apochromat 20×/0,95 NA Objektiv mit 1×-Tubuslinse an mehreren Positionen pro Well aufgenommen (37 °C, 5 % CO₂). Pro Zeitpunkt wurden Durchlicht sowie GFP-, RFP-FRET- und Deep-Red-Kanäle aufgenommen. GFP und RFP-FRET wurden jeweils mit einer 470-nm-LED (Ex 450–488 nm; 20 %) angeregt und bei 509 nm (50 ms) bzw. 583 nm (90 ms) detektiert. Deep-Red wurde mit einer 625-nm-LED (Ex 615–648 nm; 10 %) angeregt und bei 662 nm (10 ms) detektiert. Das PE-Signal des anti-CD19-CAR-Antikörpers wurde zusätzlich im RFP-FRET-Kanal erfasst.

Für qualitative hochaufgelöste Visualisierungen wurden ergänzend Zeitrafferaufnahmen über drei Stunden mit 30-s-Intervall durchgeführt (Plan-Apochromat 50×/1,2 NA Wasserimmersion mit 2×-Tubuslinse; Gesamtvergrößerung 100×). Hierfür wurden NK-Zellmembranen zusätzlich mit APC-konjugiertem Anti-CD56 (Clone HCD56, BioLegend) markiert. Aufgenommen wurden Durchlicht sowie GFP-, RFP-FRET- und APC-Kanäle, wobei GFP und RFP-FRET mit 470 nm (30 %) angeregt und bei 509 nm (150 ms Belichtung) bzw. 583 nm (250 ms Belichtung) detektiert wurden. APC wurde mit 625 nm (40 %; 200 ms) angeregt und bei 660 nm detektiert. Das PE-Signal des anti-CD19-CAR-Antikörpers wurde auch in diesem Setup im RFP-FRET-Kanal miterfasst.

2.2.10 Automatisierte Zellanalyse

Die Auswertung des Zielzellsterbens erfolgte mithilfe des im Labor entwickelten MATLAB-Programms MSparkles zur Segmentierung, Verfolgung und quantitativen Analyse einzelner Zielzellen. Hauptverantwortlich für das Programm ist Gebhard Stopper zusammen mit Joanne Vialle und mir (Stopper*, Vialle*, Kaschek* et al., in Vorbereitung). Das Programm modelliert zunächst das Hintergrundsignal mittels eines polynom-basierten Fits und zieht dieses vom Signal ab. Die Segmentierung der NK- und Zielzellen erfolgte sowohl mit dem Gradient Vector Flow-Algorithmus (G. Li et al., 2008) als auch mit dem Deep-Learning Algorithmus CellPose (Stringer et al., 2021), wobei letzterer ebenfalls einen Gradient Vector Flow-Algorithmus nutzt, das Vektorfeld aber durch DeepLearning-Modelle berechnet wird. Die Segmentierung der Zellen basiert in den Zielzellen auf ihrer pCasper Fluoreszenz (GFP und FRET) und in den NK-Zellen auf Fura-10 (365 nm Anregung). Um Fehldetektionen durch überlagernde Fluoreszenzsignale zu vermeiden, wurde zusätzlich ein HSV-basierter Farbfilter verwendet, der Zellen mit GFP-Signal, jedoch ohne Signal im 365-nm-Kanal, selektiert. Hierfür

Kapitel 2 Material und Methoden

werden den original Fluoreszenzkanälen RGB-Falschfarben zugewiesen. Das daraus entstehende RGB-Bild wird in den HSV-Farbraum konvertiert. Dieser Farbraum besteht aus drei Komponenten, Hue (h), welcher die Farbe als Winkel von 0-360° angibt, Saturation (S) welcher die Farbsättigung steuert, sowie Value (V), welcher die Helligkeit eines Bildpunktes angibt. Dadurch ist es möglich, die Resultierende Farbe aus dem RGB-Falschfarbbild über einen Bandpass-filter (Winkel) einzustellen, und etwaige spektrale Überlagerungen gezielt zu filtern.

Die detektierten Zellregionen (ROIs) wurden anschließend über die gesamte Zeitreihe mittels eines Kalman-Filter-basierten Tracking-Algorithmus verfolgt (Kalman, 1960). Dabei kann die Position einer Zelle in einem zukünftigen Bild anhand vorhergegangener Bewegung (Richtung und Geschwindigkeit) geschätzt werden. Dies erleichtert die Zuweisung einer Detektion zu einem bestehenden Zellpfad und erlaubt gleichzeitig, Fehldetektionen zu überbrücken und zu tolerieren.

Für jede Zielzelle wurden zu jedem Zeitpunkt die pCasper-Fluoreszenzsignale im GFP- und RFP-FRET-Kanal extrahiert. Auf Basis einer Changepoint-Analyse der Fluoreszenzzeitreihen wurden Zustandswechsel im Zeitverlauf detektiert und jede Zielzelle zu jedem Zeitpunkt als lebend, apoptotisch oder nekrotisch klassifiziert. Apoptotischer Zelltod wurde über den Verlust des FRET-Signals mit gleichzeitigem Anstieg des GFP-Signals definiert, während nekrotischer Zelltod durch den Verlust des intrazellulären Reportersignals (Abfall der Gesamtfluoreszenz) bestimmt wurde. Die resultierenden Zellzustände wurden anschließend zur Berechnung zeitabhängiger Anteile lebender, apoptotischer und nekrotischer Zielzellen verwendet (Stopper*, Vialle*, Kaschek* et al., in Vorbereitung).

Darüber hinaus analysiert MSparkles Zell-Zell-Kontakte zwischen NK- und Zielzellen. Ein Zellkontakt wird definiert, wenn die Distanz zwischen zwei Zellen einen Minimalwert unterschreitet.

2.2.11 Parallele Messung von Ca^{2+} Signalen mittels Fura-10 und Apoptose-Sensor pCasper im Celldiscoverer 7

Die simultane Erfassung intrazellulärer Ca^{2+} -Signale in NK-Zellen und des Zielzellsterbens wurde mit dem automatisierten Live-Cell-Imaging-System Celldiscoverer 7 durchgeführt. Alle Experimente erfolgten bei 37 °C und 5 % CO_2 in schwarzen 384-Multiwell-Platten mit flachem Boden.

Kapitel 2 Material und Methoden

Für die Fura-10 Färbung wurden 150.000 NK-Zellen in 500 µl PBS + 0,5 % BSA mit 1 µM Fura-10 AM für 20 Minuten bei 37 °C im Dunklen inkubiert. Anschließend wurden die Zellen zweimal gewaschen und in 200 µl AIM-V Medium resuspendiert.

Als Zielzellen wurden stabil pCasper-exprimierende Zelllinien eingesetzt. Sofern nicht anders angegeben, wurden 10.000 Zielzellen pro Well in 70 µl AIM-V ausgesät und nach dem Absetzen mit 15.000 NK-Zellen in 20 µl in Kokultur gebracht. Es wurde dementsprechend ein Effektor-zu-Zielzell-Verhältnis von 1,5:1 verwendet.

Zur gleichzeitigen Erfassung der Ca^{2+} -Signale und der pCasper-basierten Zielzellsterbe-Phänotypen wurden in jedem Zeitrafferexperiment die Fura-10-Anregungen bei 365 nm und 420 nm sowie die pCasper-Fluoreszenzkanäle (GFP und FRET/RFP) aufgenommen. Die LED-Intensitäten, Belichtungszeiten und verwendeten Emissionsfilter sind in Tabelle 11 zusammengefasst.

Tabelle 11: Anregungs- und Emissionsspektren am Celldiscoverer 7

Die Werte wurden so gewählt, dass Ca^{2+} -Signaling via Fura-10 parallel zu Zelltoduntersuchungen via pCasper gemessen werden kann (übernommen aus Kaschek et al. (2026))

Farbstoff		Anregung	Emissionsfilter
Fura-10	Ex. 365 nm	365 nm LED, 7 %, 150 ms	514 /26 nm
	Ex. 420 nm	420 nm LED, 12 %, 300 ms	514 /26 nm
pCasper 3GR	Em. GFP	470 nm LED, 10 %, 120 ms	514 /26 nm
	Em. FRET	470 nm LED, 10 %, 150 ms	592/18 nm

Die Zeitrafferaufnahmen wurden mit einem Plan-Apochromat-Objektiv (20×/0,95 NA) in Kombination mit einer 2×-Tubuslinse durchgeführt, was einer Gesamtvergrößerung von 40× entspricht. Die Bildakquisition erfolgte über einen Zeitraum von 2 Stunden mit einem Aufnahmeintervall von 30 Sekunden. Pro Zeitpunkt wurden Durchlicht sowie die Fura-10- und pCasper-Fluoreszenzkanäle aufgenommen.

Analyse von Ca^{2+} in primären NK-Zellen

Zur Untersuchung der Ca^{2+} -Signale primärer NK-Zellen unter definierten funktionellen Bedingungen wurden Live-Cell-Imaging-Experimente im Celldiscoverer 7 wie oben beschrieben durchgeführt.

Zur Analyse der vom Abtötungs-Phänotyp abhängigen Ca^{2+} -Signale wurden primäre NK-Zellen wie beschrieben mit Fura-10 beladen und anschließend in einem Verhältnis von 1,5:1 mit den Zielzellen K562 gemessen.

Kapitel 2 Material und Methoden

Darüber hinaus wurden primäre NK-Zellen vor der Kokultur mit Zielzellen mit Concanamycin A (CMA) behandelt, um Perforin-abhängige Zytotoxizität funktionell zu inhibieren. Hierzu wurden NK-Zellen für vier Stunden bei 37 °C mit CMA in einer Endkonzentration von 100 nM inkubiert. CMA inhibiert die Perforin-vermittelte Zytotoxizität durch Neutralisierung des sauren Milieus in lytischen Granula, ohne die Zielzellerkennung oder die Ausbildung von NK-Zell-Kontakten zu beeinträchtigen. Nach der Inkubation wurden die Zellen gewaschen und anschließend wie beschrieben mit Fura-10 beladen.

In einem weiteren experimentellen Ansatz wurden Ca^{2+} -Signale primärer NK-Zellen während der Interaktion mit der B-Zell-Lymphom-Zelllinie TMD8 untersucht. Zur Analyse antikörperabhängiger zellvermittelter Zytotoxizität (ADCC) wurden die Experimente sowohl in Abwesenheit als auch in Anwesenheit des anti-CD20-Antikörpers Rituximab durchgeführt. Rituximab wurde den Zielzellen vor Beginn der Kokultur in einer Endkonzentration von 1 μM zugesetzt.

Untersuchung in CAR/NT NK-Zellen

Zur Analyse der Ca^{2+} -Signale in CD19-CAR NK-Zellen und nicht-transduzierten NK-Zellen (NT NK) wurden Live-Cell-Imaging-Experimente im Celldiscoverer 7 unter den oben beschriebenen Bedingungen durchgeführt. Als Zielzellen wurden stabil pCasper-exprimierende K562- und NALM-6-Zelllinien eingesetzt, um CAR-unabhängige beziehungsweise CAR-spezifische NK-Zell-Interaktionen zu untersuchen.

Analyse der Ca^{2+} -Signale aus dem Celldiscoverer 7

Die Auswertung der im Celldiscoverer 7 aufgenommenen Ca^{2+} -Daten erfolgte auf Einzelzellebene durch das im Labor entwickelten MATLAB-Programm MSparkles (Stopper*, Vialle*, Kaschek* et al., in Vorbereitung). Grundlage der Analyse waren die Fluoreszenzsignale der Fura-10-Anregungen bei 370 nm und 420 nm. Für jede einzelne NK-Zelle wurde zu jedem Zeitpunkt die mittlere Fluoreszenzintensität pro Kanal bestimmt und daraus das ratiometrische Ca^{2+} -Signal als Quotient der Fluoreszenzintensitäten (370/420) berechnet.

Im nächsten Schritt wurden die NK-Zellen anhand ihres Interaktionsverhaltens mit Zielzellen klassifiziert. Für jede NK-Zelle wurde manuell bzw. mit Unterstützung von MSparkles bestimmt, ob sie während des Beobachtungszeitraums entweder keinen Kontakt zu einer Zielzelle hatte, lediglich Kontakt ohne Zielzellsterben zeigte oder eine Zielzelle tötete. Bei zytotoxisch aktiven NK-Zellen wurde zusätzlich der Modus des Zielzellsterbens (apoptotisch,

Kapitel 2 Material und Methoden

nekrotisch oder gemischt) anhand der pCasper-Fluoreszenzdynamik und morphologischer Kriterien bestimmt.

Für alle NK-Zellen, die Kontakt mit einer Zielzelle eingingen, wurden die Ca^{2+} -Signale zeitlich auf den Zeitpunkt des initialen Zellkontakts ausgerichtet. Zur Quantifizierung der Ca^{2+} -Dynamik wurde ein Analysefenster von fünf Minuten vor dem Kontakt sowie 20 Minuten nach dem Kontakt definiert. Innerhalb dieses Fensters wurde die basale Ca^{2+} -Konzentration als das minimale Fura-Ratio vor dem Kontakt bestimmt. Die maximale Ca^{2+} -Antwort nach Kontakt wurde als höchster gemessener Fura-Ratio-Wert innerhalb des Analysefensters definiert. Die $\Delta\text{Peak-Ca}^{2+}$ -Amplitude wurde als Differenz zwischen dem maximalen Ca^{2+} -Signal nach Kontakt und der basalen Ca^{2+} -Konzentration berechnet.

Zusätzlich wurde die Abklingzeit des Ca^{2+} -Signals bestimmt. Diese wurde definiert als das Zeitintervall zwischen dem initialen Zellkontakt und dem Zeitpunkt, zu dem das Ca^{2+} -Signal auf $1/e$ der ΔPeak -Amplitude oberhalb der Baseline abgefallen war. Dadurch konnte die zeitliche Dynamik der Ca^{2+} -Antwort unabhängig von ihrer absoluten Höhe verglichen werden.

NK-Zellen ohne Kontakt zu Zielzellen wurden separat analysiert. Für diese Zellen wurde ein zentrales Zeitfenster von 25 Minuten innerhalb der Aufnahme ausgewählt, um ein vergleichbares Maß für basale Ca^{2+} -Signale zu erhalten. Das mittlere Fura-Ratio innerhalb dieses Fensters wurde als basale Ca^{2+} -Aktivität in inaktiven NK-Zellen verwendet und mit den Basalwerten kontaktierender bzw. killender NK-Zellen verglichen.

Alle Ca^{2+} -Parameter wurden anschließend in Abhängigkeit vom Interaktionsverhalten der NK-Zellen sowie vom jeweiligen Zielzelltyp statistisch ausgewertet.

2.2.12 Software

Zur Datenerhebung, -verarbeitung und -auswertung wurden verschiedene spezialisierte Softwarelösungen eingesetzt.

Der Celldiscoverer 7 wird mit der Software Zen 3 (Version 3.11) betrieben, der Cell Observer mit Zen 3 (Version 3.1). Fluoreszenzbasierte Messungen im Plattenlesegerät wurden mit der CLARIOstar-Software MARS durchgeführt.

Die Analyse von Durchflusszytometrie-Daten erfolgte mit FlowJo Software Version 10.8.1 (BD Biosciences, USA).

Die Weiterverarbeitung, automatisierte Analyse und Visualisierung von Einzelzell-Zeitreihendaten aus Live-Cell-Imaging-Experimenten sowie die Auswertung von

Kapitel 2 Material und Methoden

Plattenleserdaten wurden mithilfe von Programmen und Skripten in MATLAB (Version 2024b; MathWorks, USA) durchgeführt. Ergänzend wurde ImageJ/Fiji (National Institutes of Health, USA) und Zen3 (Version 3.6) zur Bildverarbeitung, Segmentierung oder Erstellung ratiometrischer Darstellungen verwendet.

Die statistische Analyse der Daten erfolgte mit GraphPad Prism Version 10 (GraphPad Software Inc., USA). Tabellenkalkulation, Datenorganisation sowie unterstützende Berechnungen wurden mit Microsoft Excel durchgeführt; Textverarbeitung und Manuskripterstellung erfolgten mit Microsoft Word (Microsoft Corporation, USA). Die Erstellung und Nachbearbeitung von Abbildungen für die Dissertation und Publikationen wurde mit Affinity Designer (Serif Ltd., UK) durchgeführt.

Zur sprachlichen Überarbeitung und stilistischen Glättung einzelner Textpassagen dieser Dissertation wurde das KI-gestützte Sprachmodell ChatGPT 5.2 (OpenAI) verwendet. Die Nutzung beschränkte sich ausschließlich auf die sprachliche Optimierung bereits inhaltlich vollständig ausgearbeiteter Textabschnitte.

Die Konzeption der Experimente, die Durchführung der Versuche, die Datenauswertung, die statistische Analyse, die Interpretation der Ergebnisse sowie die wissenschaftliche Einordnung und Diskussion erfolgten vollständig eigenständig, sofern nicht anders angegeben. Für sämtliche Inhalte dieser Dissertation übernehme ich die alleinige Verantwortung.

2.2.13 Statistische Analysen

Alle Daten werden als Mittelwert $\pm$ Standardabweichung (SD) dargestellt, sofern nicht anders in der Abbildung angegeben. Die Anzahl der analysierten Zellen oder unabhängigen Experimente beziehungsweise Zellen (n) und der biologischen Spender (N) ist jeweils in den entsprechenden Abbildungslegenden angegeben.

Zur Überprüfung der Normalverteilung wurde der Shapiro–Wilk-Test angewendet. Für den Vergleich zweier Gruppen wurden gepaarte Student's *t*-Tests für normalverteilte Daten verwendet oder Wilcoxon-Tests bei nicht normalverteilten Daten angewendet. Für Vergleiche mehrerer Gruppen kamen einfaktorielle Varianzanalysen mit Messwiederholung (RM one-way ANOVA) zum Einsatz, ungepaart sowie ohne Annahme einer Normalverteilung (Kruskal-Wallis Test). Gruppierte Analysen wurden mittels zweifaktorieller Varianzanalyse (two-way ANOVA) durchgeführt, wobei keine gepaarte Analyse und keine Normalverteilung angenommen wurden.

Kapitel 2 Material und Methoden

Post-hoc-Analysen wurden ausschließlich dann durchgeführt, wenn ein insgesamt statistisch signifikanter Effekt vorlag. Ein p -Wert $< 0,05$ wurde als statistisch signifikant betrachtet. Die Signifikanzniveaus sind wie folgt angegeben: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

3 Ergebnisse

Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung der Dynamik intrazellulärer Calcium (Ca^{2+})-Signale in natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) während der Interaktion mit Zielzellen auf Einzelzellebene. Hierfür wurde ein Live-Cell-Imaging-Ansatz etabliert, der die simultane Erfassung von Ca^{2+} -Signalen in NK-Zellen und des Zielzellsterbens ermöglicht.

Die Ergebnisse gliedern sich in drei Abschnitte: Zunächst wurde ein geeignetes ratiometrisches Calcium-Indikatorsystem für primäre humane NK-Zellen etabliert. Anschließend wurden Ca^{2+} -Signale in primären NK-Zellen während der Interaktion mit verschiedenen Zielzelllinien untersucht und mit unterschiedlichen Formen des Zielzellsterbens korreliert. Im dritten Abschnitt wurde derselbe Ansatz genutzt, um Calcium-Signale in der CAR-vermittelten Zytotoxizität zu untersuchen

3.1 Etablierung von Fura-10 als Calcium-Sensor in primären humanen NK-Zellen

Ca^{2+} ist ein entscheidender Regulator von NK-Zellen und spielt insbesondere bei ihrer Zytotoxizität eine wichtige Rolle. Zur Analyse intrazellulärer Ca^{2+} -Signale werden häufig ratiometrische Fluoreszenzindikatoren verwendet, wobei Fura-2 der verbreitetste Standard ist. Bei ratiometrischen Ca^{2+} -Indikatoren, zu denen die Fura-Farbstoffe gehören, wird die Fluoreszenz bei zwei unterschiedlichen Anregungswellenlängen gemessen, deren Verhältnis (Fura-Ratio) proportional zur intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration ($[\text{Ca}^{2+}]_{\text{int}}$) ist. Ratiometrische Farbstoffe haben den großen Vorteil, dass Ca^{2+} -Signale unabhängig von der Farbstoffkonzentration sind, sofern man Puffereffekte vernachlässigt, die für alle Ca^{2+} -Farbstoffe gelten.

Für die Analyse intrazellulärer Ca^{2+} -Signale in NK-Zellen wurden fünf ratiometrische Calciumindikatoren (Fura-2, Fura-PE3, Fura-8, Fura-10 und Fura-Red) systematisch hinsichtlich ihrer Sensitivität, Signalqualität und Eignung für Langzeitmessungen in primären humanen NK-Zellen verglichen. Zusätzlich wurde untersucht, ob Farbstoffbeladung und Fluoreszenzbelichtung die zytotoxische Funktion der NK-Zellen beeinflussen. Darüber hinaus wurde geprüft, ob sich die Ca^{2+} -Messung mit der Analyse des Zielzellsterbens mittels pCasper kombinieren lässt.

3.1.1 Anregung und Emission der Farbstoffe

Zur Charakterisierung der fünf ratiometrischen Indikatoren wurden zunächst Anregungs- und Emissionsspektren bestimmt. Um zelluläre Bedingungen möglichst realistisch abzubilden, erfolgten die Messungen in primären humanen NK-Zellen. Hierzu wurden die Zellen mit dem jeweiligen Farbstoff beladen und anschließend unter Ca^{2+} -freien Bedingungen (0 mM externes Ca^{2+} , 1 mM EGTA) sowie bei hoher externer Ca^{2+} -Konzentration (20 mM) in Anwesenheit von Thapsigargin und Ionomycin analysiert.

Die gemessenen Spektren sind in Abbildung 3 dargestellt. Fura-2 und Fura-PE3 zeigten nahezu identische spektrale Eigenschaften, ebenso Fura-8 und Fura-10. Dies entspricht der strukturellen Verwandtschaft der jeweiligen Farbstoffpaare. Fura-2 und Fura-PE3 wurde im kurzwelligen Bereich angeregt, gefolgt von Fura-8 und Fura-10, während Fura-Red eine deutlich langwelligere Anregung und Emission hatte.

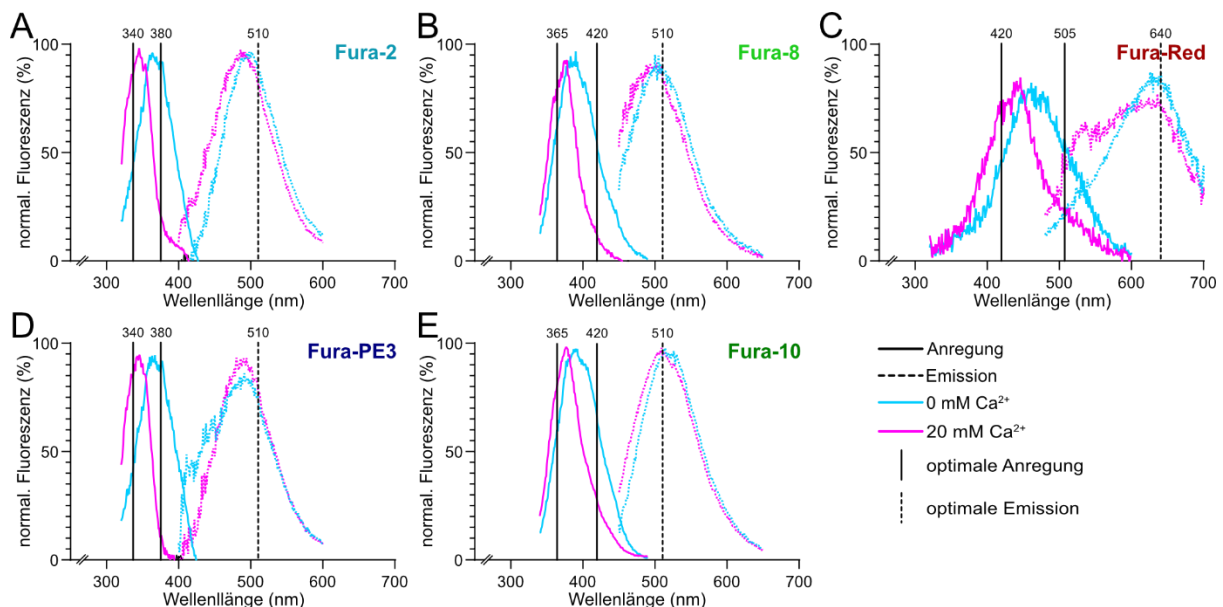


Abbildung 3: Anregungs- und Emissionsspektren der getesteten Fura-Indikatoren

Dargestellt sind Anregungsspektren (durchgezogene Linien) und Emissionsspektren (gestrichelte Linien) von Fura-2 (A), Fura-8 (B), Fura-Red (C), Fura-PE3 (D) und Fura-10 (E) unter Ca^{2+} -freien Bedingungen (1 mM EGTA; blau) sowie bei hoher extrazellulärer Ca^{2+} -Konzentration (20 mM Ca^{2+} ; pink). Horizontale Linien markieren ideale Anregungs- und Emissionswellenlänge. Zur Einstellung minimaler bzw. maximaler intrazellulärer Ca^{2+} -Signale wurden Thapsigargin und Ionomycin zugesetzt. Die Spektren wurden bei 37 °C in einem Plattenlesegerät aufgenommen. Dargestellt ist der Mittelwert. $n = 5 - 15$ Einzelmessungen; $N = 3$ Spender. Modifiziert nach Kaschek et al, (2026).

Alle untersuchten Fura-Indikatoren zeigten die erwartete Ca^{2+} -abhängige Verschiebung ihres Anregungsspektrums, wobei hohe Ca^{2+} -Konzentrationen jeweils zu einer Verschiebung in Richtung kürzerer Wellenlängen führten. Auf Basis dieser Spektren wurden geeignete Anregungs- und Emissionswellenlängen für die mikroskopiebasierten Experimente ausgewählt (Abbildung 3 und Tabelle 12).

Tabelle 12: Verwendete Anregungs- und Emissionswellenlängen im Cell Observer für die getesteten Fura-Indikatoren
Übersicht der für die Messungen im Cell Observer gewählten Anregungs- und Emissionswellenlängen sowie Beamsplitter für Fura-2, Fura-PE3, Fura-8, Fura-10 und Fura-Red. Die Auswahl basiert auf den in Abbildung 3 bestimmten Spektren und wurde so gewählt, dass eine möglichst gute Differenzierung zwischen Ca^{2+} -armen und Ca^{2+} -reichen Bedingungen erreicht wird. (Modifizierte Übernahme nach Kaschek et al., 2026)

Indikator	Anregung Kanal 1	Anregung Kanal 2	Beamsplitter	Emissions-Filter
Fura-2 und Fura-PE3	365 nm LED + 340/30 nm	380 nm LED + 380 nm	BS 409 nm	510/90 nm
Fura-8 und Fura-10	365 nm LED + 370 nm	420 nm LED	BS 458 nm	510/90 nm
Fura-Red	420 nm LED + 427/15 nm	505 nm LED + 504/17 nm	BS 440, 520, 607 nm	464/18 nm, 542/18 nm, 639/30 nm

3.1.2 Untersuchung der ratiometrischen Eigenschaften mit dem Cell Observer

Für die mikroskopiebasierte Analyse der Ca^{2+} -Signale wurde ein Cell Observer verwendet, der eine flexible Anpassung der Anregungs- und Emissionsbedingungen ermöglicht. Die Auswahl geeigneter Filter erfolgte auf Grundlage der zuvor bestimmten Spektren (Tabelle 12). Zusätzlich erlaubt dieser Aufbau die Verwendung einer Perfusionskammer (Abbildung 4A), über die definierte Ca^{2+} -haltige Lösungen mittels Spritzen appliziert werden können. Der Flüssigkeitsaustausch erfolgt hier über ein Überlaufreservoir, wodurch mechanische Belastungen der Zellen minimiert werden. NK-Zellen wurden auf Polyornithin-beschichteten Coverslips untersucht, die Experimente wurden bei 37 °C durchgeführt.

Zur Bestimmung des dynamischen Bereichs wurden Fura-beladene NK-Zellen unter Ca^{2+} -freien Bedingungen (0 mM externes Ca^{2+} , 1 mM EGTA) intermediären (0,5 mM) sowie hohen extrazellulären Ca^{2+} -Konzentration (20 mM) untersucht. Durch Zugabe von Thapsigargin und Ionomycin wurden dabei zum einen möglichst niedrige (nach vollständiger Speicherentleerung) und zum anderen möglichst hohe (bei maximalem Ca^{2+} -Einstrom) $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{int}}$ erzeugt.

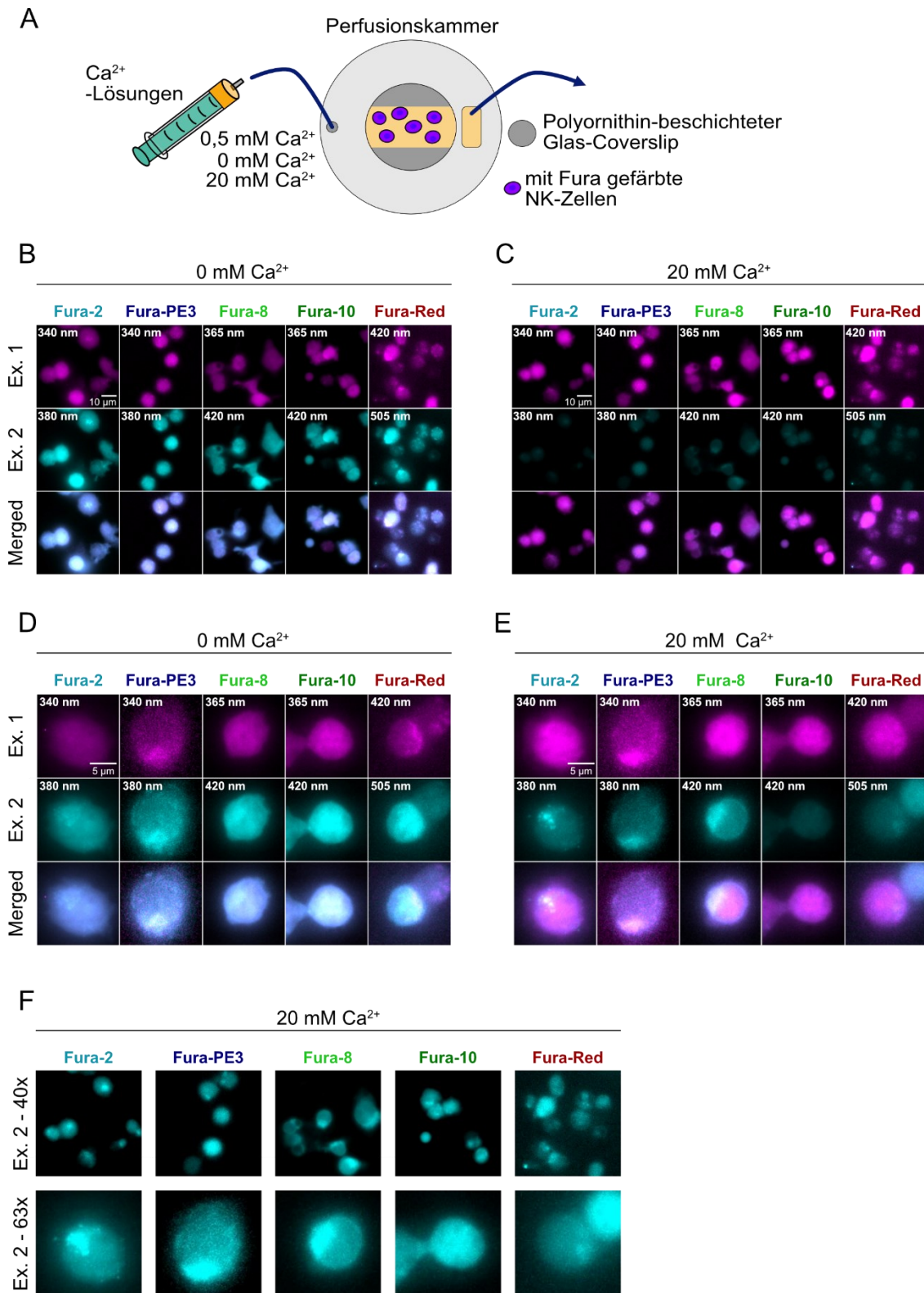


Abbildung 4: Ca²⁺-Imaging von Fura-gefärbten NK-Zellen im Cell Observer unter Verwendung einer Perfusionskammer. (A) Schematische Darstellung der verwendeten Perfusionskammer zur Messung von Ca²⁺-Signalen unter definierten äußeren Ca²⁺-Konzentrationen. (B,C) Primäre NK-Zellen, gefärbt mit fünf unterschiedlichen Fura-Farbstoffen, aufgenommen mit einem 20×-Objektiv. (B) Aufnahmen bei 0 mM extrazellulärem Ca²⁺, (C) derselbe Bildausschnitt bei 20 mM Ca²⁺. Die obere Reihe zeigt den kurzwelligen Anregungskanal 1 (Ex1), die mittlere Reihe den längerwelligen Kanal 2 (Ex2) und die untere Reihe jeweils die Überlagerung beider Kanäle (merge). (D, E) Hochaufgelöste Aufnahmen gefärbter NK-Zellen im 63×-Objektiv zur Darstellung intrazellulärer Kompartimentalisierung. Gezeigt sind Maximum-Intensity-Projections (MIP) aus aufgenommenen z-Stacks. (F) Darstellung des Ex2-Kanals bei 20 mM Ca²⁺ mit angepassten Helligkeitseinstellungen, um zu verdeutlichen, dass trotz der reduzierten Intensität im Vergleich zur 0-mM-Bedingung weiterhin ein deutlich messbares Fluoreszenzsignal vorhanden ist. Modifiziert nach Kaschek et al. (2026).

Kapitel 3 Ergebnisse

Wie für ratiometrische Fura-Indikatoren erwartet, führte der Ca^{2+} -abhängige Shift im Anregungsspektrum zu charakteristischen Veränderungen der Emissionsintensität in den beiden verwendeten Anregungskanälen. Unter der Ca^{2+} -freien Bedingung war die Fluoreszenzintensität im langwellig angeregten Kanal 2 (Ex2, türkis) höher als im kurzwelligen Kanal 1 (Ex1, magenta), sodass die Zellen in überlagerten Darstellungen (*merge*) überwiegend blau erscheinen (Abbildung 4B). Bei hoher Ca^{2+} -Konzentration nahm die Intensität im langwelligeren Ex2-Kanal deutlich ab, während sie im kurzwelligen Ex1-Kanal zunahm, sodass die Zellen in den überlagerten Bildern pink erscheinen (Abbildung 4C). Dieses Verhalten wurde für alle untersuchten Fura-Indikatoren beobachtet.

Ein potenzielles Problem der AM-basierten Farbstoffe (Acetoxymethylester) ist ihre Kompartimentalisierung. Dabei lagert sich der Farbstoff nicht nur im Zytosol an, sondern kann auch in Organellen wie dem ER oder den Mitochondrien akkumulieren. Da die Ca^{2+} -Konzentrationen in diesen Organellen erheblich von der zytosolischen Konzentration abweichen, kann dies die Interpretation der Messungen beeinflussen. In hochaufgelösten 63×-Aufnahmen gefärbter NK-Zellen (Abbildung 4D,E) zeigen sich punktförmige Strukturen, die auf eine solche Kompartimentalisierung hinweisen. Diese sind in allen getesteten Fura-Farbstoffen erkennbar, wirken jedoch bei Fura-10 am wenigsten ausgeprägt. Diese Beobachtung wurde nicht weiterverfolgt, da bereits beschrieben wurde, dass die intrazelluläre Kompartimentalisierung von Fura-2/AM die Bestimmung der zytosolischen freien Ca^{2+} -Konzentration beeinträchtigen kann (Takeuchi et al., 1989)

Bei hoher Ca^{2+} -Konzentration (20 mM) war die Fluoreszenzintensität im langwelligen Ex2-Kanal erwartungsgemäß deutlich reduziert. Da für alle Farbstoffe identische Helligkeits- und Kontrasteinstellungen verwendet wurden, erschien das Signal teilweise sehr schwach. Eine Anpassung der Darstellungseinstellungen (Abbildung 4F) zeigt jedoch, dass das Signal weiterhin deutlich über dem Hintergrund liegt und somit für ratiometrische Analysen geeignet ist.

Bei ratiometrischen Farbstoffen bestimmt $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{int}}$ das Verhältnis zwischen den beiden Anregungswellenlängen. Dieses Verhältnis, das als Fura-Ratio bezeichnet wird, kann pixelweise berechnet werden, indem die Fluoreszenzintensität in jedem Pixel im kurzwelligeren Kanal Ex1 durch die Intensität im langwelligeren Kanal Ex2 nach Hintergrundkorrektur dividiert wird. Abbildung 5A verdeutlicht exemplarisch die Generierung eines solchen Ratio-Bildes aus den beiden Fluoreszenzkanälen. In der Falschfarbendarstellung entsprechen blaue Farben niedrigen Ratio-Werten, während hohe Ratio-Werte als gelbe bis weiße Bereiche

Kapitel 3 Ergebnisse

dargestellt werden. Bei hoher externer Ca^{2+} -Konzentration steigt das Fura-Ratio entsprechend an. Nach Anpassung der Farbschwellen werden zudem Unterschiede zwischen einzelnen Zellen innerhalb derselben Bedingung sichtbar.

Da das gemessene Fura-Ratio vom Verhältnis der Anregungsintensitäten der beiden Kanäle abhängt, wurden die Belichtungszeiten der beiden Kanäle zunächst kalibriert. Ziel war es, in der intermediären Ca^{2+} -Bedingung (0,5 mM Ca^{2+}) ein Fura-Ratio von etwa 0,5 zu erreichen (Abbildung 5B). Dieser Wert wurde als technischer Referenzpunkt gewählt, um die Kanalgewichtung zwischen den Farbstoffen vergleichbar zu machen und gleichzeitig ausreichend Dynamik für Änderungen in beide Richtungen zu erhalten. Um dies zu erzeugen, wurde für Fura-2 und Fura-PE3 der kurzwellige Kanal (340 nm) doppelt so lange belichtet wie der langwellige Kanal (380 nm). Für Fura-8 und Fura-10 wurde der erste Kanal (370 nm) auf das 0,3-fache, für Fura-Red der erste Kanal (420 nm) auf das 0,2-fache der Belichtungszeit des jeweiligen zweiten Kanals (420 nm bzw. 505 nm) eingestellt (Tabelle 9).

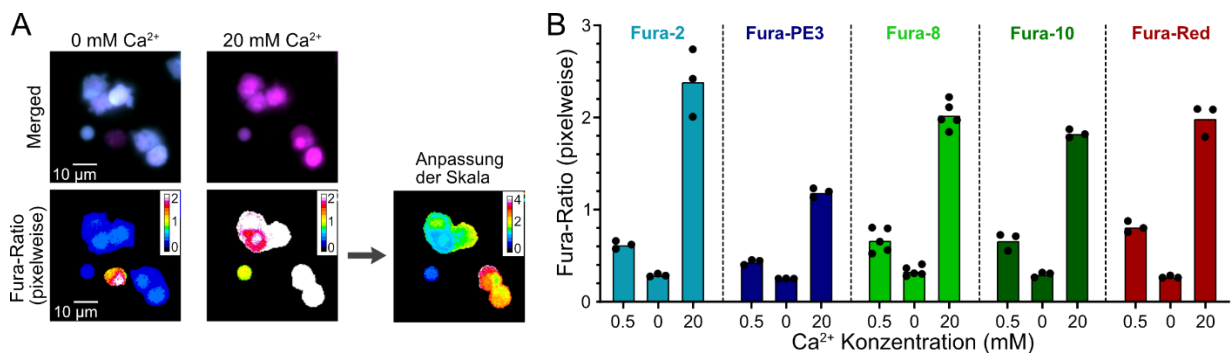


Abbildung 5: Messung von Fura-Ratios in gefärbten NK-Zellen im Cell-Observer

(A) Repräsentative Aufnahmen gefärbter NK-Zellen als Überlagerung beider Anregungskanäle (oben) sowie die entsprechenden Fura-Ratio-Darstellungen (unten), pixelweise berechnet mit dem ImageJ-Plugin Ratio Plus NaN. Links sind die Zellen bei 0 mM extrazellulärem Ca^{2+} dargestellt, rechts bei 20 mM Ca^{2+} . Das mittlere Ratio-Bild verwendet identische Helligkeitseinstellungen wie die 0-mM-Bedingung; das rechte Ratio-Bild zeigt denselben Bildausschnitt mit angepassten Helligkeitseinstellungen zur besseren Darstellung intrazellulärer Unterschiede. (B) Gemessene Fura-Ratios der getesteten Farbstoffe bei 0, 0,5 und 20 mM extrazellulärem Ca^{2+} . Jeder Punkt repräsentiert den Mittelwert eines Spenders. $N = 3-5$ Spender; $n = 15-155$ Zellen pro Bedingung. Modifiziert nach Kaschek et al. (2026).

Den dynamischen Bereich eines ratiometrischen Farbstoffs kann man als das Verhältnis des maximal messbaren zum minimal messbaren Fura-Ratio definieren. Ein großer dynamischer Bereich ermöglicht es, auch geringe Änderungen der Ca^{2+} -Konzentration zuverlässig abzubilden. Neben der Bestimmung des dynamischen Bereichs der Farbstoffe wurde untersucht, ab welcher Belichtungszeit der tatsächliche dynamische Bereich zuverlässig gemessen werden kann. Es sollten Belichtungszeiten identifiziert werden, die einen stabilen dynamischen Bereich bei möglichst geringer „Lichtbelastung“ (geringe Intensität und kurze Belichtungszeit) der Zellen ermöglichen. In Abbildung 6 ist für die fünf getesteten

Kapitel 3 Ergebnisse

Fura-Indikatoren jeweils der gemessene dynamische Bereich der NK-Zellen aufgetragen, durchgeführt mit verschiedenen Belichtungszeiten.

Dabei zeigte sich, dass im Mittel der dynamische Bereich mit zunehmender Belichtungszeit zunächst anstieg und anschließend ein Plateau erreichte. Dieses Plateau wurde für die einzelnen Farbstoffe bei unterschiedlichen Belichtungszeiten erreicht. Zudem unterschieden sich die Farbstoffe deutlich in ihrem maximalen dynamischen Bereich. Gleichzeitig zeigte sich eine beträchtliche Streuung der Werte zwischen einzelnen Zellen.

Neben dem dynamischen Bereich wurden weitere Parameter der Signalqualität untersucht (Abbildung 7). Abbildung 7A kondensiert die Mittelwerte aus Abbildung 6, während in Abbildung 7B die Werte bei der jeweils höchsten Belichtungszeit dargestellt sind. In den Abbildung 7C und D wird das Signal-zu-Hintergrund-Verhältnis dargestellt, indem die mittlere Fluoreszenzintensität der Zellen mit der Hintergrundfluoreszenz verglichen wird (kurzwelliger Kanal Ex1 in Abbildung 7C, langwelliger Kanal Ex2 in Abbildung 7D). Dabei wurde deutlich, dass Fura-10 bereits bei sehr kurzen Belichtungszeiten ein hohes Signal-zu-Hintergrund-Verhältnis erreichte. Fura-8 und Fura-2 benötigten hierfür etwas längere Belichtungszeiten, während Fura-Red und insbesondere Fura-PE3 erst bei deutlich längeren Belichtungszeiten vergleichbare Werte erreichten.

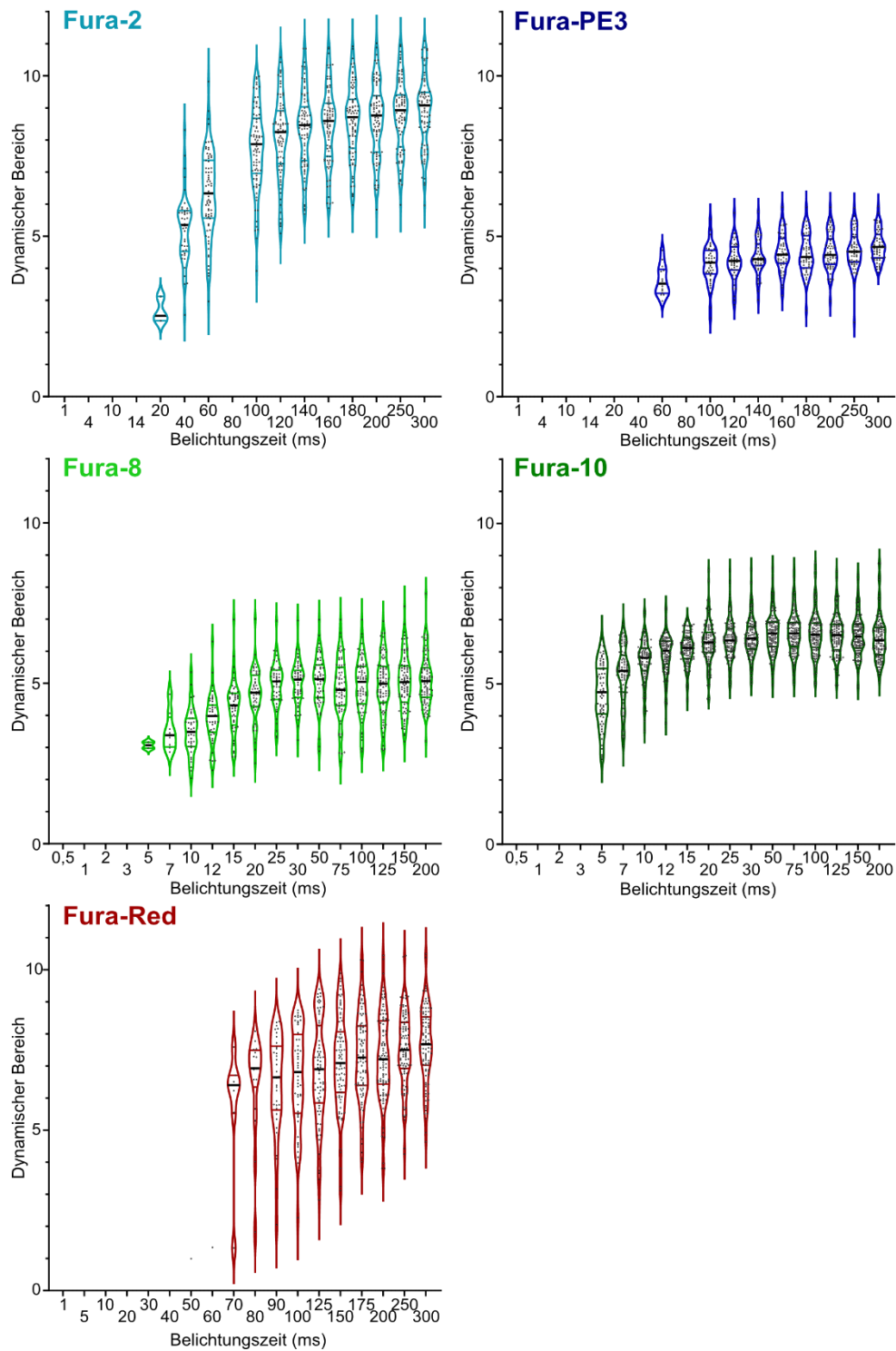


Abbildung 6: Dynamischer Bereich der Fura-Farbstoffe in Abhängigkeit von der Belichtungszeit

Violinplots zeigen die Verteilung des dynamischen Bereichs in Abhängigkeit von der Belichtungszeit für primäre NK-Zellen, die mit den jeweiligen Fura-Indikatoren beladen wurden. Jeder Punkt entspricht dem gemessenen dynamischen Bereich einer einzelnen Zelle. Der Median ist als durchgezogene schwarze Linie dargestellt, die Quartile als gestrichelte Linien. $N = 3-5$ Spender; $n = 114-308$ Zellen pro Farbstoff. Modifiziert nach Kaschek et al. (2026).

Kapitel 3 Ergebnisse

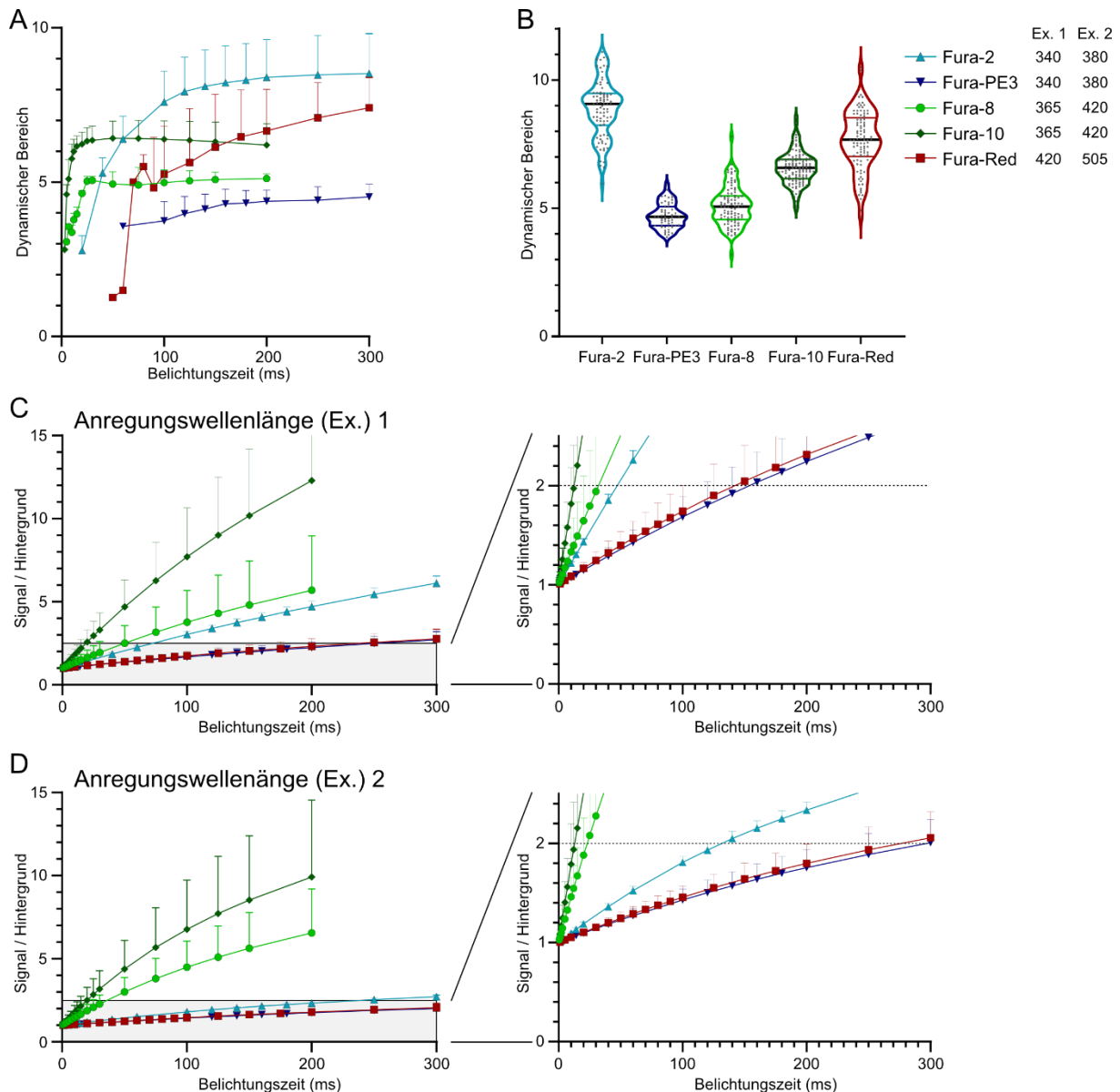


Abbildung 7: Einfluss der Belichtungszeit auf den dynamischen Bereich und die Signalqualität der Fura-Farbstoffe

(A) Dynamischer Bereich primärer NK-Zellen, die mit den jeweiligen Fura-Farbstoffen beladen wurden, in Abhängigkeit von der Belichtungszeit. Dargestellt sind Mittelwerte $\pm$ SD. (B) Violinplots des dynamischen Bereichs gemessen in einzelnen Zellen bei maximalen Belichtungszeiten (200 ms für Fura-8 und Fura-10; 300 ms für Fura-2, Fura-PE3 und Fura-Red). Schwarze Balken markieren den Median, farbige Linien die Quartile. (C, D) Signal-zu-Hintergrund-Verhältnis der beiden Anregungskanäle für jeden Farbstoff in Abhängigkeit von der Belichtungszeit. Die rechten Panels zeigen eine vergrößerte Darstellung der linken. Dargestellt sind Mittelwerte $\pm$ SD. Optimale Belichtungszeiten für den kurzwelligeren Kanal Ex1 betrugen: Fura-2, 60 ms; Fura-PE3, 160 ms; Fura-8, 50 ms; Fura-10, 15 ms; Fura-Red, 150 ms. Und für den langwelligeren Kanal Ex2: Fura-2, 140 ms; Fura-PE3, 300 ms; Fura-8, 25 ms; Fura-10, 15 ms; Fura-Red, 300 ms. $N = 3-5$ Spender; $n = 114-308$ Zellen pro Farbstoff. Modifiziert nach Kaschek et al. (2026).

Bei der Berechnung von Ca^{2+} -Signalen gibt es unterschiedliche Ansätze. Für die Analyse der Daten aus Abbildung 5 bis 7 wurde das Ratio pixelweise berechnet und anschließend alle Pixel einer Zelle gemittelt. Eine alternative Methode besteht darin, zunächst die mittlere Fluoreszenzintensität der Zelle (ROI) in beiden Kanälen zu bestimmen und daraus im zweiten Schritt das Fura-Ratio der gesamten Zelle zu berechnen. Abbildung 8A zeigt schematisch beide Analyseansätze und vergleicht sie miteinander. Beide Ansätze basieren auf denselben

Kapitel 3 Ergebnisse

Intensitätsdaten, unterscheiden sich jedoch in der Reihenfolge der Ratio-Berechnung und Mittelung.

Abbildung 8B vergleicht drei Varianten zur Berechnung des dynamischen Bereichs bei maximaler Belichtung. Die erste Methode („Pixel-Ratio“) bestimmt zunächst ein pixelbasiertes Ratio und berechnet daraus den dynamischen Bereich für jede einzelne Zelle. Die zweite Methode („gemittelttes Pixel-Ratio“) verwendet ebenfalls pixelbasierte Ratios, mittelt jedoch zunächst die Ratios aller Zellen pro Ca^{2+} -Bedingung und berechnet daraus einen experimentweiten dynamischen Bereich. Die dritte Methode („Fluoreszenz-Ratio“) basiert auf den mittleren ROI-Intensitäten der beiden Kanäle und berechnet daraus zunächst das Ratio der gesamten Zelle. Die Berechnung des dynamischen Bereichs erfolgt dann wie beim gemittelten Pixel-Ratio. Alle drei Methoden lieferten vergleichbare relative Unterschiede zwischen den Farbstoffen, der maximal gemessene dynamische Bereich ist also unabhängig von der Art der Analyse.

Bei Verwendung der fluoreszenzbasierten Methode zeigte sich, dass der dynamische Bereich bereits bei deutlich kürzeren Belichtungszeiten ein Plateau erreicht als bei der pixelbasierten Analyse (Abbildung 8C im Vergleich zu Abbildung 7A). Dies deutet darauf hin, dass die fluoreszenzbasierte Auswertung gegenüber kurzen Belichtungszeiten robuster ist. Aus diesem Grund wurde diese Methode im weiteren Verlauf der Arbeit zur Quantifizierung der Ca^{2+} -Signale verwendet.

Die pixelbasierte Ratio-Berechnung bleibt jedoch wichtig, wenn lokale Unterschiede bei $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{int}}$ analysiert werden sollen. Abbildung 8D zeigt repräsentative Aufnahmen aus der 20-mM- Ca^{2+} -Bedingung, sowohl als Merge der beiden Fluoreszenzkanäle als auch als pixelbasiertes Ratio-Bild. Während intrazelluläre Unterschiede in den Merge-Darstellungen nur schwach erkennbar sind, werden sie im Ratio-Bild durch die Falschfarbendarstellung deutlich sichtbar.

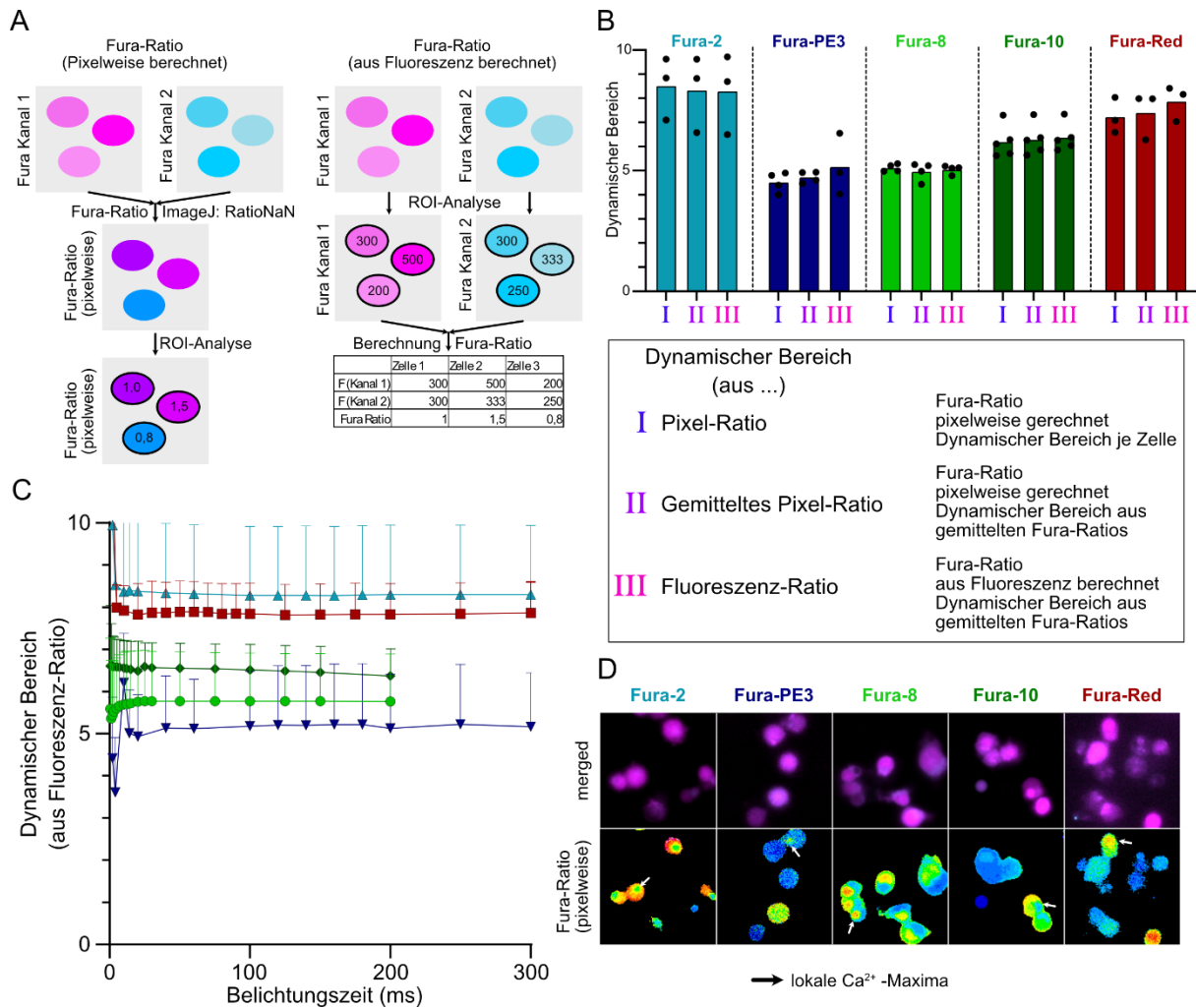


Abbildung 8: Vergleich unterschiedlicher Methoden zur Berechnung des Fura-Ratios und des dynamischen Bereichs

(A) Schematische Darstellung der beiden Analyseansätze zur Bestimmung des Fura-Ratios: pixelweise Berechnung (links) mit anschließender Mittelung über die Zellmaske sowie fluoreszenzbasierte Berechnung (rechts) aus den mittleren ROI-Intensitäten. (B) Vergleich des dynamischen Bereichs der Fura-Indikatoren, berechnet mit den drei Analyseansätzen (I: Pixel-Ratio, II: gemittelttes Pixel-Ratio und III: Fluoreszenz-Ratio) bei maximaler Belichtungszeit. Alle Methoden zeigen vergleichbare relative Unterschiede zwischen den Farbstoffen. (C) Dynamischer Bereich der Fura-Indikatoren in Abhängigkeit von der Belichtungszeit, berechnet mit der fluoreszenzbasierten Ratio-Methode. Im Vergleich zur pixelbasierten Auswertung wird das Plateau des dynamischen Bereichs bereits bei deutlich kürzeren Belichtungszeiten erreicht. (D) Repräsentative Aufnahmen von mit Fura-Indikatoren gefärbten NK-Zellen aus der 20-mM- Ca^{2+} -Bedingung (vgl. Abbildung 4). Dargestellt sind jeweils die Fluoreszenzaufnahmen sowie die entsprechenden pixelbasierten Fura-Ratio-Bilder zur Visualisierung intrazellulärer Ca^{2+} -Heterogenität. $N = 3-5$ Spender, $n = 114-308$ Zellen pro Farbstoff. Modifiziert nach Kaschek et al. (2026).

3.1.3 Eignung der Ca^{2+} Farbstoffe während Zytotoxizitätsmessungen

Die bisherigen Experimente dienten der grundlegenden Charakterisierung der spektralen Eigenschaften sowie der signaltechnischen Leistungsfähigkeit der getesteten Fura-Indikatoren im Ca^{2+} -Imaging. Dabei ging hervor, dass sich die Farbstoffe bereits hinsichtlich ihres dynamischen Bereichs, des Signal-zu-Hintergrund-Verhältnisses sowie der benötigten Belichtungszeiten deutlich unterscheiden.

Für die geplanten Experimente ist jedoch nicht nur die Signalqualität der Farbstoffe relevant, sondern insbesondere auch ihre Eignung für funktionelle Langzeitmessungen lebender

Kapitel 3 Ergebnisse

NK-Zellen. Vor allem bei der gleichzeitigen Analyse intrazellulärer Ca^{2+} -Signale und der Zytotoxizität gegenüber Zielzellen müssen mögliche Einflüsse der Farbstoffe auf Zellviabilität, Signalstabilität und NK-Zellfunktion berücksichtigt werden. Daher wurde im nächsten Schritt untersucht, wie sich die verschiedenen Fura-Indikatoren in Langzeit-Zytotoxizitätsmessungen verhalten (Abbildung 9).

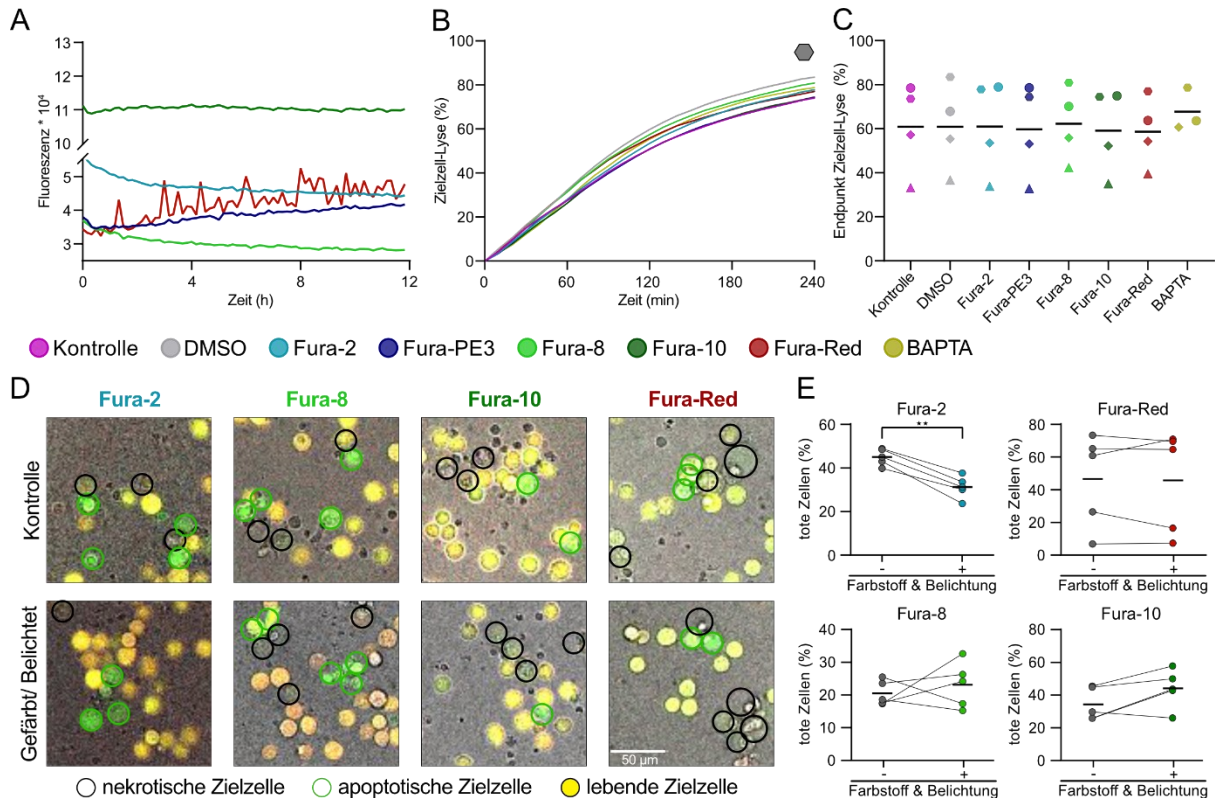


Abbildung 9: Eignung der Fura-Indikatoren für Langzeitmessungen und Einfluss auf die Zytotoxizität von NK-Zellen
 (A) Untersuchung der Fluoreszenzstabilität der Fura-Indikatoren in Langzeitmessungen. Mit den jeweiligen Farbstoffen beladene NK-Zellen wurden über 12 h bei 37 °C im Plattenlesegerät am isosbestischen Punkt gemessen. Dargestellt ist die mittlere Fluoreszenzintensität über die Zeit ($N = 3-4$ Spender; Mittelwert $\pm$ SD). (B, C) Einfluss der Farbstoffbeladung auf die Zytotoxizität von NK-Zellen gegenüber Calcein-beladenen K562-Zielzellen im Plattenlesegerät-Zytotoxizitäts-Assay. NK-Zellen wurden mit den jeweiligen Fura-Indikatoren beladen; DMSO-behandelte, BAPTA-beladene sowie unbeladene NK-Zellen dienten als Kontrollen. Das Effektor-zu-Zielzell-Verhältnis betrug 3:1. Die Farbstoffkonzentrationen betrugen 2 μM für Fura-Red und Fura-PE3, 1 μM für Fura-2 und Fura-8 sowie 0,5 μM für Fura-10. (B) Repräsentativer Zytotoxizitäts-Assay über einen Zeitraum von 4 h. (C) Zusammenfassung der Endpunktzell-Lyse nach 4 h. Jeder Datenpunkt entspricht einem Experiment; zusätzlich ist der Mittelwert dargestellt ($N = 3-4$ Spender; jedes Symbol entspricht einem Spender; One-way ANOVA (Kruskal-Wallis Test)). (D, E) Einfluss wiederholter Fluoreszenzbelichtung auf die Zytotoxizität von NK-Zellen in Langzeit-Imaging-Experimenten mit E6.1-Jurkat-pCasper-Zielzellen. (D) Repräsentative Bildausschnitte nach 210 min für gefärbte und belichtete NK-Zellen im Vergleich zu ungefärbten Kontrollzellen. Schwarze Kreise markieren nekrotische Zielzellen, grüne Kreise apoptotische Zielzellen. (E) Quantifizierung der abgetöteten Zielzellen nach 210 min; zusätzlich ist der Mittelwert dargestellt ($N = 5$ Spender; gepaarter t -Test). Modifiziert nach Kaschek et al. (2026).

Zur Untersuchung der Signalstabilität wurden NK-Zellen mit den jeweiligen Fura-Farbstoffen beladen und über einen Zeitraum von 12 Stunden alle zehn Minuten mit den entsprechenden Anregungswellenlängen belichtet. Die Fluoreszenzabnahme wurde am isosbestischen Punkt bestimmt (Abbildung 9A). Fura-10 zeigte dabei die höchste und stabilste Fluoreszenz mit nur geringem Signalverlust. Fura-2 und Fura-8 wiesen einen deutlichen Fluoreszenzabfall auf,

Kapitel 3 Ergebnisse

während bei Fura-PE3 und Fura-Red im Verlauf der Messung ein Anstieg der Fluoreszenzintensität beobachtet wurde.

Da die Zytotoxizität der NK-Zellen zentral für die geplanten Experimente ist, wurde anschließend untersucht, ob die Farbstoffbeladung selbst die Zytotoxizität beeinflusst. Hierfür wurden Calcein-basierte Zytotoxizitäts-Assays durchgeführt. NK-Zellen wurden mit den jeweiligen Fura-Farbstoffen beladen. Zusätzlich wurden BAPTA-beladene, DMSO-behandelte sowie unbehandelte NK-Zellen als Kontrollen eingesetzt. DMSO wurde in einer 1:500-Verdünnung verwendet, entsprechend der höchsten bei den Farbstoffen eingesetzten Lösungsmittelkonzentration.

Ein repräsentativer Zytotoxizitätsassay ist in Abbildung 9B dargestellt. Weder die Kinetik noch die Endpunktyse unterschieden sich bezüglich der verschiedenen Bedingungen. Die Zusammenfassung der Endpunktylsen über mehrere Spender hinweg ist in Abbildung 9C dargestellt, wobei jedes Symbol einen Spender repräsentiert. Trotz deutlicher interindividueller Variabilität konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Farbstoffen oder zwischen Farbstoff- und Kontrollbedingungen festgestellt werden. Damit ließ sich ein relevanter Einfluss der Farbstoffbeladung allein nicht nachweisen. Davon zu unterscheiden ist jedoch die Frage, ob die für das Ca^{2+} -Imaging erforderliche wiederholte Fluoreszenzanregung in Kombination mit den jeweiligen Farbstoffen phototoxische Effekte auf die NK-Zellen auslöst.

Für die Phototoxizitätsanalyse wurden farbstoffspezifische Belichtungszeiten definiert, die sowohl einen stabilen dynamischen Bereich als auch ein Signal-zu-Hintergrund-Verhältnis von mindestens 2 in beiden Kanälen gewährleisteten (Tabelle 13).

Tabelle 13: Bestimmung geeigneter Belichtungszeiten für die Phototoxizitätsanalyse der Fura-Indikatoren

Übersicht der Kriterien zur Festlegung geeigneter Belichtungszeiten für die Phototoxizitätsanalyse. Für jeden Farbstoff ist angegeben, ab welcher Belichtungszeit der dynamische Bereich ein Plateau erreicht sowie ab welcher Belichtungszeit ein Signal-zu-Hintergrund-Verhältnis von mindestens 2 in den beiden Anregungskanälen erreicht wird. Die gewählte Belichtungszeit entspricht der längeren der beiden Kanalzeiten und wurde für die nachfolgenden Phototoxizitätsexperimente verwendet. Der andere Kanal wurde entsprechend angepasst. (Modifizierte Übernahme nach Kaschek et al., 2026)

Farbstoff	Plateau dynamischer Bereich (Fluoreszenz-Ratio) [ms]	Signal-Hintergr und-Verhältnis >2 (Kanal 1) [ms]	Signal-Hintergr und-Verhältnis >2 (Kanal 2) [ms]	Gewählte Belichtung für die Phototoxizitäts-analyse [ms]
Fura-2	120	60	140	140
Fura-PE3	100	160	300	--
Fura-8	25	40	25	40
Fura-10	12	15	15	15
Fura-Red	125	150	300	175

Kapitel 3 Ergebnisse

Die Analyse der Phototoxizität wurde für die Farbstoffe Fura-2, Fura-8, Fura-10 sowie Fura-Red durchgeführt. Fura-PE3 wurde aufgrund seines geringen dynamischen Bereichs sowie seiner niedrigen Fluoreszenzintensität von weiteren Analysen ausgeschlossen.

Abbildung 9D zeigt repräsentative Ausschnitte dieser Experimente. Gefärbte NK-Zellen sowie ungefärbte Kontroll-NK-Zellen wurden in Kokultur mit E6.1-pCasper-Zellen gegeben und über 210 Minuten beobachtet. Die gefärbten NK-Zellen wurden minütlich mit den jeweiligen Fluoreszenzeinstellungen belichtet. Zusätzlich wurden alle Bedingungen im Abstand von 30 Minuten im GFP-, RFP-FRET- und Durchlichtkanal aufgenommen, um den Zustand der Zielzellen zu evaluieren. Lebende Zielzellen zeigen eine Fluoreszenz in beiden Kanälen (erscheinen orange/gelb). Apoptotische Zellen verlieren aufgrund der Caspase-abhängigen Spaltung des pCasper-Konstrukts das FRET-Signal und fluoreszieren ausschließlich im GFP-Kanal (erscheint grün, zusätzlich markiert mit grünem Ring), während nekrotische Zellen ihre Fluoreszenz vollständig verlieren (durchsichtig, erkennbar im Durchlicht; zusätzlich markiert durch schwarzen Ring).

Die repräsentativen Bildausschnitte verdeutlichen, dass in allen Bedingungen Zielzellen abgetötet wurden. In der Fura-2-Bedingung scheint jedoch eine geringere Anzahl von Zielzellen eliminiert zu werden. Dies bestätigte sich in der quantitativen Analyse der Endpunkte über alle Spender hinweg (Abbildung 9E). Nur bei Fura-2 wurde ein signifikanter Unterschied zwischen der gefärbten und belichteten Bedingung und der entsprechenden Kontrollgruppe deutlich. Fura-8 und Fura-10 zeigten leichte Tendenzen zu höherer Zytotoxizität, die jedoch nicht signifikant waren. Die reduzierte Zytotoxizität in der Fura-2-Bedingung weist darauf hin, dass entweder die Belichtung oder die Kombination aus Belichtung und Farbstoffbeladung die Zytotoxizität der NK-Zellen negativ beeinflussen könnte.

3.1.4 Zusammenfassende Analyse der fünf Fura-Farbstoffe

Die Ergebnisse der vorangegangenen Experimente sind in Abbildung 10 zusammenfassend dargestellt. Dabei werden die wichtigsten Eigenschaften der fünf getesteten Fura-Indikatoren hinsichtlich ihrer Eignung für Ca^{2+} -Messungen in NK-Zellen gegenübergestellt.

Fura-2 hatte einen großen dynamischen Bereich und ein solides Signal-zu-Hintergrund-Verhältnis, wies jedoch eine deutliche Fluoreszenzabnahme im Zeitverlauf sowie eine reduzierte Zytotoxizität unter wiederholter Belichtung auf.

Fura-PE3 wies im Vergleich zu Fura-2 einen deutlich geringeren dynamischen Bereich auf und zeigte insgesamt eine niedrigere Fluoreszenzintensität.

Kapitel 3 Ergebnisse

Beladung und Belichtung zeigten bei Fura-8 keinen messbaren Einfluss auf die Zytotoxizität der NK-Zellen. Allerdings war der dynamische Bereich geringer als bei Fura-2 und im Verlauf der Langzeitmessungen wurde ein deutlicher Fluoreszenzverlust beobachtet.

Fura-Red wies ebenfalls keine negativen Effekte auf die Zytotoxizität der NK-Zellen und einen großen dynamischen Bereich auf. Allerdings handelt es sich um einen relativ lichtschwachen Farbstoff, der längere Belichtungszeiten erfordert. Zudem überlappen seine Anregungs- und Emissionsspektren stark mit denen des pCasper-Konstrukts, wodurch eine parallele Analyse von Ca^{2+} -Signalen und Zielzellsterben erschwert wird.

Fura-10 zeigte ein sehr gutes Signal-zu-Hintergrund-Verhältnis und eine hohe Fluoreszenzstabilität über längere Zeiträume. Zwar war der dynamische Bereich etwas geringer als bei Fura-2, jedoch ausreichend groß, um Ca^{2+} -Signale zuverlässig abzubilden. Besonders relevant war, dass unter den getesteten Bedingungen für Fura-10 im Gegensatz zu Fura-2 keine messbaren phototoxischen Effekte auf die Zytotoxizität der NK-Zellen beobachtet wurden.

Insgesamt hatte Fura-10 unter den getesteten Bedingungen das günstigste Profil für Langzeituntersuchungen der NK-Zell-Zytotoxizität in Kombination mit Ca^{2+} -Messungen (Abbildung 10).

Farbstoff	Dynamischer Bereich	Signal / Hintergrund Verhältnis	Abnahme Fluoreszenz	Chemotoxizität	Phototoxische Effekte auf Zytotoxizität
 Fura-2	sehr gut	gut	ja	nein	ja
 Fura-PE3	ausreichend	ausreichend	nein	nein	
 Fura-8	gut	sehr gut	ja	nein	nein
 Fura-10	gut	exzellent	nein	nein	nein
 Fura-Red	sehr gut	ausreichend	nein	nein	nein

Abbildung 10: Zusammenfassende Bewertung der getesteten Fura-Farbstoffe

Tabellarische Zusammenfassung der wichtigsten Eigenschaften der fünf untersuchten Fura-Indikatoren hinsichtlich ihrer Eignung für Ca^{2+} -Messungen in NK-Zellen. Bewertet wurden dynamischer Bereich, Signal-zu-Hintergrund-Verhältnis, Fluoreszenzstabilität über die Zeit sowie der Einfluss auf die Zytotoxizität der NK-Zellen durch reine Beladung beziehungsweise durch Belichtung. Die Bewertung basiert auf den in Abbildungen 3–9 dargestellten experimentellen Ergebnissen. Modifiziert nach Kaschek et al. (2026).

3.1.5 Etablierung von Ca^{2+} Messungen mit Fura-10 in Kombination mit pCasper in Zielzellen im Celldiscoverer 7

Nachdem Fura-10 als geeignetster Indikator für intrazelluläre Ca^{2+} -Messungen in NK-Zellen ausgewählt worden war, wurde die kombinierte Analyse von Ca^{2+} -Signalen und Zielzellsterben im automatisierten Mikroskopiesystem Celldiscoverer 7 (Zeiss) etabliert. Dieses System

Kapitel 3 Ergebnisse

erlaubt die Langzeitbeobachtung von Zellkulturen unter kontrollierten Inkubationsbedingungen (37 °C, 5 % CO₂) sowie die automatisierte Aufnahme mehrerer Positionen innerhalb von Multiwell-Platten. Dadurch können parallel zahlreiche Zell-Zell-Interaktionen bei geringer Beleuchtungsintensität und stabilen Kulturbedingungen analysiert werden.

Für die Messung von Fura-10 wurden die Anregungswellenlängen 365 nm und 420 nm verwendet. Abbildung 11 zeigt beispielhafte Aufnahmen von NK-Zellen, die mit Fura-10 beladen wurden, sowie von K562 Zielzellen, die das Apoptosereporter-Konstrukt pCasper exprimierten. Im 365-nm-Kanal waren überwiegend die NK-Zellen sichtbar, während im 420-nm-Kanal zusätzlich schwache Signale der Zielzellen detektiert wurden. Diese entstanden durch eine geringe spektrale Überlappung mit dem GFP-Signal des pCasper-Konstrukts, blieben jedoch im Vergleich zur NK-Zellfluoreszenz deutlich schwächer. In den überlagerten Darstellungen ließen sich NK-Zellen mit erhöhtem intrazellulärem Ca²⁺-Signal durch eine verstärkte Fluoreszenz im 365-nm-Kanal und eine reduzierte Intensität im 420-nm-Kanal erkennen. In den pCasper-Kanälen GFP und RFP-FRET waren die NK-Zellen schwach erkennbar. In dem dargestellten Bildausschnitt weisen mehrere NK-Zellen ein erhöhtes Ca²⁺-Signal auf und befinden sich gleichzeitig in Kontakt mit Zielzellen.

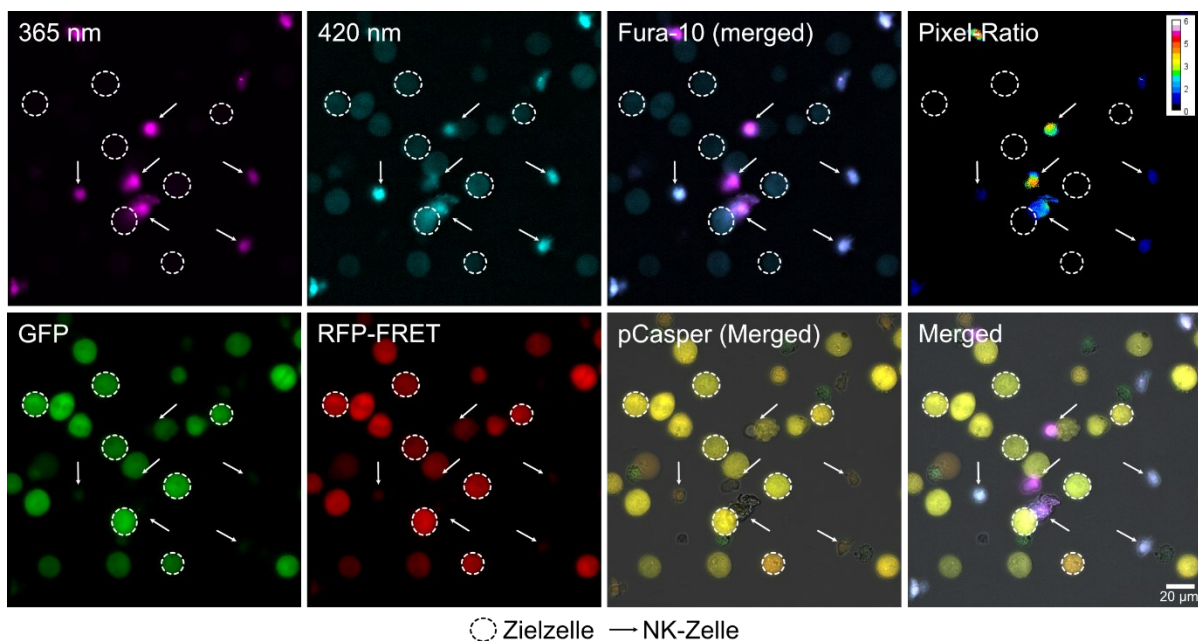


Abbildung 11: Kombinierte Messung von intrazellulärem Ca²⁺ in NK-Zellen und Zielzellsterben mittels pCasper im Celldiscoverer 7

Repräsentative Aufnahmen von Fura-10-beladenen NK-Zellen in Kokultur mit pCasper-exprimierenden K562 im Celldiscoverer 7. In der oberen Reihe sind die beiden Fura-10-Anregungskanäle (365 nm und 420 nm) sowie deren Überlagerung dargestellt. NK-Zellen (markiert durch einen weißen Pfeil) mit erhöhtem intrazellulärem Ca²⁺ zeigen eine erhöhte Fluoreszenz im 365-nm-Kanal und eine reduzierte Intensität im 420-nm-Kanal, was in der Überlagerung als pinkes Signal erscheint. NK-Zellen mit niedrigem Ca²⁺-Signal erscheinen dagegen blau-violett. Die untere Reihe zeigt die Fluoreszenz der Zielzellen (markiert durch ein weißes gestricheltes Oval) im GFP- und RFP-FRET-Kanal des pCasper-Konstrukts. Der pCasper-Merge stellt die Überlagerung dieser beiden Kanäle mit dem Durchlichtbild dar. Der rechte Merge-Kanal zeigt die kombinierte Darstellung aller fünf Kanäle. NK- und Zielzellen lassen sich in allen Kanälen eindeutig voneinander unterscheiden. Maßstabsbalken: 20 µm.

Kapitel 3 Ergebnisse

Zur Überprüfung möglicher Autofluoreszenzsignale bei den verwendeten Anregungswellenlängen wurde die Fluoreszenz von gefärbten und ungefärbten NK-Zellen im Celldiscoverer 7 untersucht (Abbildung 12).

In der oberen Reihe sind Fura-10-beladene NK-Zellen dargestellt. Diese sind in allen verwendeten Kanälen klar über dem Hintergrund detektierbar. Auch in den Intensitätsprofilen einzelner Zellen wird eine deutlich erhöhte Fluoreszenz im Vergleich zum Hintergrundsignal sichtbar. Die Quantifizierung der Fluoreszenzintensitäten von Zell-ROIs und Hintergrund-ROIs bestätigt diesen Eindruck.

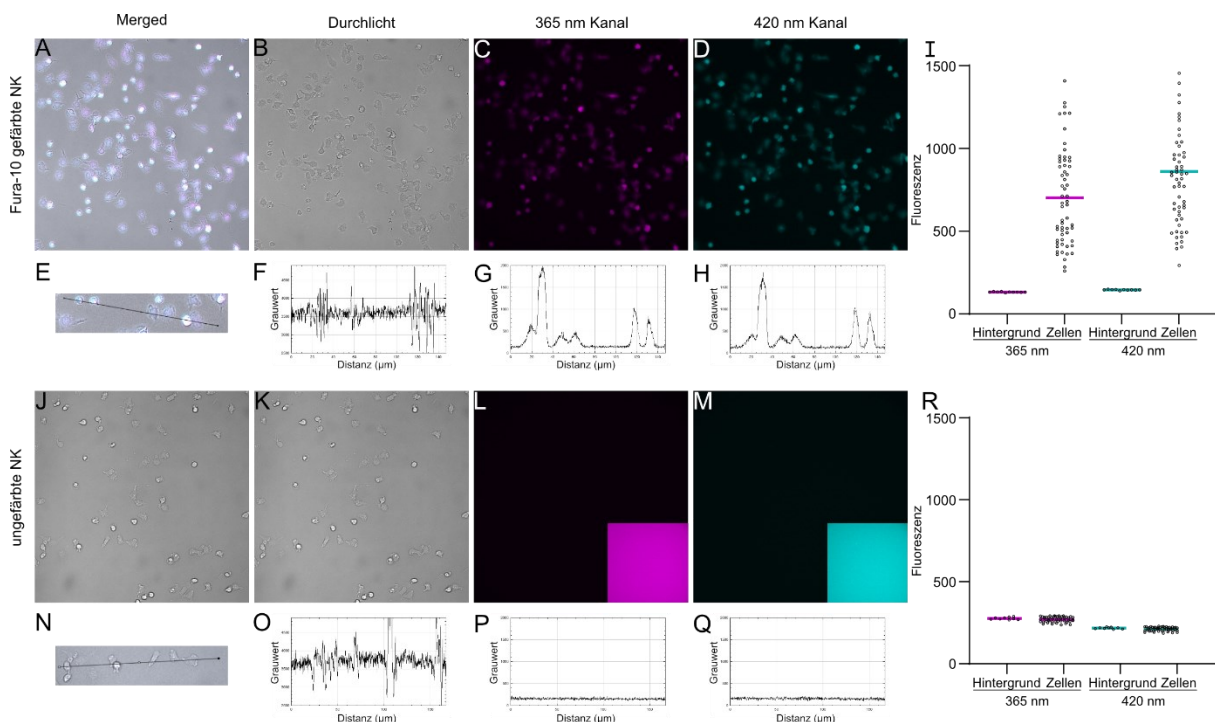


Abbildung 12: Untersuchung der Autofluoreszenz der Fura-Kanäle

Analyse der Fluoreszenzsignale von Fura-10-beladenen und ungefärbten NK-Zellen im Celldiscoverer 7. (A–D) zeigen repräsentative Aufnahmen von Fura-10-beladenen NK-Zellen ohne Zielzellen. Dargestellt sind ein Überlagerungsbild aus Durchlicht-, 365-nm- und 420-nm-Kanal (A), das Durchlichtbild (B) sowie die Fluoreszenzaufnahmen bei Anregung mit 365 nm (C) und 420 nm (D). (E–H) zeigen Intensitätsprofile entlang der in (E) markierten Linie durch Zell- und Hintergrundbereiche. Dargestellt sind die Grauwerte bzw. Fluoreszenzintensitäten für Durchlicht (F), den 365-nm-Kanal (G) und den 420-nm-Kanal (H). Die Peaks entsprechen den Fluoreszenzsignalen der gefärbten Zellen. (I) zeigt die Quantifizierung der Fluoreszenzintensitäten verschiedener Zell- und Hintergrund-ROIs. Jeder Punkt steht für eine gemessene Zelle, der Querbalken zeigt den Mittelwert an. (J–R) zeigen identische Analysen für ungefärbte NK-Zellen. In keinem der Kanäle ist eine Fluoreszenz oberhalb des Hintergrundsignals detektierbar. Die Insets in (L) und (M) zeigen die entsprechenden Fluoreszenzbilder mit angepasster Intensitätsskala. N=1; n=9-10 im Hintergrund n=48-60 Zellen. Modifiziert nach Kaschek et al. (2026).

Zum Vergleich wurden identische Messungen mit ungefärbten NK-Zellen durchgeführt (untere Reihe). In diesen Aufnahmen kann in keinem der verwendeten Kanäle eine Fluoreszenz oberhalb des Hintergrundsignals beobachtet werden. Auch bei Anpassung der Darstellungsparameter war kein Signal über dem Hintergrund erkennbar. Die Intensitätsprofile

Kapitel 3 Ergebnisse

sowie die quantifizierten Werte zeigen ebenfalls keine messbare Fluoreszenz der ungefärbten Zellen.

Diese Ergebnisse zeigen, dass die verwendeten Anregungs- und Emissionsbedingungen im Celldiscoverer 7 keine relevante Autofluoreszenz erzeugen und die gemessenen Signale zuverlässig auf die Fura-10-Fluoreszenz zurückzuführen sind.

Die Auswertung der aufgenommenen Zeitreihen erfolgte mit MSparkles, einem in unserer Arbeitsgruppe entwickelten MATLAB-basierten Analyseprogramm (Stopper*, Vialle*, Kaschek* et al., in Vorbereitung). Für jede NK-Zelle wurde aus den Fluoreszenzintensitäten der beiden Fura-Kanäle das Fura-Ratio berechnet, das als Maß für $[Ca^{2+}]_{int}$ dient. Parallel dazu wurde für jede Zielzelle anhand des pCasper-Signals der Zeitpunkt des Zelltodes bestimmt.

Außerdem analysiert MSparkles Zell-Zell-Kontakte zwischen NK- und Zielzellen. Dadurch lässt sich für jede NK-Zelle erfassen, ob ein Kontakt zu einer Zielzelle bestand und ob diesem ein Zielzellsterben folgte. Auf dieser Grundlage können die Ca^{2+} -Signale einzelner NK-Zellen in Abhängigkeit von ihren Interaktionen mit Zielzellen ausgewertet werden.

Abbildung 13 zeigt beispielhaft die automatische Zellsegmentierung sowie die resultierenden Fura-10 Ratio und pCasper-Signale einzelner Zellen. In Abbildung 13A ist eine Überlagerung aller Kanäle zu sehen. In Abbildung 13B sind zusätzlich die ROIs aller Zielzellen (rot) und NK-Zellen (blau) dargestellt, die von MSparkles detektiert wurden. Abbildung 13C-F zeigen jeweils links ein Bild ohne und eines mit überlagerten ROIs, in der Mitte ist das ausgegebene Ca^{2+} -Signal und rechts das pCasper-Signal abgebildet. Hierfür wurden NK-Zellen in einem „ Ca^{2+} -Readditionsprotokoll“ untersucht. Die Zellen wurden zunächst in einer Lösung mit 0,5 mM Ca^{2+} gemessen, anschließend in Ca^{2+} -freier Lösung und danach in Ca^{2+} -freier Lösung unter Zugabe von Thapsigargin zur Aktivierung der intrazellulären Ca^{2+} -Speicher. Anschließend wurde eine 1 mM Ca^{2+} -Lösung appliziert, bevor die Messung erneut unter 0,5 mM Ca^{2+} durchgeführt wurde. Die resultierenden Ca^{2+} -Signale wurden einmal mit MSparkles und einmal manuell ausgewertet.

Zur Validierung der automatisierten Analyse wurden von MSparkles berechnete Ca^{2+} -Signale mit einer manuellen Auswertung derselben Datensätze verglichen (Abbildung 14).

In Abbildung 14A sind die gemittelten Ca^{2+} -Signale der analysierten NK-Zellen für beide Auswertungsmethoden dargestellt. Die Signalverläufe stimmen weitgehend überein, wobei sich lediglich leichte Unterschiede in der Höhe des Ca^{2+} -Peaks zeigen.

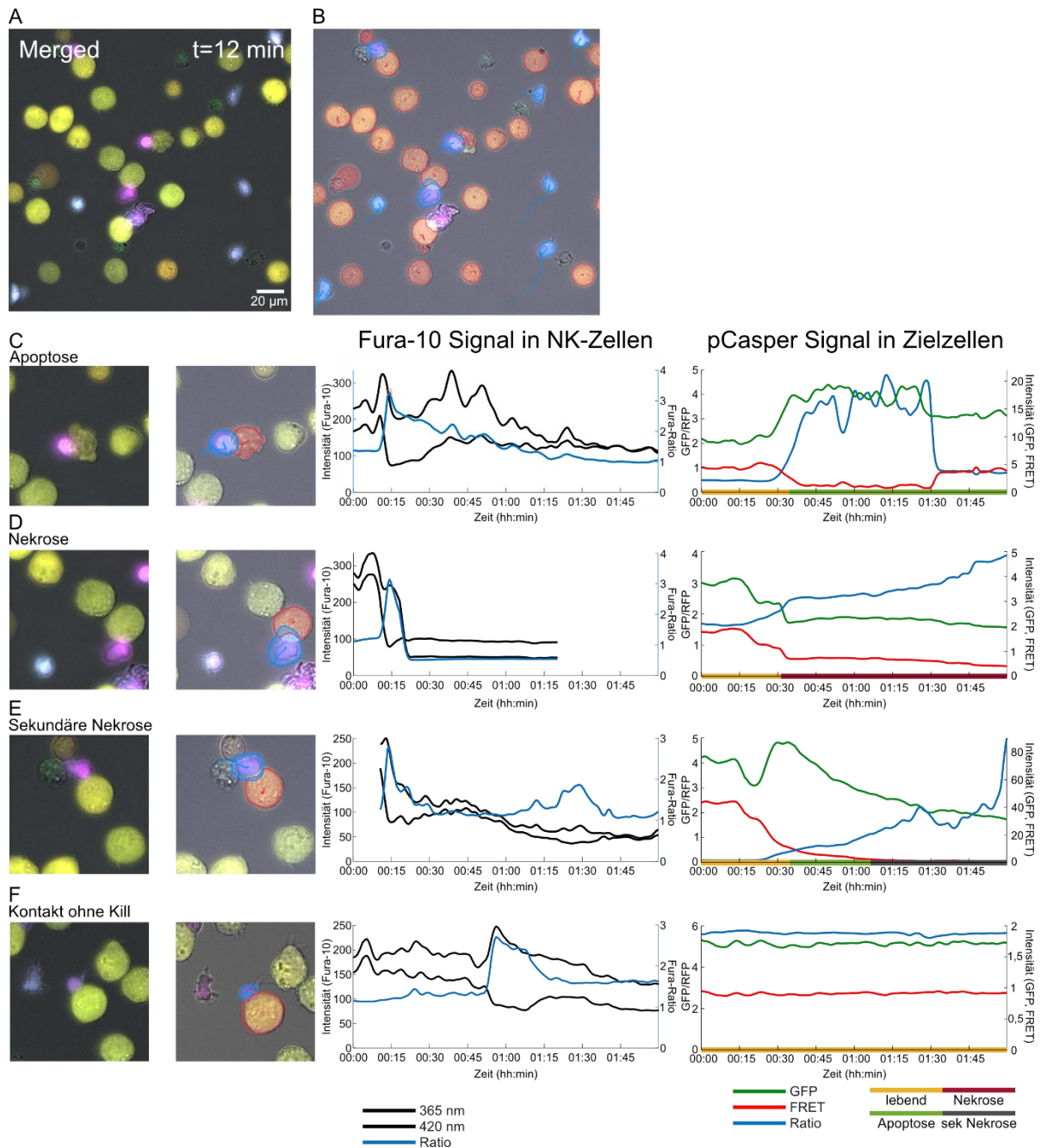


Abbildung 13: Automatisierte Analyse von NK-Zell-Zielzell-Interaktionen und Ca^{2+} -Signalen mit MSparkles

Beispielhafte Darstellung der automatisierten Analyse von NK-Zell-Zielzell-Interaktionen mit dem MATLAB-basierten Programm MSparkles. (A) Überlagerungsbild aller Fluoreszenzkanäle der aufgenommenen Zeitreihe. (B) Automatische Segmentierung der NK-Zellen (blau) und Zielzellen (rot). (C–F) Beispiele einzelner analysierter Zellinteraktionen (Apoptose, Nekrose, Sekundärnekrose, Kontakt ohne Kill). Links jeweils das Ausgangsbild sowie das Bild mit überlagerten Zellsegmentierungen (ROIs). In der Mitte sind die Fluoreszenzsignale der NK-Zellen dargestellt (schwarz: Intensitäten der 365-nm- und 420-nm-Kanäle; blau: daraus berechnetes Fura-Ratio als Maß für das intrazelluläre Ca^{2+} -Signal). Rechts sind die entsprechenden pCasper-Signale der Zielzellen gezeigt (grün: GFP, rot: RFP-FRET, blau: pCasper-Ratio). Die Analyse erlaubt die zeitaufgelöste Bestimmung von Ca^{2+} -Signalen in NK-Zellen sowie die Detektion des Zielzellsterbens. MSparkles wurde entwickelt von Gebhard Stopper unterstützt von Joanne Vialle und mir.

Zur quantitativen Bewertung wurden ausgewählte Zeitpunkte statistisch verglichen (Abbildung 14B-D). Für den Zeitpunkt unmittelbar vor der Applikation von Ca^{2+} (14 min) sowie für das Plateau nach der Applikation (20 min) zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen

Kapitel 3 Ergebnisse

beiden Analysearten. Dagegen war die Peakhöhe des Ca^{2+} -Signals in der manuellen Analyse signifikant höher als in der automatisierten Auswertung mit MSparkles. Der Unterschied hat jedoch nur eine moderate Effektstärke ($r = 0,45$; $R^2 = 0,25$).

Da sich die Signalverläufe beider Auswertungsmethoden weitgehend überlappten und Unterschiede nur in der Peak-Höhe auftraten, wurde für die weiteren Analysen die automatisierte Auswertung mit MSparkles verwendet.

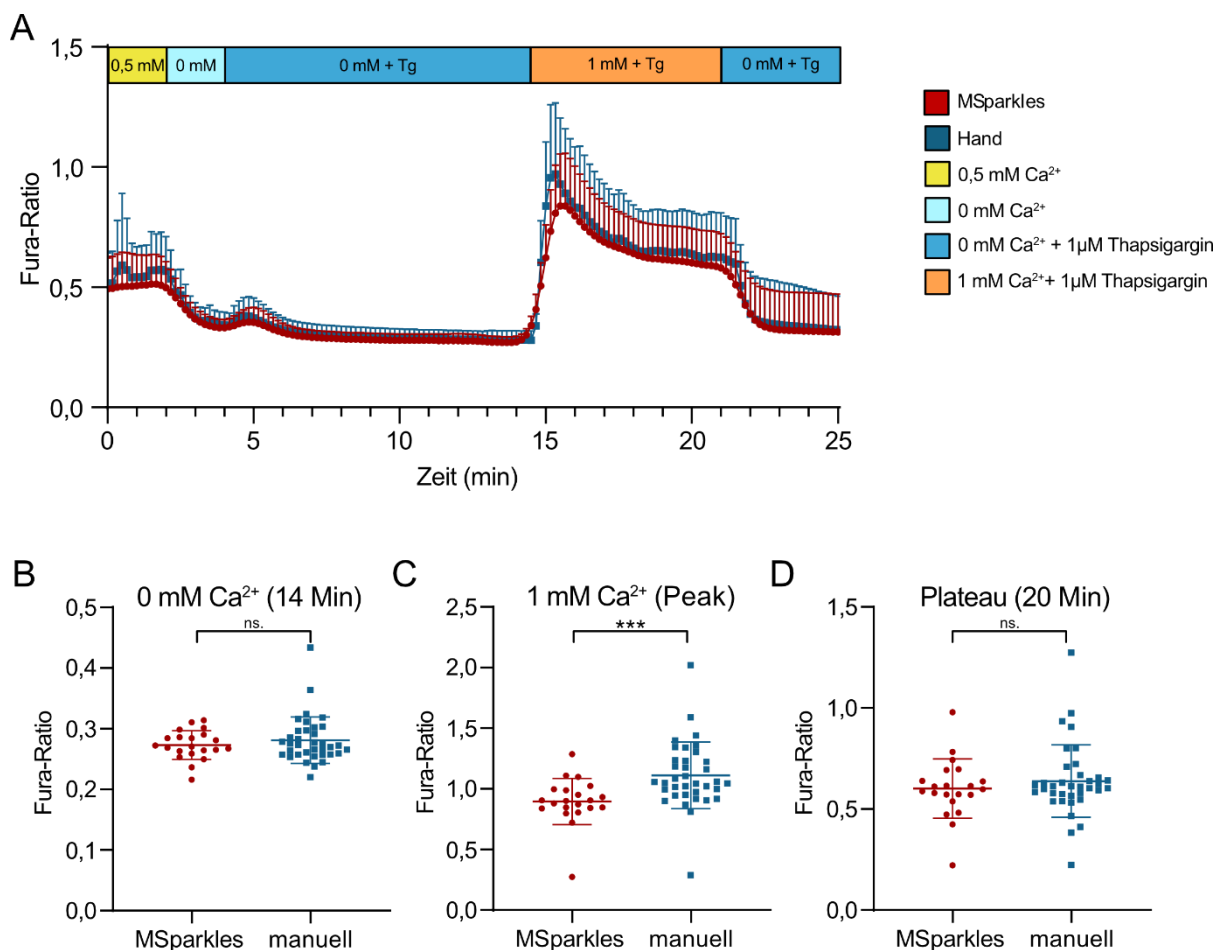


Abbildung 14 Vergleich der automatisierten Ca^{2+} -Analyse mit MSparkles und manueller Auswertung

Validierung der automatisierten Ca^{2+} -Analyse durch Vergleich mit einer manuellen Auswertung derselben Datensätze. NK-Zellen wurden in einem Ca^{2+} -Readditionsprotokoll untersucht. (A) Gemittelte Ca^{2+} -Signale ($\pm$ SD) der analysierten NK-Zellen, berechnet entweder mit MSparkles (rot) oder durch manuelle Auswertung (blau). (B–D) Statistische Analyse ausgewählter Zeitpunkte. Während vor der Ca^{2+} -Applikation (B) sowie im Plateau nach der Applikation (D) keine signifikanten Unterschiede zwischen beiden Methoden beobachtet wurden, zeigte die Peakhöhe des Ca^{2+} -Signals (C) einen signifikanten Unterschied. Die manuelle Analyse ergab höhere Peakwerte mit moderater Effektstärke (Mann-Whitney-U-Test, $r = 0,45$; $R^2 = 0,25$; $n=21$ MSparkles, $n=36$ manuell, $N=1$).

3.2 Messung von Ca^{2+} -Signalen in primären NK-Zellen

Mithilfe des nun etablierten Fura-10-Imaging-Systems wurden im Folgenden intrazelluläre Ca^{2+} -Signale primärer NK-Zellen während der Interaktion mit unterschiedlichen Zielzellen untersucht. Hierzu wurden die analysierten NK-Zellen entsprechend ihres Interaktionsverhaltens mit Zielzellen in fünf Kategorien eingeteilt (Abbildung 15). NK-Zellen, die während der Beobachtungszeit keinen Kontakt zu Zielzellen aufwiesen, wurden der Kategorie „Kein Kontakt“ zugeordnet. NK-Zellen, die Kontakt zu einer Zielzelle herstellten, ohne dass diese im Beobachtungszeitraum starben, wurden der Kategorie „Kontakt ohne Kill“ (kurz „Kein Kill“) zugeordnet. Diese Zellen zeigten ein Ca^{2+} -Signal, während die Zielzelle vital blieb, erkennbar an einer unveränderten Fluoreszenz des pCasper-Konstrukts. NK-Zellen, deren Zielzellen nach Kontakt apoptotisch oder nekrotisch starben, wurden entsprechend den Kategorien „Apoptose“ beziehungsweise „Nekrose“ zugeordnet. In apoptotischen Zielzellen nimmt die FRET-Fluoreszenz ab, während die GFP-Fluoreszenz zunimmt. In der Überlagerung der Fluoreszenzkanäle erscheinen diese Zellen grün und zeigen zusätzlich typische morphologische Veränderungen wie apoptotische Bläschen. Nekrotische Zielzellen verlieren hingegen ihre Fluoreszenzsignale, da das pCasper-Konstrukt bei Membranruptur in den Überstand diffundiert (Abbildung 15A).

Da viele Zielzellen Merkmale beider Zelltodformen zeigten, wurde hierfür zusätzlich die Kategorie „Mixed Phänotyp“ eingeführt. Diese Kategorie umfasst ein Kontinuum an Zielzell-Morphologien von überwiegend apoptotischen Zellen mit leichten nekrotischen Merkmalen bis hin zu überwiegend nekrotischen Zellen mit verbleibender GFP-Fluoreszenz (Abbildung 15B).

NK-Zellen wurden von der Analyse ausgeschlossen, wenn sie während des Tötungsvorgangs das Bildfeld verließen, mit anderen NK-Zellen interagierten, wenn mehr als eine NK-Zelle an der Tötung einer Zielzelle beteiligt war oder wenn das Signal durch Artefakte, beispielsweise autofluoreszente Debris, beeinträchtigt wurde.

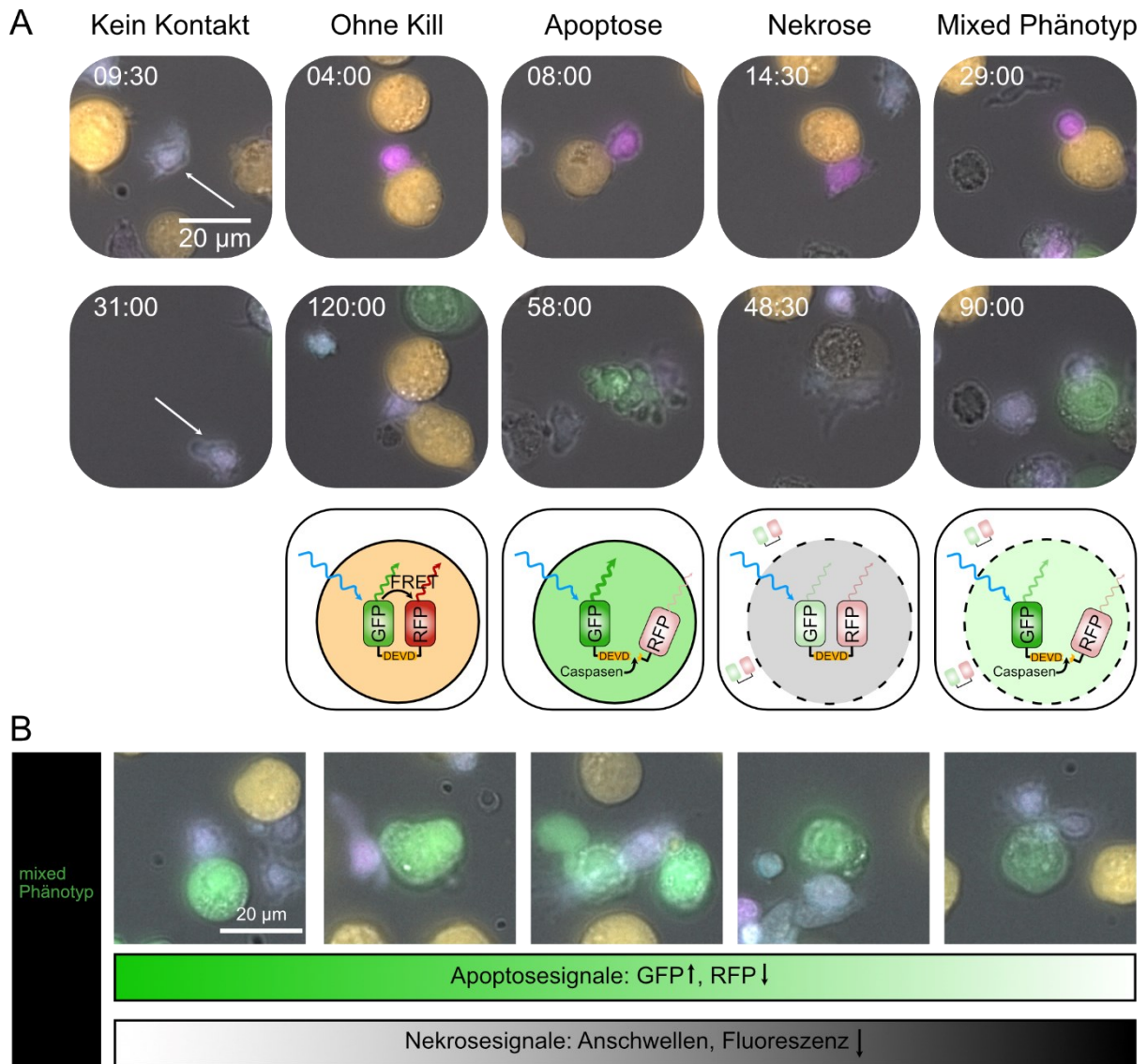


Abbildung 15: Klassifikation von NK-Zell-vermittelten Zelltodphänotypen anhand des pCasper-Reporters

(A) Repräsentative Zeitreihen von NK-Zell-Zielzell-Interaktionen sowie schematische Darstellungen der Fluoreszenzveränderungen des pCasper-Konstrukts in den Zielzellen. Links ist eine NK-Zelle gezeigt, die keinen Kontakt hatte. Für die anderen gilt: das obere Bild zeigt eine NK-Zelle im Kontakt mit einer Zielzelle, die dann im unteren Bild zu keinem Zelltod, einer Apoptose, einer Nekrose oder einem Mixed Phänotyp führt. (B) Dargestellt sind die unterschiedlichen Ausprägungsarten vom Mixed Phänotyp, von hauptsächlich Apoptose bis hauptsächlich Nekrose. Maßstabsbalken: 20 μm.

3.2.1 Ca^{2+} -Signale während verschiedener Tötungsmechanismen

Zur Analyse der Ca^{2+} -Signale während unterschiedlicher NK-zellvermittelter Tötungsmechanismen wurden primäre, Fura-10 gefärbte NK-Zellen fünf verschiedener Spender gegen K562-Zielzellen untersucht. Abbildung 16A zeigt eine repräsentative Messung über einen Zeitraum von zwei Stunden. Fura-10-gefärbte NK-Zellen (bläulich bei niedrigem Fura-Ratio bis pink bei hohem Fura-Ratio) interagierten mit pCasper-transfizierten K562-Zellen und induzierten unterschiedliche Formen des Zelltods (wie in Abbildung 15 definiert).

Kapitel 3 Ergebnisse

In Abbildung 16B sind die gemittelten Fura-Ratios der analysierten NK-Zellen dargestellt. Insgesamt hatten 278 von 468 NK-Zellen keinen Kontakt zu Zielzellen. Ihr Ca^{2+} -Signal blieb konstant bei einem Fura-Ratio von etwa 1,5. Die Ca^{2+} -Signale der interagierenden NK-Zellen wurden auf den manuell definierten Zeitpunkt des Zielzellkontakts ausgerichtet. Bereits kurz vor diesem ermittelten Kontaktzeitpunkt stieg das Ca^{2+} -Signal leicht an. Dies ist plausibel, da erste zelluläre Ausläufer oder initiale Membrankontakte bereits vor dem mikroskopisch eindeutig erfassbaren Kontakt bestehen können und der definierte Kontaktzeitpunkt daher eher einer bereits weitgehend ausgebildeten Synapse entsprechen dürfte. Alle Kurven erreichten etwa drei Minuten nach Kontakt ihren Höhepunkt mit einem Fura-Ratio von ungefähr 4.

Die anschließende Dynamik unterschied sich bezüglich der Tötungsarten. Das Ca^{2+} -Signal von NK-Zellen, die nekrotischen Zelltod induzierten ($n = 38$), fiel im Mittel am schnellsten ab. Signale von NK-Zellen mit anschließendem Mixed-Phänotyp ($n = 34$) hatten eine langsamere Abnahme. Die längsten erhöhten Signalverläufe wurden bei Kontakten beobachtet, die entweder mit Apoptose der Zielzelle ($n = 49$) oder ohne anschließenden Kill ($n = 69$) endeten (Abbildung 16B).

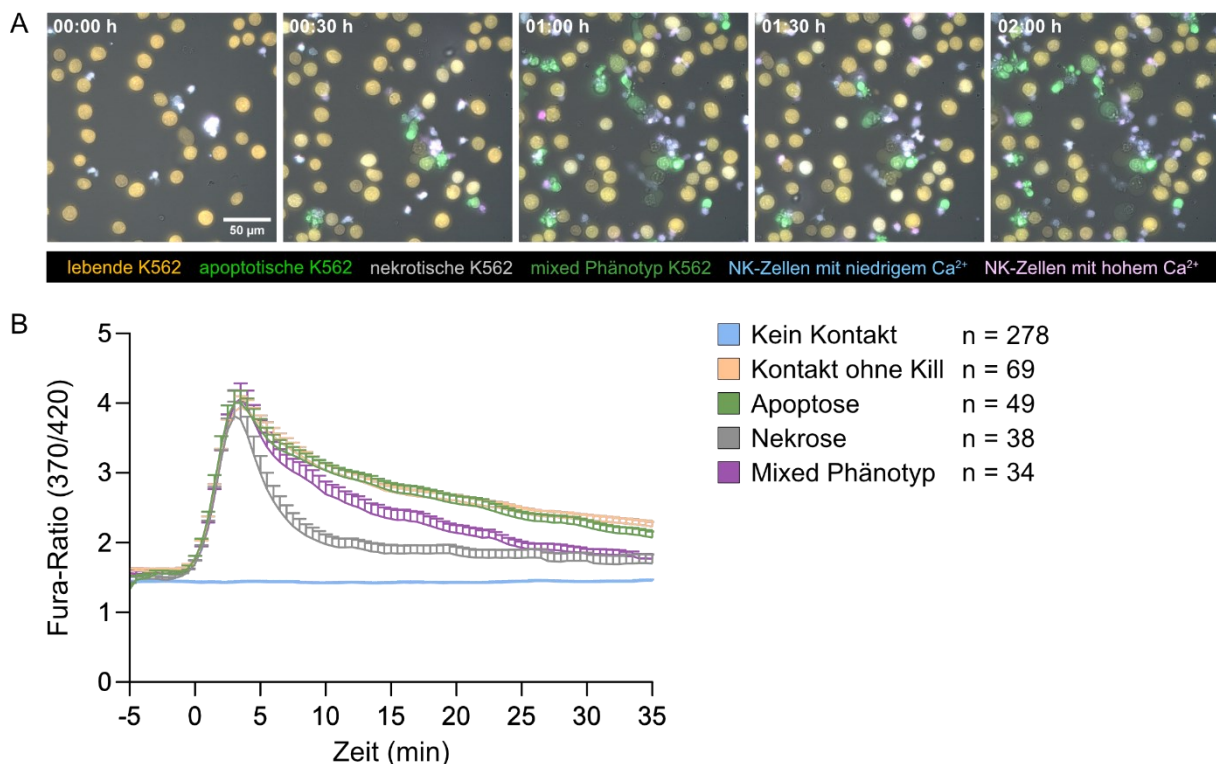


Abbildung 16: Ca^{2+} -Signale von NK-Zellen während unterschiedlicher Interaktionen mit K562-Zielzellen.

(A) Repräsentative Zeitreihe einer Kokultur von Fura-10-gefärbten NK-Zellen mit pCasper-transfizierten K562-Zielzellen über zwei Stunden. NK-Zellen erscheinen je nach Fura-Ratio bläulich (niedriges Ca^{2+}) bis pink (hohes Ca^{2+}). Zielzellen sind entsprechend ihres pCasper-Signals als lebend, apoptotisch, nekrotisch oder Mixed-Phänotyp dargestellt. Maßstabsbalken: 50 μm . (B) Gemittelte Ca^{2+} -Signale (Fura-Ratio 370/420) von NK-Zellen, ausgerichtet auf den Zeitpunkt des ersten Kontakts mit der Zielzelle. Dargestellt sind Mittelwerte $\pm$ SEM für die Interaktionsarten Apoptose, Nekrose, Mixed Phänotyp, Kontakt ohne Kill sowie NK-Zellen ohne Zielzellkontakt ($N=5$).

Kapitel 3 Ergebnisse

Im Folgenden wurden die Ca^{2+} Signale der einzelnen NK-Zellen im Detail analysiert, um statistisch fundierte Aussagen zu erlauben. Abbildung 17 zeigt schematisch und beispielhaft die untersuchten Zeitpunkte und Parameter. Als basales Fura-Ratio (Abbildung 17A) wurde das minimale Signal in den fünf Minuten vor dem Kontakt definiert. Typischerweise ist die NK-Zelle in dieser Phase noch nicht in der Nähe der Zielzelle. Es folgt der Kontakt (Abbildung 17B), definiert als erster Zeitpunkt der Berührung von Ziel- und NK-Zelle. In vielen Fällen steigt das Ca^{2+} -Signal bereits ein bis wenige Zeitpunkte davor an. Es wurde aber manuell auf den Zeitpunkt normalisiert, der im Durchlicht als Kontakt definiert werden konnte. Der Peak (Abbildung 17C) entspricht dem maximalen Fura-Ratio nach dem Kontakt. Analysiert wurde jedoch die Höhe des ΔPeak , also die Differenz zwischen Peak und dem basalen Fura-Ratio. Der Zelltod (Abbildung 17D) trat meist nach dem Peak ein, in dem abgebildeten Beispiel eine Apoptose. Um die Dauer des Signals zu analysieren, wurde zusätzlich eine Abklingzeit (Abbildung 17E) errechnet. Sie ist definiert als die Zeitspanne, die das Signal braucht, um nach dem Kontakt wieder auf $1/e$ der ΔPeak -Amplitude zu fallen. Der Faktor $1/e$ entspricht dabei der Zeitkonstante eines exponentiell abfallenden Prozesses. In dem hier dargestellten Beispiel endet der Track, weil die NK-Zelle unter der toten Zielzelle aus dem Fokus verschwand (Abbildung 17F).

Kapitel 3 Ergebnisse

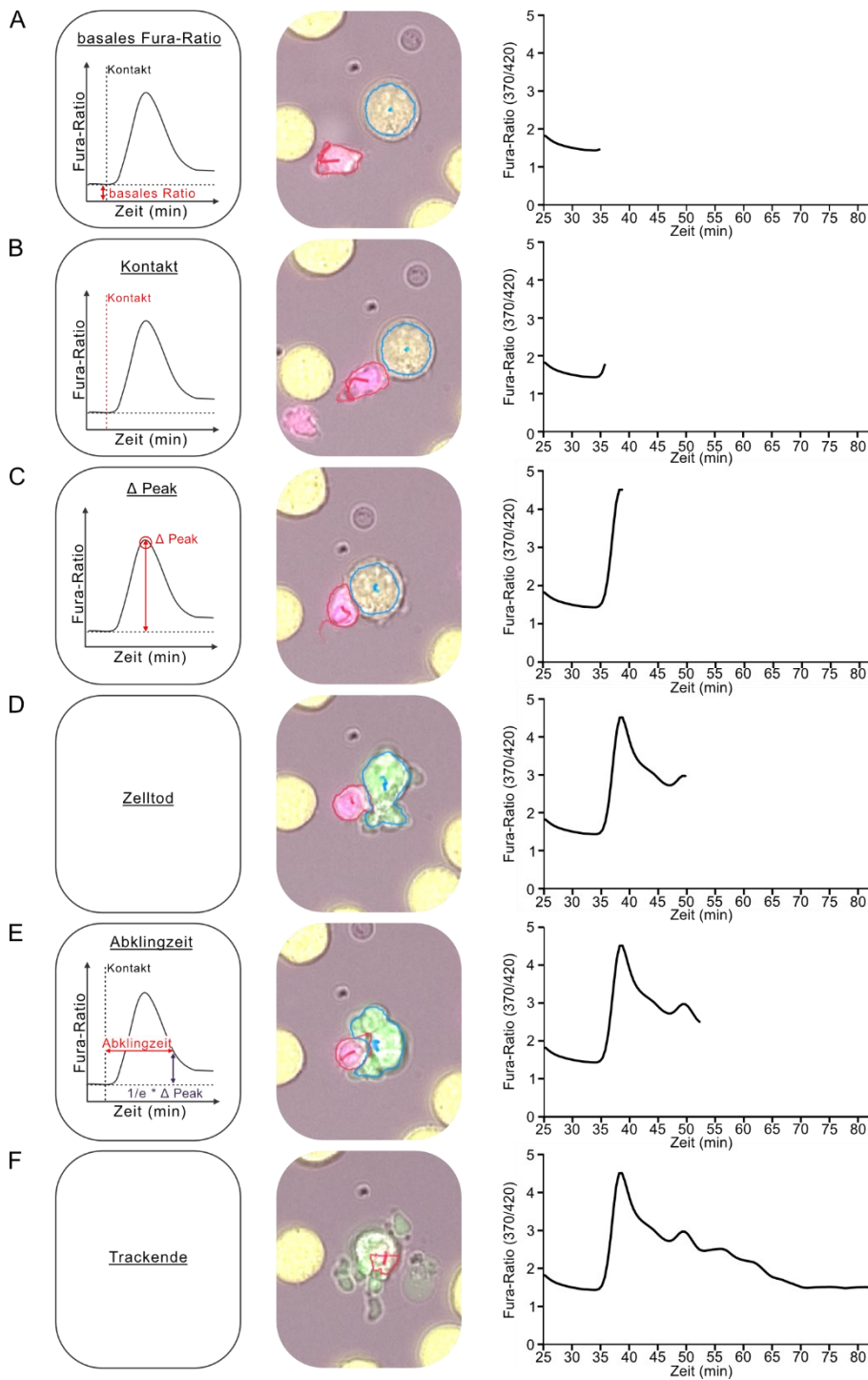


Abbildung 17: Definition der analysierten Parameter der Ca^{2+} -Signale einzelner NK-Zellen.

Links ist schematisch ein idealisiertes Fura-Ratio-Signal einer NK-Zelle über die Zeit dargestellt. In der Mitte ist eine repräsentative Mikroskopieaufnahme einer NK-Zelle während der Interaktion mit einer K562-Zielzelle gezeigt; die von der Software MSparkles definierten ROI zur Analyse der Fluoreszenz sind markiert (rot: NK-Zelle, blau: Zielzelle). Rechts ist das zugehörige Fura-Ratio-Signal dieser Zelle dargestellt. (A) basales Fura-Ratio der NK-Zelle vor dem Kontakt, (B) Zeitpunkt des Kontakts zwischen NK-Zelle und Zielzelle (C) maximaler Ca^{2+} Peak nach Kontakt, (D) Zeitpunkt des Zelltodes, (E) Abklingzeit des Ca^{2+} -Signals sowie (F) Ende des Zelltracks. Schematische Darstellung modifiziert nach Kaschek et al. (in Vorbereitung).

Kapitel 3 Ergebnisse

Abbildung 18 zeigt die Einzelzellanalyse der Ca^{2+} -Signale von NK-Zellen während der Interaktion mit K562 Zielzellen. Jeder Punkt repräsentiert eine einzelne NK-Zelle. Zusätzlich sind Violinplots zur Darstellung der Verteilung der Werte dargestellt.

Das basale Fura-Ratio lag unabhängig vom späteren Zielzellschicksal konstant bei etwa 1,5 (Abbildung 18A). Eine einfaktorielle ANOVA ergab keinen signifikanten Gesamteffekt zwischen den Gruppen, auch nicht zu den NK-Zellen ohne Zielzellkontakt.

In Abbildung 18B ist die Peak-Höhe der NK-Zellen aufgetragen. Deutlich wird, dass die Streuung sehr hoch ist, der Median sich jedoch zwischen den Abtötearten gleicht (ca. 2,6). Bei NK-Zellen ohne Kill scheint es zwei Populationen zu geben, mit unterschiedlich hohen Signalen. Die ANOVA ergab einen schwach signifikanten Gesamteffekt zwischen den Gruppen. In der anschließenden Post-hoc-Analyse konnten jedoch keine signifikanten Unterschiede zwischen einzelnen Abtötungsarten nachgewiesen werden. Insgesamt zeigte sich somit keine klare Veränderung der Ca^{2+} -Peak-Höhe in Abhängigkeit vom Zielzellschicksal.

Deutlicher unterschieden sich die Gruppen hinsichtlich der Abklingzeit der Fura-Ratios (Abbildung 18C). Bereits in den gemittelten Zeitverläufen (Abbildung 16B) deuteten sich Unterschiede zwischen den Abtötungsarten an, die sich auch in der Einzelzellanalyse bestätigten. NK-Zellen, die eine Nekrose auslösten, zeigten kurze Abklingzeiten mit geringer Streuung und einem Median von etwa 6 Minuten. Bei Mixed-Killing lag der Median bei etwa 11 Minuten, während apoptotische Abtötungsereignisse deutlich stärker streuten und eine mediane Abklingzeit von etwa 17 Minuten aufwiesen. NK-Zellen mit Kontakt ohne Zielzellsterben hatten mit etwa 23 Minuten die längsten Abklingzeiten.

Die ANOVA ergab einen signifikanten Gesamteffekt zwischen den Gruppen. In der Post-hoc-Analyse gab es signifikante Unterschiede sowohl zwischen Nekrose und Apoptose als auch zwischen Nekrose und Kontakt ohne Kill sowie zwischen Mixed-Killing und Kontakt ohne Kill. Keine signifikanten Unterschiede wurden zwischen Apoptose und Mixed-Killing sowie zwischen Apoptose und Kontakt ohne Kill festgestellt.

Da für einen Teil der NK-Zellen innerhalb der maximalen Beobachtungsdauer keine Abklingzeit bestimmt werden konnte, wurde ergänzend ein Histogramm erstellt, in dem diese Zellen der Kategorie „>35 Minuten“ zugeordnet wurden (Abbildung 18D).

Während die meisten nekrotischen Abtötungsereignisse sehr kurze Abklingzeiten aufwiesen, verschob sich die Verteilung bei Mixed-Killing in Richtung längerer Signaldauer. Bei apoptotischen Abtötungsereignissen sowie bei Kontakten ohne Zielzellsterben zeigte sich

Kapitel 3 Ergebnisse

zudem ein Anteil von etwa 12 % beziehungsweise 20 % der NK-Zellen, deren Ca^{2+} -Signal innerhalb des Beobachtungszeitraums nicht auf den definierten Abklingwert zurückfiel.

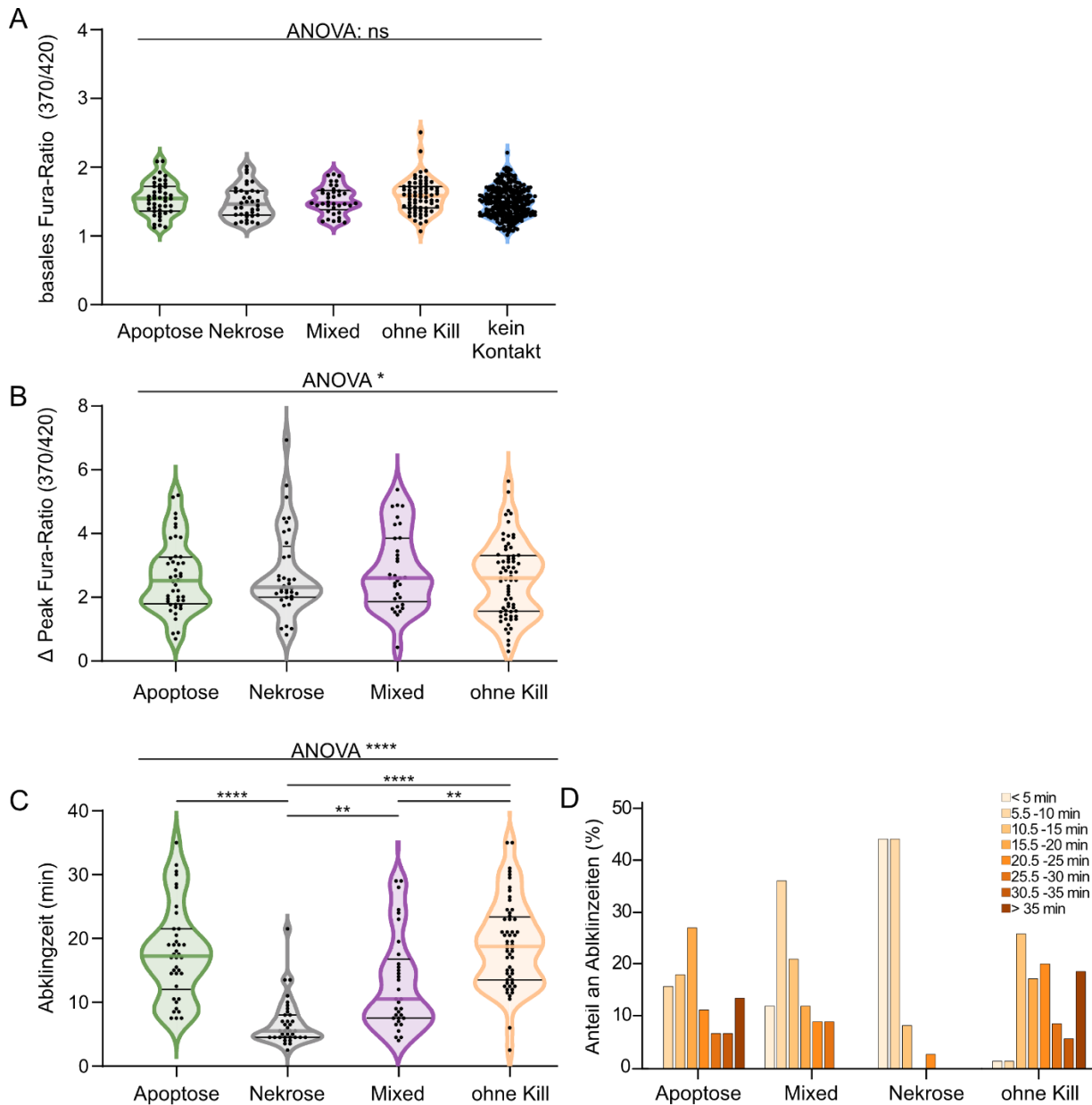


Abbildung 18: Einzelzellanalyse der Ca^{2+} -Signale von NK-Zellen während der Interaktion mit K562-Zellen.

Dargestellt sind Fura-Ratio-basierte Parameter einzelner NK-Zellen, aufgetragen als Violinplots mit überlagerter Punktwolke der Einzelzellen. Die Daten sind nach dem Zielzellschicksal gruppiert. (A) Basales Fura-Ratio der NK-Zellen vor Zielzellkontakt. (B) Δ Peak-Fura-Ratio der NK-Zellen, (C) Abklingzeit der Ca^{2+} -Signale. Der Median ist als farbiger Balken dargestellt, die Quartile schwarz. (D) Histogramm der Abklingzeiten zur Darstellung der vollständigen Verteilung der Signaldauern. $n=34-278$; $N=5$. One-way ANOVA (Kruskal-Wallis Test).

Um den beobachteten Unterschied in den Abklingzeiten der Ca^{2+} -Signale weiter zu untersuchen, wurde zusätzlich die Killzeit analysiert, also die Zeitspanne zwischen dem ersten Kontakt von Zielzelle und NK-Zelle und dem Zeitpunkt des Zielzelltods. Der Zeitpunkt des Zielzelltods wurde anhand von Fluoreszenzsignalen sowie charakteristischen morphologischen Veränderungen der Zielzellen manuell bestimmt. In Abbildung 19A sind die Zeiten aufgetragen

und nach Abtötungsart getrennt. Apoptosen dauerten signifikant länger als Mixed-Killings, während diese wiederum deutlich länger dauerten als Nekrosen. Insgesamt zeigt sich somit eine ähnliche Rangfolge der Zeiten wie zuvor bei den Abklingzeiten der Ca^{2+} -Signale.

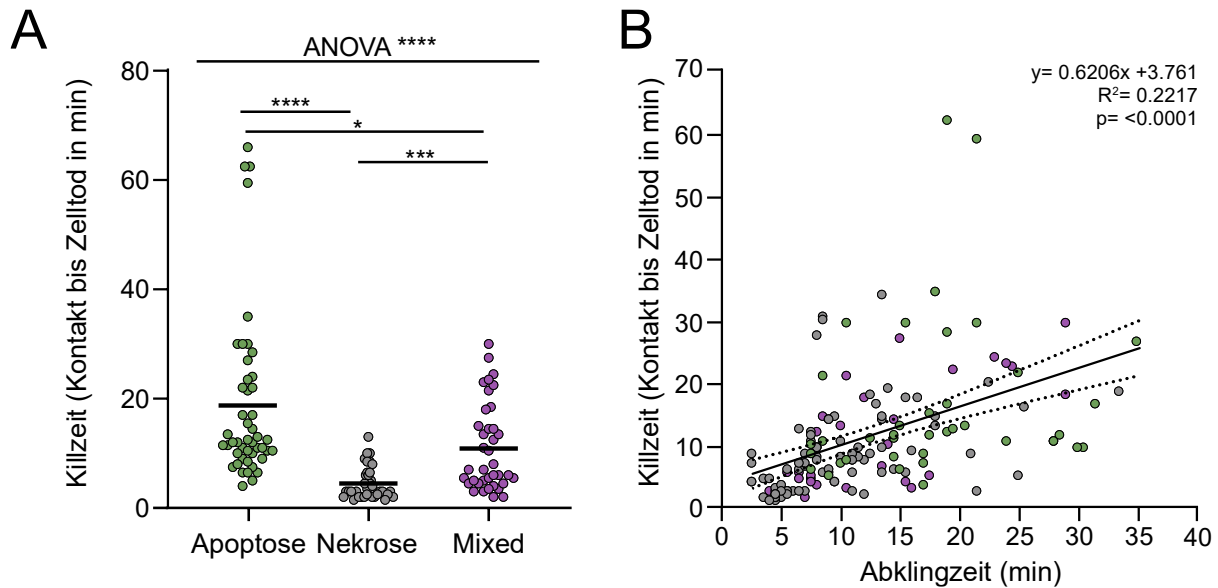


Abbildung 19: Zusammenhang zwischen Dauer des Zielzellerstbens (Killzeit) und Ca^{2+} -Signalabklingzeit.

(A) Killzeit einzelner K562-Zielzellen, definiert als Zeitspanne zwischen dem ersten Kontakt von NK-Zelle und Zielzelle und dem Zeitpunkt des Zielzelltods. Die Daten sind nach dem Zielzellschicksal gruppiert und als Punktwolke dargestellt; schwarze Querbalken zeigen den Mittelwert. (B) Zusammenhang zwischen Abklingzeit des Ca^{2+} -Signals und Killzeit einzelner NK-Zellen. Jeder Punkt repräsentiert eine NK-Zelle. Farben kennzeichnen die unterschiedlichen Killingphänotypen. Die durchgezogene Linie zeigt die lineare Regressionsgerade mit dem 95 %- Konfidenzintervall (gepunktet). $n=155$; $N=5$.

Um zu untersuchen, ob ein direkter Zusammenhang zwischen der Abklingzeit des Ca^{2+} -Signals und der Killzeit besteht, wurden für jede NK-Zelle beide Parameter gegeneinander aufgetragen (Abbildung 19B). Die Punktwolke zeigt dabei eine Tendenz von links unten nach rechts oben. Eine lineare Regression bestätigt diesen visuellen Eindruck. Die Regressionsgerade beschreibt einen signifikanten positiven Zusammenhang zwischen beiden Parametern (Steigung > 0 , $p < 0,0001$). Allerdings erklärt das Modell nur einen begrenzten Anteil der Gesamtvarianz ($R^2 = 0,2217$), was darauf hinweist, dass neben der Killzeit weitere Faktoren die Dauer des Ca^{2+} -Signals beeinflussen.

Für die vorliegenden Analysen wurden NK-Zellen von fünf unabhängigen Spendern gepoolt. Um auszuschließen, dass mögliche Spenderunterschiede die beobachteten Ca^{2+} -Signale beeinflussen, wurden die $\Delta\text{Peak-Fura-Ratios}$ zusätzlich getrennt nach Spendern analysiert.

Die Ergebnisse sind in Abbildung 20 dargestellt. Jeder Punkt repräsentiert eine einzelne NK-Zelle, gruppiert nach Spender und Abtötungsart. Über alle Abtötungsarten hinweg zeigte sich kein konsistenter Unterschied und auch keinen statistischen Unterschied in den

Δ Peak-Werten zwischen den Spendern. Die beobachteten Unterschiede in den Ca^{2+} -Signalen lassen sich demnach nicht durch Spenderunterschiede erklären, sodass die Daten der fünf Spender für die weiteren Analysen gemeinsam ausgewertet wurden.

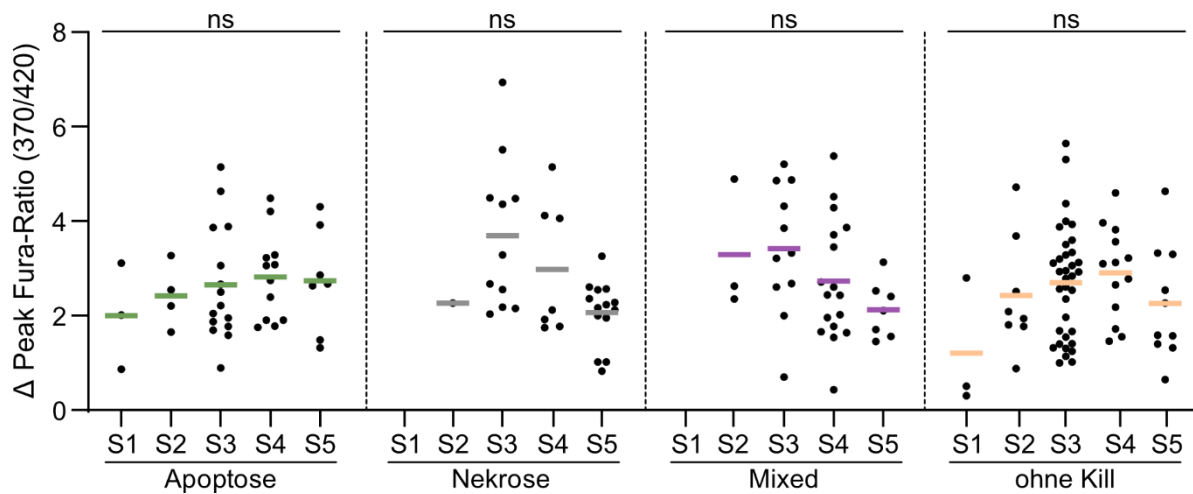


Abbildung 20: Analyse der Ca^{2+} -Peak-Amplituden gegen K562 getrennt nach NK-Zellspendern.

Dargestellt sind die Δ Peak-Fura-Ratios einzelner NK-Zellen während der Interaktion mit K562-Zielzellen, aufgeschlüsselt nach fünf unabhängigen Spendern. Jeder Punkt repräsentiert eine NK-Zelle; Querbalken zeigen den jeweiligen Mittelwert. Die Daten sind zusätzlich nach dem Zielzellschicksal (Apoptose, Nekrose, Mixed Phänotyp, Kontakt ohne Kill) gruppiert. One-way ANOVA (Kruskal-Wallis Test). $n=0-35$; $N=5$.

3.2.2 Auswirkung von CMA auf Ca^{2+} -Signale

Um zu untersuchen, ob die Dauer des Ca^{2+} -Signals mit dem tatsächlichen Zielzelltod oder bereits mit früheren Schritten der NK-Zellaktivierung assoziiert ist, wurde das perforinvermittelte Abtöten der Zielzellen experimentell blockiert (Abbildung 21A). Hierfür wurden NK-Zellen mit Concanamycin A (CMA) behandelt. CMA hemmt die V-ATPase der lytischen Vesikel in NK-Zellen, wodurch deren pH-Wert ansteigt und Perforin funktionell inaktiviert wird (Huss et al., 2002).

NK-Zellen wurden für vier Stunden mit CMA inkubiert und anschließend mit K562-Zielzellen kokultiviert. Wie in Abbildung 21B gezeigt, kam es unter diesen Bedingungen zu kaum Zielzellsterben. Da K562-Zellen keinen funktionellen Fas-Rezeptor exprimieren, können sie nicht über Fas-vermittelte Mechanismen getötet werden und lassen sich daher nur auf perforinabhängige Weise eliminieren. Vereinzelt Ereignisse von Zielzellsterben wurden zwar beobachtet, waren jedoch so selten, dass sie statistisch nicht ausgewertet werden konnten. Da auch ohne Kokultivierung mit NK-Zellen die Zielzellen zu einem kleinen Teil auf natürliche Weise sterben, kann davon ausgegangen werden, dass diese seltenen Events durch natürlichen Tod der Zelle erklärt werden können.

Kapitel 3 Ergebnisse

Insgesamt wurden 162 NK-Zellen ohne Zielzellkontakt sowie 82 NK-Zellen mit Zielzellkontakt, jedoch ohne anschließendes Zielzellsterben analysiert. Trotz der durch CMA blockierten Zytotoxizität zeigten NK-Zellen nach Zielzellkontakt weiterhin ausgeprägte Ca^{2+} -Signale, die anschließend langsam wieder abfielen (Abbildung 21C).

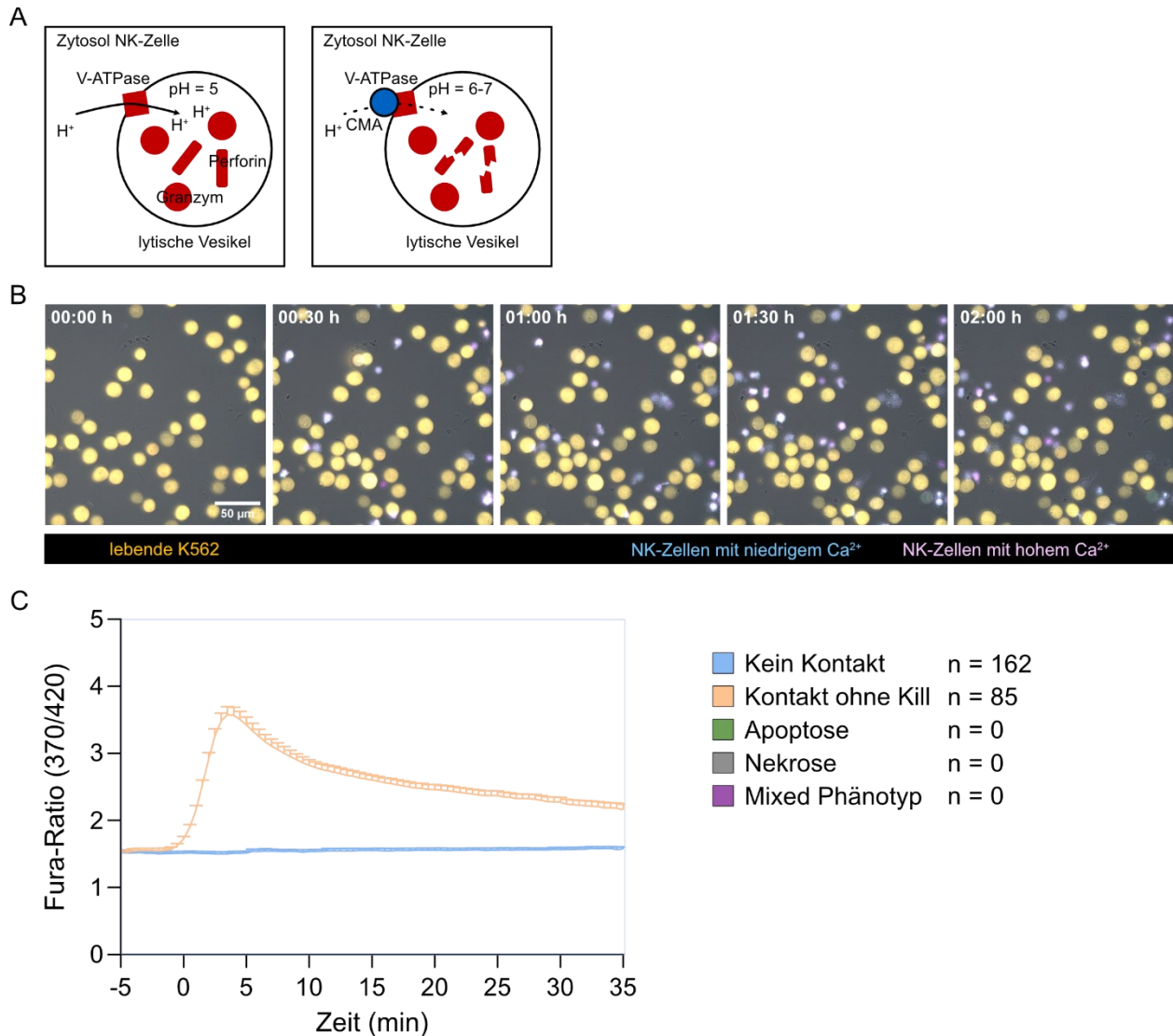


Abbildung 21: Auswirkung von CMA auf Zytotoxizität und Ca^{2+} -Signal der NK-Zellen gegen K562

(A) Schematische Darstellung des Wirkmechanismus von CMA. Durch Hemmung der V-ATPase steigt der pH-Wert in lytischen Vesikeln an, wodurch Perforin inaktiviert wird. (B) Repräsentative Bildausschnitte von NK-Zellen in Kokultur mit K562-Zielzellen nach CMA-Behandlung. Im Gegensatz zur Kontrollbedingung kommt es zu keinem Zielzellsterben. Maßstabsbalken = 50 μm . (C) Gemittelte Ca^{2+} -Signalverläufe einzelner NK-Zellen nach Zielzellkontakt unter CMA-Behandlung. Maßstabsbalken: 50 μm . $N=4$.

Die quantitative Analyse der Ca^{2+} -Parameter ist in Abbildung 22 dargestellt. Das basale Fura-Ratio der CMA-behandelten NK-Zellen entsprach dem der Kontrollzellen (Abbildung 22A; Kontrollgruppe identisch mit Abbildung 18) und zeigte keinen signifikanten Unterschied

Kapitel 3 Ergebnisse

zwischen den Gruppen. Auch die ΔPeak -Amplitude unterschied sich nicht signifikant zwischen CMA-behandelten NK-Zellen und den verschiedenen Abtötungsarten der Kontrollbedingungen (Abbildung 22B).

Ein ähnliches Bild zeigte sich für die Abklingzeit der Ca^{2+} -Signale. Die Abklingzeiten der CMA-behandelten NK-Zellen lagen im gleichen Bereich wie diejenigen der Kontrollbedingung, die Kontakt mit Zielzellen hatten, ohne diese abzutöten und unterschieden sich statistisch nicht signifikant von dieser Gruppe (Abbildung 22C).

Die Histogrammverteilung der Abklingzeiten zeigte unter CMA-Behandlung einen leicht erhöhten Anteil von NK-Zellen mit raschem Signalabfall. Insgesamt ähnelte die Verteilung jedoch der Kontrollbedingung ohne Zielzellsterben.

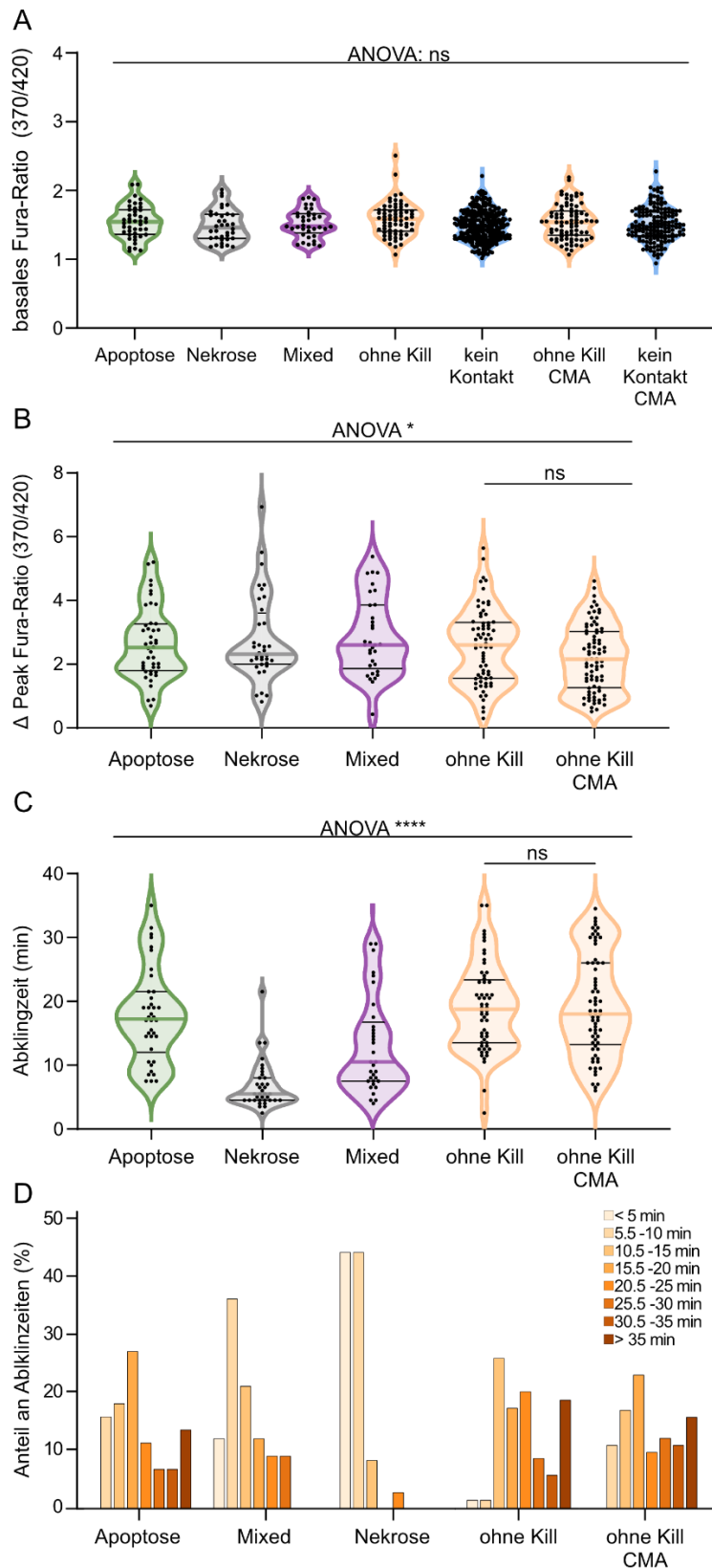


Abbildung 22: Ca^{2+} -Signale von CMA-behandelten NK-Zellen während der Interaktion mit K562-Zielzellen
 Dargestellt sind Fura-Ratio-basierte Parameter einzelner NK-Zellen, aufgetragen als Violinplots mit überlagerter Punktwolke der Einzelzellen. Die Daten sind nach dem Zielzellschicksal gruppiert. (A) Basales Fura-Ratio der NK-Zellen vor Zielzellkontakt. (B) $\Delta \text{Peak Fura-Ratio}$ der NK-Zellen, (C) Abklingzeit der Ca^{2+} -Signale. Der Median ist als farbiger Balken dargestellt, die Quartile schwarz. (D) Histogramm der Abklingzeiten zur Darstellung der vollständigen Verteilung der Signaldauern. $N=34-278$; $N=4-5$. One-way ANOVA (Kruskal-Wallis Test).

Kapitel 3 Ergebnisse

Zusätzlich wurde untersucht, ob die Δ Peak-Höhen zwischen den einzelnen Spendern variieren. Wie bereits zuvor beobachtet, zeigte sich auch unter CMA-Behandlung kein signifikanter Einfluss der Spenderherkunft auf die Ca^{2+} -Peak-Amplitude (Abbildung 23).

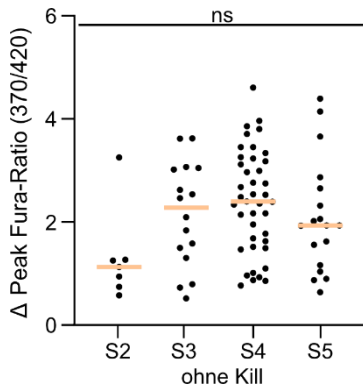


Abbildung 23: Analyse der Ca^{2+} -Peaks von CMA-behandelten NK-Zellen gegen K562 getrennt nach NK-Zellspendern
Dargestellt sind die Δ Peak-Fura-Ratios einzelner CMA-behandelter NK-Zellen während der Interaktion mit K562-Zielzellen, aufgeschlüsselt nach vier unabhängigen Spendern. Jeder Punkt repräsentiert eine NK-Zelle; Querbalken zeigen den jeweiligen Mittelwert. Da nur Kontakte ohne Kill analysiert wurden, ist ausschließlich diese Kategorie dargestellt. One-way ANOVA (Kruskal-Wallis Test). $n=7-42$; $N=4$.

Die Experimente zeigen, dass die Ca^{2+} -Signale der NK-Zellen auch dann auftreten und eine ähnliche Dynamik aufweisen, wenn der Perforin-vermittelte Zielzelltod pharmakologisch blockiert ist.

3.2.3 Ca^{2+} -Signale bei antikörperabhängiger Zytotoxizität

NK-Zellen können Zielzellen nicht nur über aktivierende Oberflächenrezeptoren erkennen und abtöten, sondern auch antikörperabhängig. In der Erstlinientherapie von Patienten mit diffus großzelligem B-Zell-Lymphom (DLBCL) wird hierfür der monoklonale Antikörper Rituximab eingesetzt. Rituximab bindet an CD20 auf der Oberfläche von B-Zellen und gleichzeitig über seinen Fc-Teil an CD16 ($\text{Fc}\gamma\text{RIII}$) auf NK-Zellen. Dadurch wird die antikörperabhängige zellvermittelte Zytotoxizität (ADCC) ausgelöst. Als Modell hierfür wird u.a. die CD20-positive Zielzelllinie TMD8 eingesetzt, die mittels Rituximab von NK-Zellen antikörperabhängig getötet wird (Abbildung 24A).

In Abbildung 24B ist ein beispielhaftes Experiment über einen Zeitraum von 2h gezeigt, in dem NK-Zellen ohne Rituximab mit TMD8 Zellen kokultiviert wurden. Obwohl kein Antikörper vorhanden war, wurden auch unter diesen Bedingungen Zielzellen abgetötet, was aufgrund der natürlichen Zytotoxizität der NK-Zellen erwartbar war.

Kapitel 3 Ergebnisse

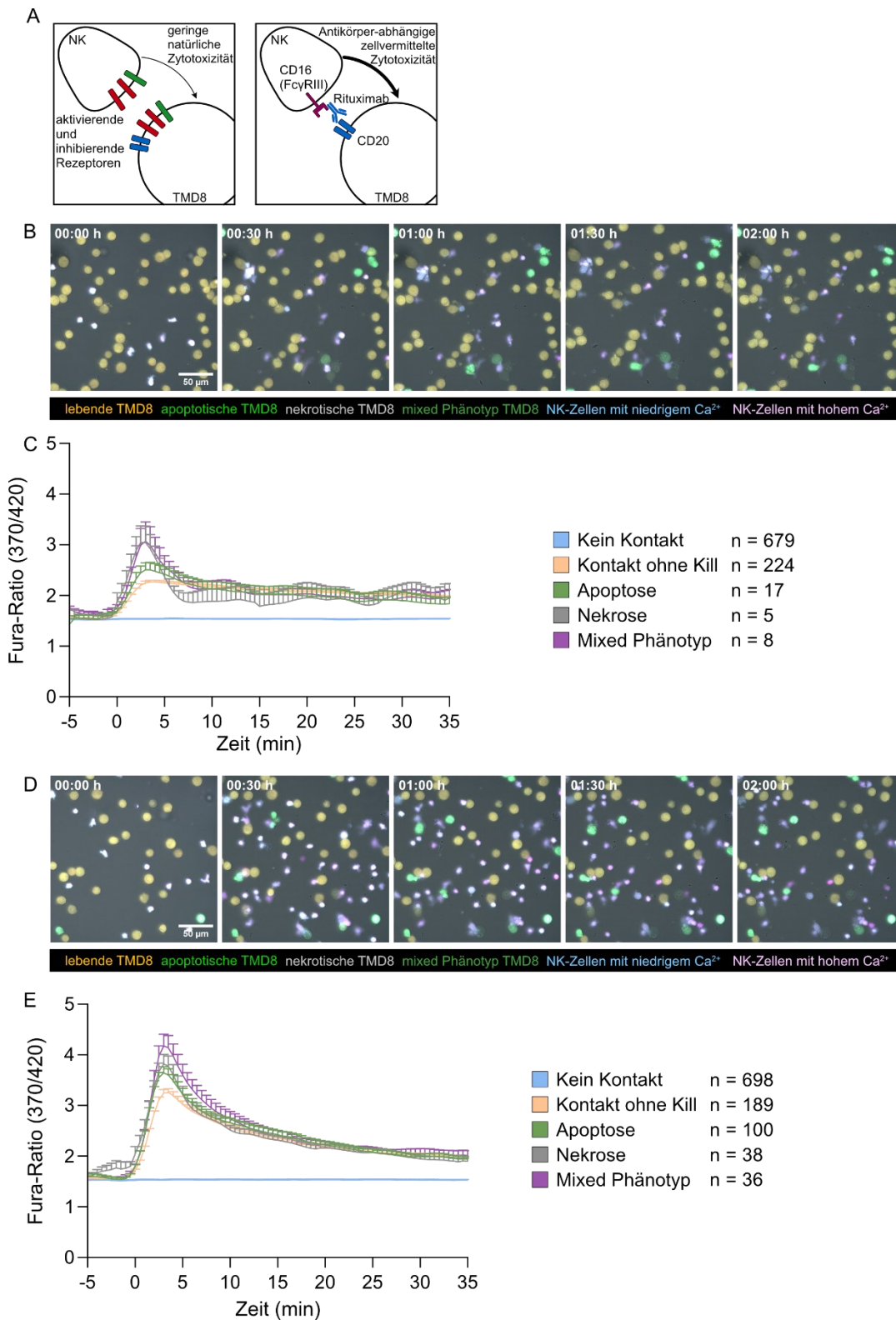


Abbildung 24: Zytotoxizität und Ca^{2+} -Signale von NK-Zellen gegen TMD8-Zielzellen mit und ohne Rituximab.

(A) Schematische Darstellung der natürlichen (links) sowie der antikörperabhängigen zellvermittelten Zytotoxizität (ADCC, rechts). Rituximab bindet an CD20 auf der Zielzelle und über seinen Fc-Teil an CD16 ($\text{Fc}\gamma\text{RIII}$) auf NK-Zellen und aktiviert dadurch die NK-Zelle. (B) Repräsentative Mikroskopieaufnahmen einer Kokultur von NK-Zellen mit TMD8-Zielzellen ohne Rituximab. (C) Gemittelte Fura-Ratio-Zeitverläufe der NK-Zellen während der Interaktion mit TMD8-Zielzellen ohne Rituximab, gruppiert nach Zielzellschicksal. (D) Repräsentative Mikroskopieaufnahmen einer Kokultur von NK-Zellen mit TMD8-Zielzellen in Anwesenheit von Rituximab. (E) Gemittelte Fura-Ratio-Zeitverläufe der NK-Zellen während der Interaktion mit TMD8-Zielzellen in Anwesenheit von Rituximab, gruppiert nach Zielzellschicksal. Maßstabsbalken: 50 μm . $N=6$.

Kapitel 3 Ergebnisse

In den gemittelten Ca^{2+} -Signalen (Abbildung 24C) zeigten NK-Zellen ohne Zielzellkontakt ($n = 440$) ein stabiles basales Ca^{2+} -Signal ohne erkennbare Veränderungen. NK-Zellen mit Kontakt ohne anschließendes Zielzellsterben ($n = 223$) zeigten leicht erhöhte und länger anhaltende Ca^{2+} -Signale. Apoptotische Killing-Ereignisse ($n = 16$) wiesen höhere Signale auf, während Nekrosen ($n = 4$) und Mixed-Killing ($n = 8$) ähnliche maximale Signalthöhen erreichten, wobei nekrotische Ereignisse tendenziell schneller abklangen.

In Abbildung 24D ist ein entsprechendes Experiment unter Zugabe von Rituximab dargestellt. Unter diesen Bedingungen war die Zytotoxizität deutlich erhöht. Die gemittelten Ca^{2+} -Signale der NK-Zellen sind in Abbildung 24E dargestellt. Auch hier hatten NK-Zellen ohne Zielzellkontakt ($n = 451$) ein stabiles basales Signal um etwa 1,5. Die Ca^{2+} -Peaks der NK-Zellen mit Zielzellkontakt (ohne Kill ($n=187$), Apoptose ($n=177$), Nekrose ($n=37$) und Mixed ($n=36$)) lagen jedoch insgesamt höher als in der Kontrollbedingung ohne Rituximab und unterschieden sich weniger stark innerhalb der Abtötungsarten.

Die Analyse der Ca^{2+} -Signale auf Einzelzellebene ist in Abbildung 25 dargestellt. Das basale Fura-Ratio unterschied sich weder zwischen Rituximab- und Kontrollbedingung noch zwischen den verschiedenen Abtötungsarten und lag, wie bei den Experimenten mit K562-Zellen, bei etwa 1,5 (Abbildung 25A).

Für die ΔPeak -Höhe zeigte sich ein signifikanter Effekt in der Rituximab-Behandlung. In der Post-hoc-Analyse waren die Ca^{2+} -Peaks unter Rituximab für Apoptosen, Mixed Phänotyp sowie Kontakte ohne Kill jeweils signifikant höher als in der entsprechenden Kontrollbedingung. Für nekrotische Killing-Ereignisse ergab sich hingegen kein signifikanter Unterschied.

Zusätzlich zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen den Abtötungsarten, der aber ausschließlich innerhalb der Rituximab-Bedingung auftrat. Dabei wiesen NK-Zellen ohne Kill signifikant niedrigere Ca^{2+} -Peaks auf als Zellen, die apoptotisches oder Mixed Phänotyp verursachten (Abbildung 25B).

Für die Abklingzeiten ergab sich kein signifikanter Unterschied zwischen Rituximab- und Kontrollbedingung ($p = 0,56$). Zwischen den Abtötungsarten gab es jedoch einen signifikanten Gesamteffekt. Unter Rituximab waren die Abklingzeiten bei Apoptosen signifikant länger als bei Nekrosen. Zudem unterschieden sich Apoptosen, Nekrosen und Mixed Phänotyp jeweils signifikant von Kontakten ohne Zielzellsterben, während zwischen Apoptose und Mixed sowie zwischen Nekrose und Mixed keine signifikanten Unterschiede bestanden (Abbildung 25C).

Kapitel 3 Ergebnisse

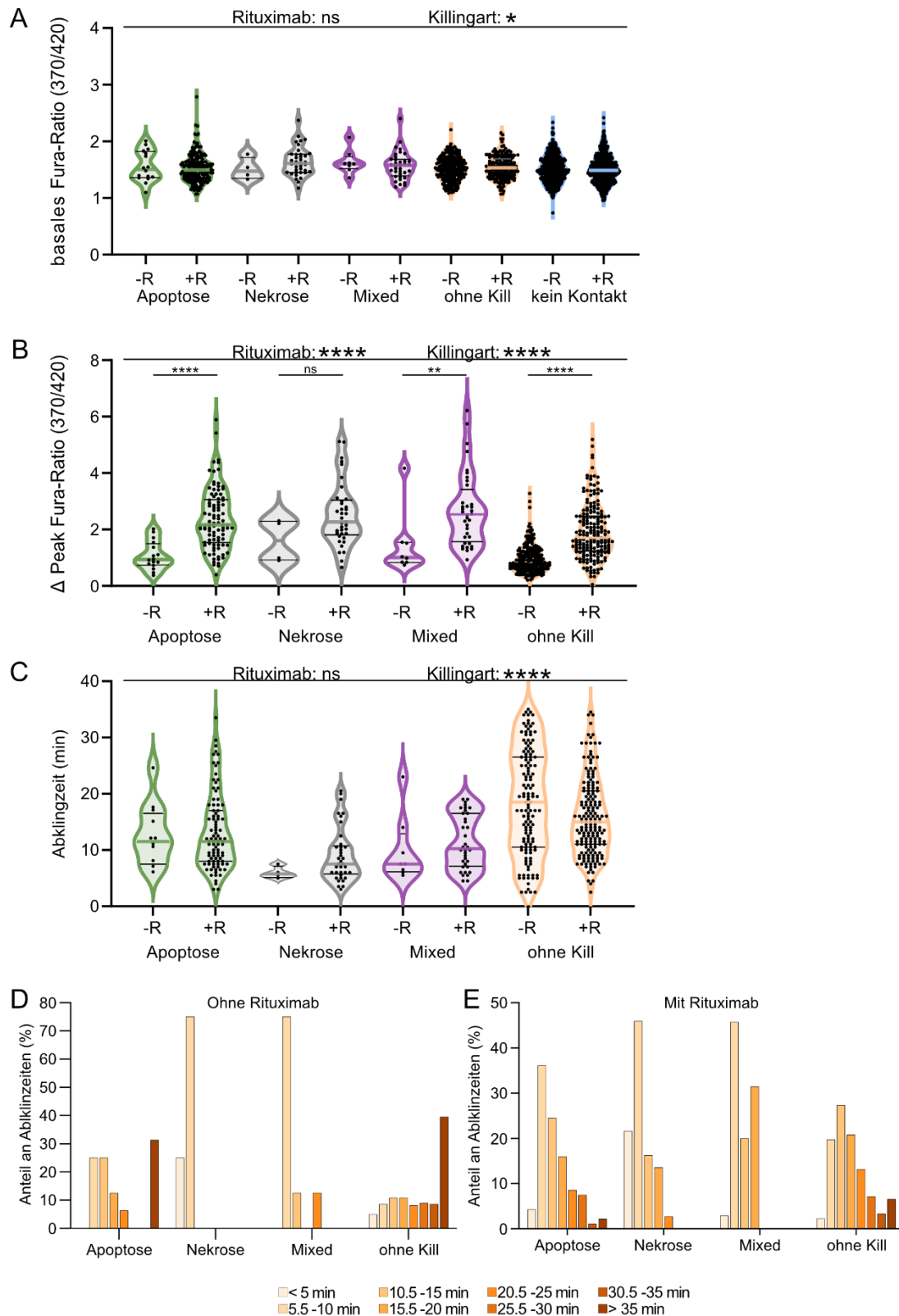


Abbildung 25: Einzelzellanalyse der Ca^{2+} -Signale von NK-Zellen gegen TMD8-Zielzellen mit und ohne Rituximab.

Dargestellt sind Fura-Ratio-basierte Parameter einzelner NK-Zellen aufgetragen als Violinplots mit überlagerter Punktwolke der Einzelzellen von NK-Zellen mit Rituximabzugabe (+R) und ohne Rituximabzugabe (-R). Die Daten sind nach dem Zielzellschicksal gruppiert. (A) Basales Fura-Ratio der NK-Zellen vor Zielzellkontakt. (B) Δ Peak-Fura-Ratio der NK-Zellen, (C) Abklingzeit der Ca^{2+} -Signale. Der Einfluss der Rituximab-Gabe sowie des Killingphänotyps wurde mittels zweifaktorieller ANOVA analysiert. In der Abbildung sind die Ergebnisse der ANOVA sowie die Post-hoc-Vergleiche zwischen Rituximab- und Kontrollbedingung dargestellt. (D, E) Histogramme der Abklingzeiten zur Darstellung der vollständigen Verteilung der Signaldauern. (D) ohne Rituximab, (E) mit Rituximab. $N=6$, $n= 5-698$.

Kapitel 3 Ergebnisse

Dieses Muster entspricht weitgehend den zuvor für K562-Zielzellen ohne CMA beobachteten Abklingzeiten. In der Kontrollbedingung ohne Rituximab zeigte sich lediglich ein signifikanter Unterschied zwischen Nekrosen und Kontakten ohne Zielzellsterben, wobei nekrotische Killing-Ereignisse deutlich kürzere Abklingzeiten aufwiesen. Dabei ist zu berücksichtigen, dass ohne Rituximab nur sehr wenige NK-Zellen eine Zielzelle abtöteten.

Die Histogramme verdeutlichen zudem, dass ohne Rituximab ein großer Anteil der NK-Zellen nach Kontakt ohne Zielzellsterben länger als die maximale Beobachtungsdauer benötigte, bis das Ca^{2+} -Signal wieder abfiel (Abbildung 25D).

Auch für TMD8-Zielzellen aus der Rituximab-Bedingung wurde die Killzeit analysiert (Abbildung 26A). Es zeigte sich, dass apoptotische Killing-Ereignisse signifikant länger dauerten als Mixed-Killing, während Mixed-Killing wiederum länger dauerte als nekrotisches Abtöten. Dieses Muster entsprach damit weitgehend den zuvor für K562 beobachteten Ergebnissen. Für diese Analyse wurden ausschließlich Bedingungen mit Rituximab berücksichtigt.

Der Zusammenhang zwischen Killzeit und Abklingzeit des Ca^{2+} -Signals ist in Abbildung 26B dargestellt. Auch hier zeigte sich eine statistisch signifikante positive Korrelation zwischen beiden Parametern, die jedoch deutlich schwächer ausgeprägt war als bei K562-Zielzellen ($R^2 = 0,0455$).

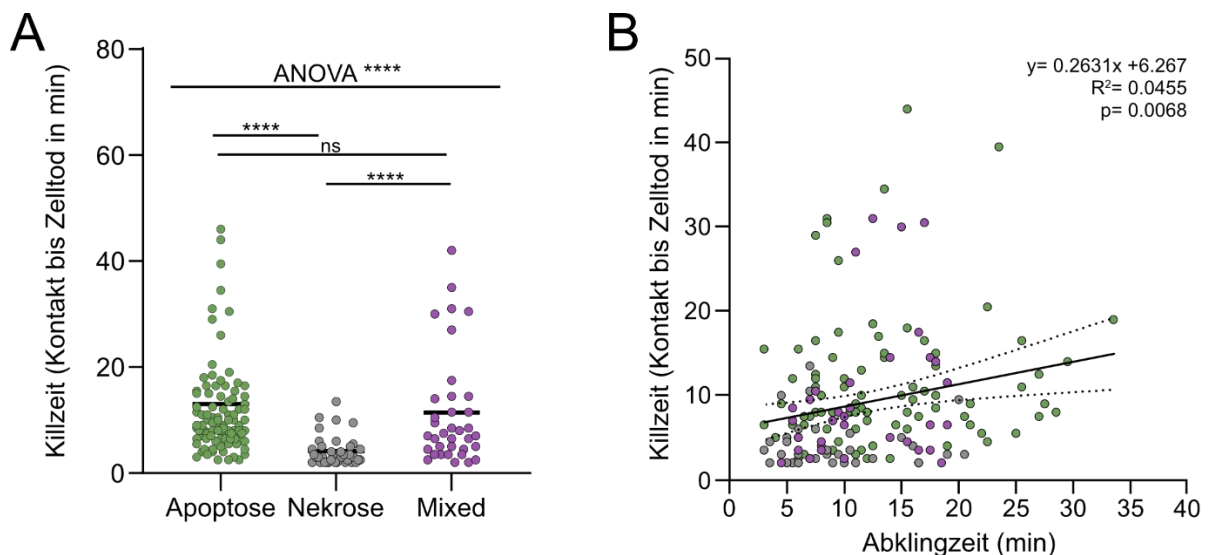


Abbildung 26: Zusammenhang zwischen Dauer des Zielzellsterbens (Killzeit) und Ca^{2+} -Signalabklingzeit bei TMD8-Zellen. (A) Killzeit einzelner TMD8-Zielzellen, definiert als Zeitspanne zwischen dem ersten Kontakt von NK-Zelle und Zielzelle und dem Zeitpunkt des Zielzelltods. Es wurden nur TMD8-Zellen aus der Rituximab Bedingung analysiert. Die Daten sind nach dem Zielzellschicksal gruppiert und als Punktwolke dargestellt; der Mittelwert ist zusätzlich angegeben (schwarze Linie). (B) Zusammenhang zwischen Abklingzeit des Ca^{2+} -Signals und Killzeit einzelner NK-Zellen. Jeder Punkt repräsentiert eine NK-Zelle. Farben kennzeichnen die unterschiedlichen Killing-Phänotypen. Die durchgezogene Linie zeigt die lineare Regressionsgerade mit dem 95 %- Konfidenzintervall (gepunktet). $n=160$; $N=6$.

Kapitel 3 Ergebnisse

Schließlich wurde untersucht, ob die Ca^{2+} -Peak-Amplituden zwischen den einzelnen Spendern variieren. Weder in der Kontrollbedingung ohne Rituximab (Abbildung 27A) noch in der Rituximab-Bedingung (Abbildung 27B) gab es einen signifikanten Unterschied zwischen den Spendern. Daher konnten die Daten aller sechs Spender für die weiteren Analysen gepoolt werden.

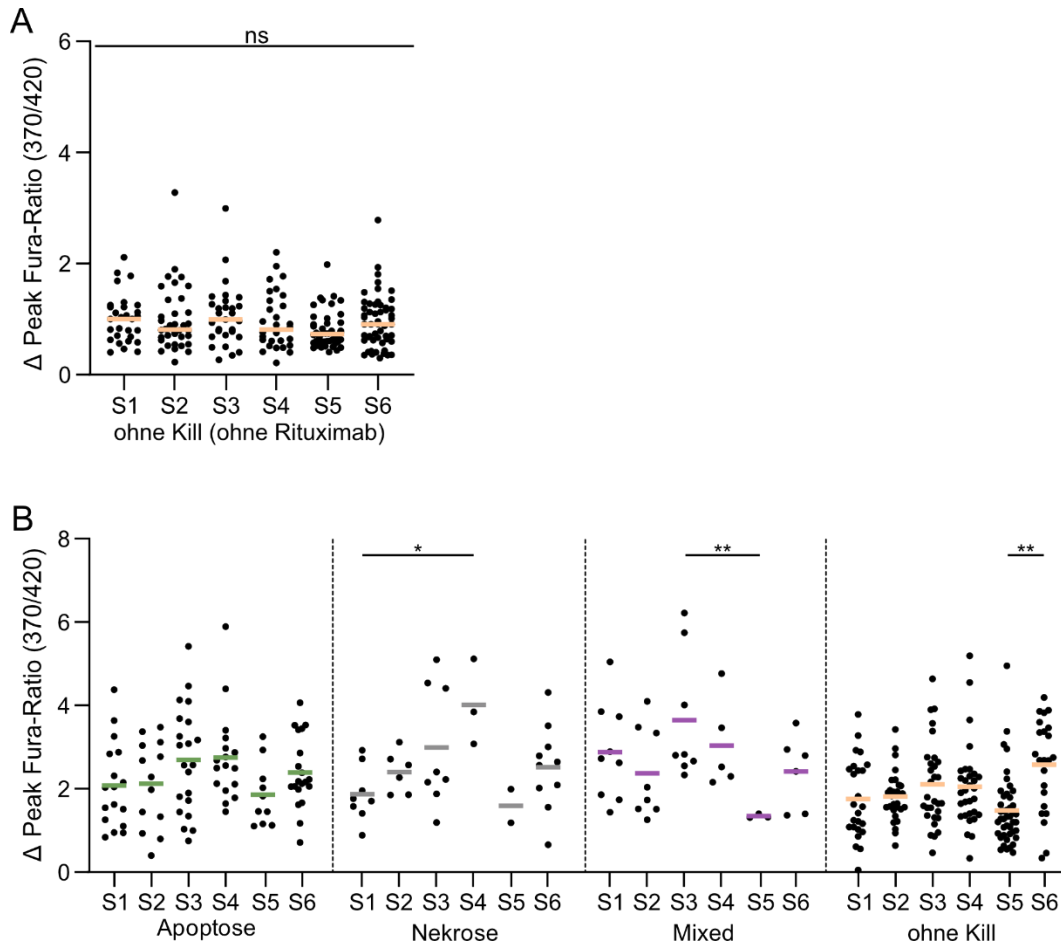


Abbildung 27: Analyse der Ca^{2+} -Peak-Amplituden gegen TMD8 getrennt nach NK-Zellspendern

Dargestellt sind die $\Delta\text{Peak-Fura-Ratios}$ einzelner NK-Zellen während der Interaktion mit TMD8-Zielzellen, aufgeschlüsselt nach sechs unabhängigen Spendern. Jeder Punkt repräsentiert eine NK-Zelle; Querbalken zeigen den jeweiligen Mittelwert. Die Daten sind zusätzlich nach dem Zielzellschicksal (Apoptose, Nekrose, Mixed Phänotyp, Kontakt ohne Kill) gruppiert. One-way ANOVA (Kruskal-Wallis Test). $n=2-53$; $N=6$.

Zusammenfassend legen diese Experimente nahe, dass die Höhe des Ca^{2+} -Signals nicht eindeutig mit der Art des Zielzelltods korrelierte, während die Dauer des Signals stärker mit dem zeitlichen Verlauf des Zielzellsterbens assoziiert war. Dieses Muster zeigte sich sowohl bei der natürlichen Zytotoxizität gegenüber K562-Zellen als auch unter antikörpervermittelter Aktivierung durch Rituximab.

3.3 Analyse von Zytotoxizität und Ca^{2+} -Signalen in CAR NK-Zellen

Im Rahmen einer Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Evelyn Ullrich (Universitätsklinikum Frankfurt) wurden CD19-spezifische CAR NK-Zellen hinsichtlich ihrer zytotoxischen Eigenschaften und Ca^{2+} -Signalgebung untersucht. Die Generierung, Kultivierung und grundlegende Charakterisierung der CAR NK-Zellen erfolgten in Frankfurt maßgeblich durch Alina Moter. Die in dieser Arbeit dargestellten funktionellen Einzelzell- und Ca^{2+} -Analysen wurden in Homburg in Zusammenarbeit mit Nadja KÜchler und Alina Moter durchgeführt, die graphische Darstellung und Statistik wurde ebenfalls gemeinsam erstellt. Ziel war es, die zuvor etablierten Methoden zur Messung intrazellulärer Ca^{2+} -Signale und zur Einzelzell-Analyse des Zielzellsterbens auf ein CAR NK-Modellsystem zu übertragen und den Einfluss der CAR-Expression auf Zytotoxizität und Ca^{2+} -Dynamik zu untersuchen.

3.3.1 Untersuchung der Zytotoxizität von CAR NK-Zellen

Um funktionelle Unterschiede zwischen CD19-CAR NK-Zellen und nicht-transduzierten NK-Zellen (NT NK) zunächst auf Populationsebene zu erfassen, wurde ein populationsbasierter Zytotoxizitätsassay durchgeführt (Abbildung 28).

Abbildung 28A zeigt schematisch das Prinzip der CAR-vermittelten Zytotoxizität von CAR NK-Zellen gegenüber CD19-positiven NALM-6-Zielzellen. Die spezifische Erkennung des CD19-Antigens erfolgte über den chimären Antigenrezeptor und war mit einer verstärkten Zytotoxizität gegenüber NALM-6-Zellen assoziiert.

Zur Analyse der natürlichen Zytotoxizität ist in Abbildung 28B die Zytotoxizität von NK-Zellen gegenüber CD19-negativen K562-Zellen dargestellt. In diesem Fall erfolgt die Aktivierung der NK-Zellen nicht über den CAR, sondern über das Zusammenspiel aktivierender und inhibierender Rezeptoren.

Zur funktionellen Validierung dieser beiden Mechanismen wurde die Zytotoxizität von CAR NK-Zellen und NT NK-Zellen gegenüber NALM-6-Zielzellen in einem Calcein-basierten Zytotoxizitäts-Assay untersucht (Abbildung 28C). Über den Beobachtungszeitraum von vier Stunden zeigte sich eine stärkere Lyse in der CAR NK-Bedingung im Vergleich zu NT NK-Zellen. Die Quantifizierung des Endpunkts nach vier Stunden bestätigte diesen Befund (Abbildung 28D). Im Mittel lysierten CAR NK-Zellen etwa 55 % der NALM-6, während NT NK-Zellen nur etwa 27 % erreichten. Der Unterschied ist statistisch signifikant.

Kapitel 3 Ergebnisse

Im Gegensatz dazu zeigte sich bei der Analyse der Zytotoxizität gegenüber der CD19-negativen Zielzelllinie K562 kein relevanter Unterschied zwischen CAR NK-Zellen und NT NK-Zellen. Sowohl der zeitliche Verlauf des Zytotoxizitäts-Assays (Abbildung 28E) als auch die Quantifizierung der Endpunktyse (Abbildung 28F) ergaben vergleichbare Lyseraten von etwa 85 % in beiden Bedingungen.

Aus diesen Ergebnissen lässt sich ableiten, dass CAR NK und NT NK-Zellen über die gleiche natürliche Zytotoxizität verfügen, die CAR NK-Zellen aber, wie erhofft, zusätzlich eine rezeptorbasierte Zytotoxizität gegen CD19-positive Zielzellen auslösen.

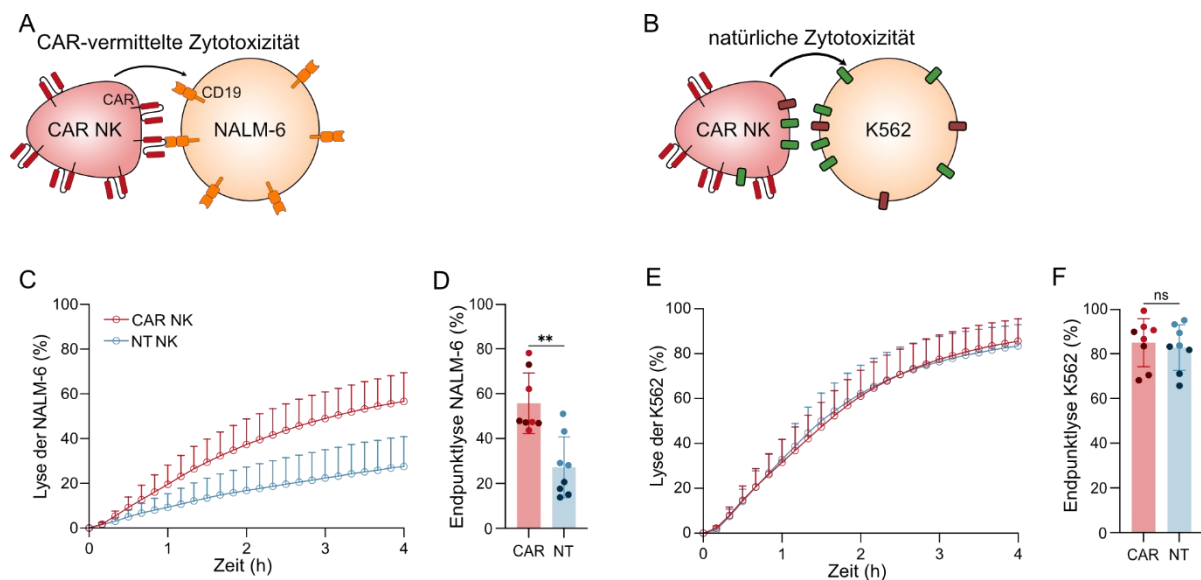


Abbildung 28: Zytotoxizität von CAR NK und NT NK-Zellen gegen NALM-6 und K562.

(A, B) Schematische Darstellung der CAR-vermittelten Zytotoxizität von CD19-CAR NK-Zellen gegenüber CD19-positiven NALM-6-Zielzellen (A) sowie CD19-negativen K562-Zielzellen (B). Die spezifische Erkennung des CD19-Antigens bei NALM-6-Zellen erfolgt über den chimären Antigenrezeptor und führt zu einer antigenabhängigen Aktivierung der NK-Zelle. (C) Zeitverlauf eines populationsbasierten Calcein-AM-Zytotoxizitätsassays von CAR NK-Zellen und nicht-transduzierten NK-Zellen (NT NK) gegenüber NALM-6-Zielzellen. (D) Quantifizierung der Endpunktyse nach 4 Stunden. (E) Zeitverlauf eines populationsbasierten Calcein-AM-Zytotoxizitätsassays von CAR NK- und NT NK-Zellen gegenüber K562-Zielzellen. (F) Quantifizierung der Endpunktyse nach 4 Stunden. Daten sind als Mittelwert $\pm$ SD dargestellt, einzelne Punkte repräsentieren Spender ($N=8$; 4 sortierte NK-Populationen (hell), 4 nicht sortierte NK-Populationen (dunkel)). Statistische Analyse mit Wilcoxon Test. Die CAR NK- und NT NK-Zellen wurden in Frankfurt durch Alina Moter generiert und kultiviert. Zellkultur und funktionelle Assays wurden in Homburg hauptsächlich von Nadja Küchler und mir durchgeführt, unterstützt durch Alina Moter. Statistik und graphische Darstellung wurde von Nadja Küchler erstellt, Alina Moter und ich haben unterstützt. Modifiziert übernommen aus Kaschek*, Moter*, Küchler* et al. (in Vorbereitung).

Um die Zytotoxizität der CAR NK-Zellen auf Einzelzelebene zu untersuchen, wurden NALM-6 und K562 mit pCasper-Expression verwendet. In Abbildung 29A ist in einer hochaufgelösten Bildreihe der Kontakt zwischen je einer CAR NK-Zelle und einer NT NK-Zelle mit NALM6 abgebildet. Die Membran der NK-Zelle wurde mittels CD56-Antikörper markiert (blau) und der CAR-Rezeptor mit einem CAR-spezifischen Antikörper (rot). In dem

Kapitel 3 Ergebnisse

gezeigten Beispiel war bei den CAR NK-Zellen eine enge Synapsenbildung mit NALM-6-Zellen zu beobachten, gefolgt von apoptotischem Zielzellsterben. Anschließend ging die CAR NK-Zelle einen weiteren Kontakt mit einer benachbarten Zielzelle ein, ohne dass innerhalb des Beobachtungszeitraums ein weiteres Killing-Ereignis durchgeführt wurde. Die dargestellte NT NK-Zelle bildete wie die CAR NK-Zelle einen stabilen Kontakt mit einer NALM-6-Zelle aus, allerdings starb in diesem repräsentativen Beispiel die Zielzelle nicht.

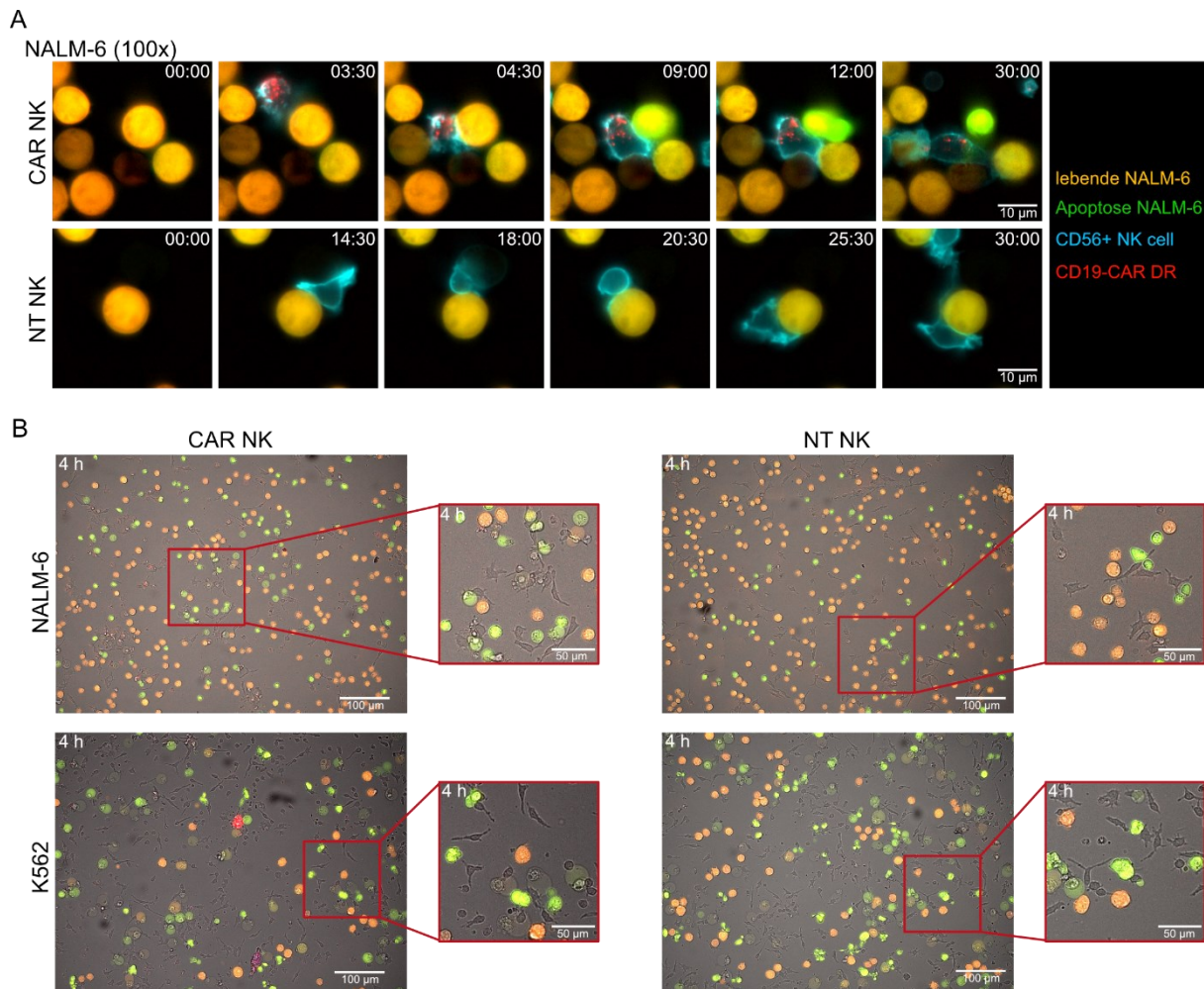


Abbildung 29: Einzelzell- und Übersichtsaufnahmen der Interaktion von CAR NK- und NT NK-Zellen mit NALM-6 sowie K562 Zellen

A) Hochaufgelöste Live-Cell-Imaging Aufnahmen (100x) einer CAR NK-Zelle (oben) und einer NT NK-Zelle (unten) in Kontakt mit NALM-6 Zellen. Die Zellmembran der NK-Zellen ist mit CD56-Antikörper markiert (blau), der CD19-CAR Rezeptor mit einem spezifischen CAR-Antikörper (rot). B) Übersichtsaufnahmen (20x) von CAR NK-Zellen (links) und NT NK-Zellen (rechts) in Kokultur mit NALM-6-Zielzellen (oben) beziehungsweise K562-Zielzellen (unten). Dargestellt sind jeweils der gesamte Bildausschnitt nach 4 Stunden Kokultur sowie vergrößerte Ausschnitte. Die CAR NK- und NT NK-Zellen wurden in Frankfurt durch Alina Moter generiert und kultiviert. Zellkultur und funktionelle Assays wurden in Homburg hauptsächlich von Nadja Küchler und mir durchgeführt, unterstützt durch Alina Moter. Modifiziert übernommen aus Kaschek*, Moter*, Küchler* et al. (in Vorbereitung). Maßstabsbalken 10 μm in (A) und 100 μm bzw. 50 μm in (B).

Für quantitative Analysen wurden Übersichtsaufnahmen mit 20x Vergrößerung aufgenommen. In Abbildung 29B sind exemplarisch Aufnahmen zum Endzeitpunkt von vier Stunden sowie jeweils vergrößerte Ausschnitte dargestellt. Auch in diesen zeigte sich eine stärkere Abtötung von NALM-6-Zellen durch CAR NK-Zellen als durch NT NK-Zellen. Die meisten

Kapitel 3 Ergebnisse

beobachteten Zelltode waren apoptotisch, während nekrotische Ereignisse seltener auftraten. Für K562-Zellen war in den Übersichtsaufnahmen kein deutlicher Unterschied zwischen CAR und NT NK-Zellen erkennbar, sie wurden jedoch insgesamt häufiger und dabei öfter nekrotisch abgetötet.

Mithilfe der MATLAB-basierten Analyseplattform MSparkles wurden die Zelltode der NALM-6 und K562 automatisiert ausgewertet. Abbildung 30A zeigt die gemittelte Zytotoxizität von CAR NK-Zellen gegenüber NALM-6-Zellen, während in Abbildung 30B die entsprechende Kurve für NT NK-Zellen dargestellt ist.

In Abbildung 30C ist der Endpunkt der Analyse nach vier Stunden quantifiziert. Die Daten zeigen, dass CAR NK-Zellen die NALM-6-Zellen signifikant effizienter abtöteten als NT NK-Zellen. Zwar ergab die Gesamtanalyse einen signifikanten Unterschied zwischen CAR NK- und NT NK-Zellen, in den Post-hoc-Analysen zeigte sich jedoch weder für apoptotische noch für nekrotische Abtötungsarten einzeln ein signifikanter Unterschied.

In Abbildung 30D ist das Verhältnis apoptotischer zu nekrotischen Zelltoden dargestellt. CAR NK-Zellen induzierten im Mittel etwa 2,4-fach mehr apoptotische als nekrotische Zelltode, während bei NT NK-Zellen ein Verhältnis von etwa 3,3 beobachtet wurde. Dieser Unterschied war jedoch statistisch nicht signifikant.

In den Panels E–H ist die entsprechende Analyse für K562-Zielzellen dargestellt. Auch in der quantitativen Analyse zeigte sich für K562-Zellen kein Unterschied im Zytotoxizitätsverhalten zwischen CAR NK- und NT NK-Zellen. Weder die Gesamtzytotoxizität noch die Verteilung der Abtötungsarten unterschieden sich signifikant. Das Verhältnis apoptotischer zu nekrotischen Zelltoden lag bei etwa 0,5 und war ebenfalls zwischen CAR NK- und NT NK-Zellen vergleichbar.

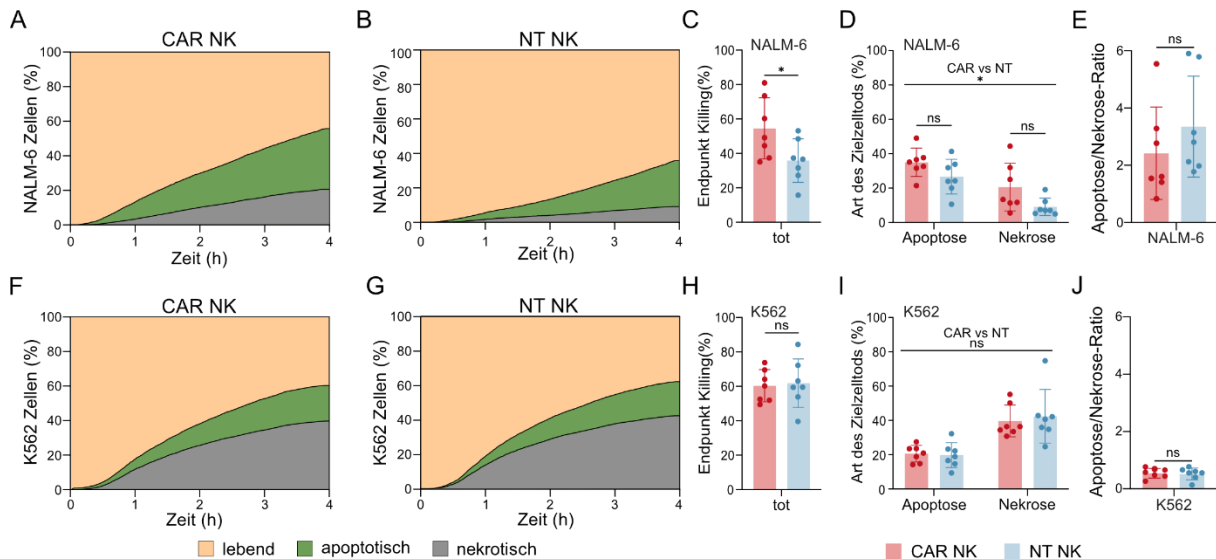


Abbildung 30: Analyse der Zielzelltode von NALM-6 und K562 auf Populationsebene

Automatisierte Analyse des Abtötungsverhaltens von CAR NK- und NT NK-Zellen gegenüber NALM-6- und K562-Zielzellen mittels MSparkles. (A, B) Gemittelte Zytotoxizitätskurven von CAR NK-Zellen (A) und NT NK-Zellen (B) gegenüber NALM-6-Zielzellen. (C) Quantifizierung des Zielzellzustands nach 4 h. (D) Verhältnis apoptotischer zu nekrotischen Zelltoden bei NALM-6-Zellen. (E, F) Entsprechende Zytotoxizitätskurven von CAR NK- und NT NK-Zellen gegenüber K562-Zielzellen. (G, H) Quantifizierung der Zielzellzustände sowie des Apoptose/Nekrose-Verhältnisses bei K562-Zellen. Die automatisierte Klassifikation der Zielzellen erfolgte zu jedem Zeitpunkt in die Kategorien „lebend“ (orange), „apoptotisch“ (grün) oder „nekrotisch“ (grau). Die statistische Analyse erfolgte in C, E, H und J mittels Wilcoxon-Test und in D und I mittels two-way ANOVA. Die CAR NK- und NT NK-Zellen wurden in Frankfurt durch Alina Moter generiert und kultiviert. Zellkultur und Messungen erfolgten in Homburg hauptsächlich durch Nadja Küchler und mich, unterstützt durch Alina Moter. Die MSparkles-basierte Analyse wurde von mir durchgeführt; MSparkles wurde von Gebhard Stopper programmiert, unterstützt von Joanne Vialle und mir. Statistik und graphische Darstellung wurden hauptsächlich von Nadja Küchler erstellt; Alina Moter und ich haben unterstützt. Modifiziert übernommen aus Kaschek*, Moter*, Küchler* et al. (in Vorbereitung).

Zur weitergehenden Analyse der Zytotoxizität wurde der Fokus auf die NK-Zellen gelegt. Hierfür wurden CAR und NT NK-Zellen mit Deep Red gefärbt, zufällig ausgewählt und danach manuell getrackt und klassifiziert. Berücksichtigt wurden alle NK-Zellen, die zum Zeitpunkt von 5 Minuten eine der eingezeichneten Linien berührten. (Abbildung 31A). Die NK-Zellen wurden anhand ihres Interaktions- und Abtötungsverhaltens in die Kategorien „keine Kontakte“, „nur Kontakte“, „ausschließlich apoptotisches Killing“, „ausschließlich nekrotisches Killing“, „ausschließlich Mixed Phänotyp“ sowie „Killing auf verschiedene Arten“ eingeteilt.

In Abbildung 31B ist eine schematische Darstellung einer CAR NK-Zelle dargestellt, die nacheinander zwei Zielzellen abtötet, die erste nekrotisch die zweite apoptotisch. Diese fiktive CAR NK-Zelle wäre in die Klasse „tötet mit verschiedenen Arten“ einsortiert worden.

In Abbildung 31C zeigt sich, dass gleich viele CAR und NT NK-Zellen keine Kontakte eingingen und somit inaktiv waren. NT NK-Zellen gingen häufiger Kontakte ohne nachfolgende Zytotoxizität ein, während CAR NK-Zellen häufiger apoptotische Killing-Ereignisse auslösten. Beschränkt man die Analyse auf NK-Zellen, die Kontakte bildeten

Kapitel 3 Ergebnisse

(Abbildung 31D), so wird diese Tendenz noch deutlicher. 70 % der NT NKs, die mindestens einen Kontakt eingingen, töteten dabei nicht, im Gegensatz zu 20 % der CAR NKs. Demgegenüber induzierten 50 % der CAR NK-Zellen ausschließlich Apoptosen, während es nur 20 % der NT NKs waren. Bei weiterer Einschränkung auf NK-Zellen, die mindestens eine Zelle abgetötet haben (Abbildung 31E), zeigt sich hingegen kein statistisch signifikanter Unterschied mehr zwischen CAR und NT NK-Zellen.

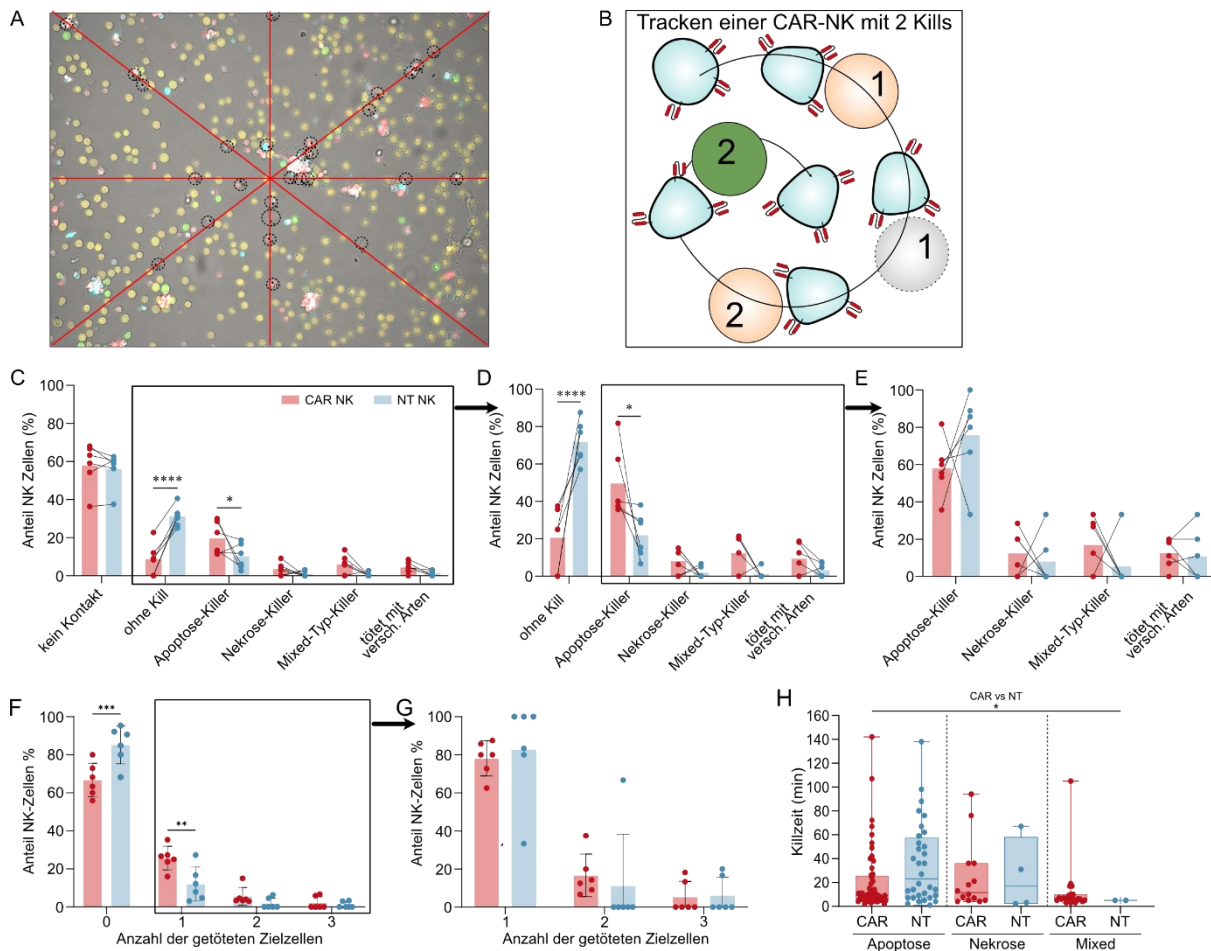


Abbildung 31: Einzelzellanalyse des Zytotoxizitätsverhaltens von CAR und NT NK-Zellen gegen NALM-6

Aufgetragen ist das Verhalten einzelner NK-Zellen. Diese wurden, wie in (A) gezeigt ausgewählt, wenn sie in Frame 10 (5 min) die Linien berührten. Dadurch wurde eine zufällig verteilte Stichprobe an NK-Zellen ausgewählt. In Rosa ist der Anteil der CAR NK-Zellen dargestellt, in Hellblau der Anteil der NT NK-Zellen. In (B) ist ein schematisches Bild einer CAR NK-Zelle gezeigt, die zwei Zielzellen abtötet, die erste apoptotisch, die zweite nekrotisch. In (C) sind alle analysierten NK-Zellen dargestellt, in (D) nur NK-Zellen, die Kontakte eingingen (mit und ohne erfolgreichem Killing). In (E) sind nur NK-Zellen dargestellt, die mindestens eine Zielzelle abgetötet haben. (F) zeigt den Anteil an NK-Zellen je nach Anzahl getöteter Zielzellen, (G) zeigt dies ebenfalls, allerdings nur für NK-Zellen, die mindestens eine Zielzelle abgetötet haben. In (H) ist die Zeit dargestellt, die die NK-Zellen (CAR NK dunkel, NT NK hell) benötigen, um eine Zielzelle apoptotisch, nekrotisch oder im Mixed Phänotyp zu töten (Zeit von Kontakt bis Killing). $N = 4$, $n(\text{CAR}) = 213$ und $n(\text{NT}) = 245$. Statistische Analyse mit two-way ANOVA. Die CAR NK- und NT NK-Zellen wurden in Frankfurt durch Alina Moter generiert und kultiviert. Zellkultur und funktionelle Assays wurden in Homburg hauptsächlich von Nadja Küchler und mir durchgeführt, unterstützt durch Alina Moter. Analyse erfolgte manuell durch Nadja Küchler und mich. Statistik und graphische Darstellung erfolgte durch Nadja Küchler und mich, unterstützt durch Alina Moter. Modifiziert übernommen aus Kaschek*, Moter*, Küchler* et al. (in Vorbereitung).

Bei der Anzahl der getöteten Zielzellen gab es wiederum bei 0 und 1 getöteten Zielzellen einen statistisch signifikanten Unterschied, wobei die NT NK-Zellen häufiger keine Zielzelle töteten

Kapitel 3 Ergebnisse

und CAR NK-Zellen eher eine töteten (Abbildung 31F). Betrachtet man ausschließlich die NK-Zellen, die mindestens eine Zelle getötet haben, gab es keinen statistischen Unterschied mehr (Abbildung 31G). In Abbildung 31H sind die Zeiten aufgetragen, die zwischen Kontakt und Todeszeitpunkt verging. Es gab keinen statistischen Unterschied zwischen CAR und NT NK-Zellen, auch wenn es eine leichte Tendenz hin zu längeren Zeiten bei NT NK-Zellen gab.

Für die Analyse der Killzeiten wurden die 4 Spender jeweils für CAR und NT gepoolt.

Die Einzelzellanalysen zeigten, dass sowohl CAR NK- als auch NT NK-Zellen im Verlauf der Messung mehrfach mit unterschiedlichen Zielzellen interagierten und teilweise wiederholt Zytotoxizität ausübten. Zur Visualisierung dieser Interaktionsabfolgen wurden die Daten in kreisförmigen Baumdiagrammen, im Folgenden „Schicksalsräder“ genannt, dargestellt (Abbildung 32). Die Zahlen geben jeweils die absolute Anzahl analysierter Zellen an. Ausgangspunkt ist das Zentrum der Diagramme mit 213 analysierten CAR NK-Zellen beziehungsweise 245 NT NK-Zellen.

Die T-förmigen Linien kennzeichnen NK-Zellen ohne Zielzellkontakt. Kontakte ohne nachfolgendes Absterben sind gelb dargestellt, apoptotische Kills grün, nekrotische Ereignisse grau und gemischte Phänotypen lila. Die konzentrischen Ringe repräsentieren aufeinanderfolgende Zielzellkontakte (erster, zweiter und dritter Kontakt). Die Strichstärke der Verbindungen ist proportional zur Wahrscheinlichkeit des jeweiligen Verlaufs.

Bei den CAR NK-Zellen war der häufigster Gesamtverlauf das Ausbleiben eines Zielzellkontakts. Unter den Zellen mit Kontakt überwog die Induktion einer Apoptose, gefolgt von Kontakt ohne Kill sowie gemischten Phänotypen und nekrotischen Abtötungen. Nach einer initialen Apoptose war es am wahrscheinlichsten, dass keine weitere Interaktion stattfand. Trat ein weiterer Kontakt auf, endete dieser mit vergleichbarer Wahrscheinlichkeit erneut apoptotisch oder ohne Kill. Auffällig war, dass keine CAR NK-Zelle nach einer Apoptose eine nekrotische Zielzellyse induzierte. Gleichzeitig zeigten einzelne Zellen komplexe Interaktionssequenzen, beispielsweise eine initiale Nekrose, gefolgt von einem Kontakt ohne Kill und anschließend einer weiteren Nekrose. Zwei CAR NK-Zellen gingen drei aufeinanderfolgende Kontakte ein, ohne dass eine der Zielzellen starb.

Im Gegensatz dazu dominierten bei den NT NK-Zellen Kontakte ohne nachfolgende Zytotoxizität deutlich. Der wahrscheinlichste Verlauf war hier der Kontakt ohne Kill. Dennoch konnten auch NT NK-Zellen seriell Töten zeigen: 20 Zellen induzierten eine erste Apoptose, von denen drei eine zweite und eine Zelle sogar eine dritte Apoptose verursachte. Insgesamt

war Serial Killing somit nicht ausschließlich auf CAR NK-Zellen beschränkt, trat jedoch seltener auf als bei CAR NK-Zellen.

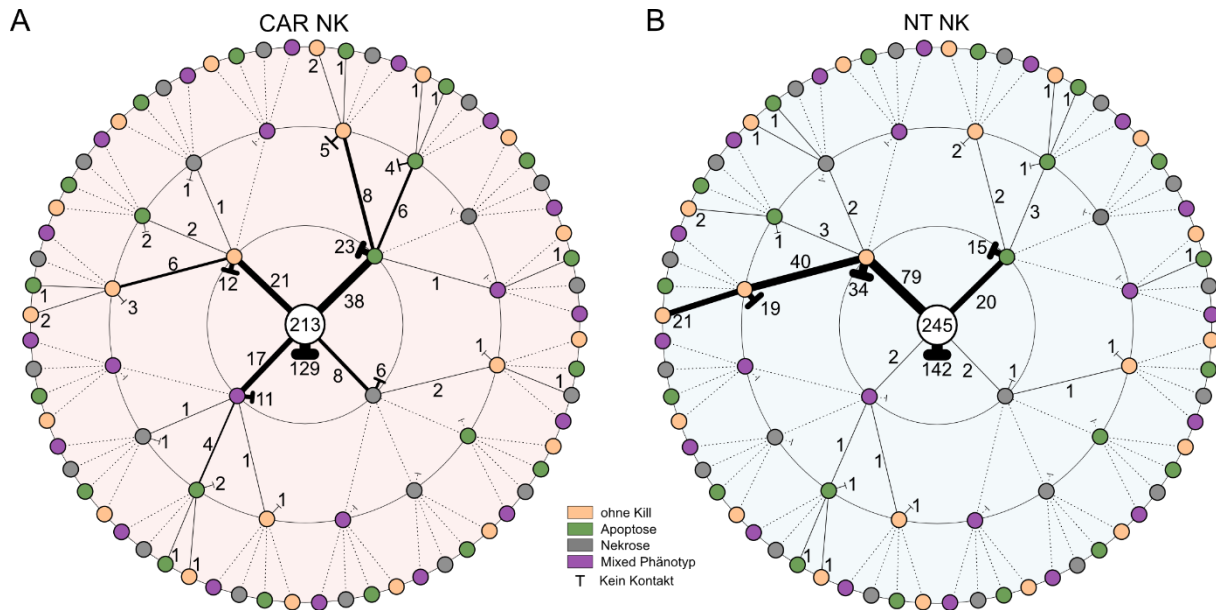


Abbildung 32: Schicksalsräder für CAR und NT NK-Zellen gegen NALM-6

Kreisförmige Baumdiagramme zur Darstellung der Interaktionsverläufe einzelner NK-Zellen mit Zielzellen. (A) CAR NK-Zellen ($n = 213$), (B) NT NK; ($n = 245$). Das Zentrum repräsentiert die Gesamtzahl der analysierten NK-Zellen. Die konzentrischen Ringe entsprechen aufeinanderfolgenden Zielzellkontakten (erster, zweiter und dritter Kontakt). Farbcodierung der Interaktionsausgänge: Kontakt ohne Zielzellsterben (gelb), apoptotisches Abtöten (grün), nekrotisches Abtöten (grau), gemischter Phänotyp (lila); T-förmige Endpunkte kennzeichnen Zellen ohne weiteren Kontakt. Die Zahlen geben absolute Zellzahlen an, die Strichdicke ist proportional zur relativen Häufigkeit des jeweiligen Interaktionspfads. Die CAR NK- und NT NK-Zellen wurden in Frankfurt durch Alina Moter generiert und kultiviert. Zellkultur und funktionelle Assays wurden in Homburg von Nadja Küchler, Alina Moter und mir durchgeführt. Die Idee zur Darstellung entstand in Zusammenarbeit mit Joanne Vialle. Modifiziert übernommen aus Kaschek*, Moter*, Küchler* et al. (in Vorbereitung).

3.3.2 Untersuchung der Ca^{2+} -Signale in CAR NK-Zellen

Aufgrund der unterschiedlichen Zytotoxizitätsmuster von CAR NK- und NT NK-Zellen sowie der zuvor dargelegten essenziellen Bedeutung von Ca^{2+} für die zytotoxische Funktion wurde im nächsten Schritt $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{int}}$ während spezifischer und unspezifischer Zielzellinteraktionen analysiert.

In Abbildung 33A ist dargestellt, dass die mit Fura-10 beladenen NK-Zellen in den Anregungskanälen bei 370 nm und 420 nm klar detektierbar waren, ohne dass eine relevante Signalüberlagerung durch die pCasper-exprimierenden NALM-6-Zielzellen auftrat. Im GFP- und RFP-FRET-Kanal sind sowohl die Fura-10-beladenen NK-Zellen als auch die Zielzellen sichtbar, wobei die NK-Zellen eine höhere Fluoreszenzintensität aufwiesen. Dies wird auch im zusammengeführten Bild aller fünf Kanäle deutlich. Das berechnete Fura-Ratio (Abbildung 33B) bestätigt, dass das ratiometrische Ca^{2+} -Signal spezifisch den NK-Zellen zugeordnet werden konnte und nicht durch die Zielzellfluoreszenz beeinflusst wurde.

Kapitel 3 Ergebnisse

Eine repräsentative Zeitreihe ist in Abbildung 33C dargestellt. Hier sind mehrere CAR NK-Zellen zu sehen, die mit NALM-6-Zielzellen interagieren. NK-Zellen mit niedriger $[Ca^{2+}]_{int}$ erscheinen blau bis weißlich, während erhöhte Ca^{2+} -Signale durch eine pinke Färbung angezeigt werden. Mehrere Zytotoxizitätsereignisse sind erkennbar, bei denen ein Anstieg der $[Ca^{2+}]_{int}$ der NK-Zelle dem Zielzellsterben vorausgeht. Der überwiegende Teil der beobachteten Zellode zeigte einen apoptotischen oder gemischten Phänotyp.

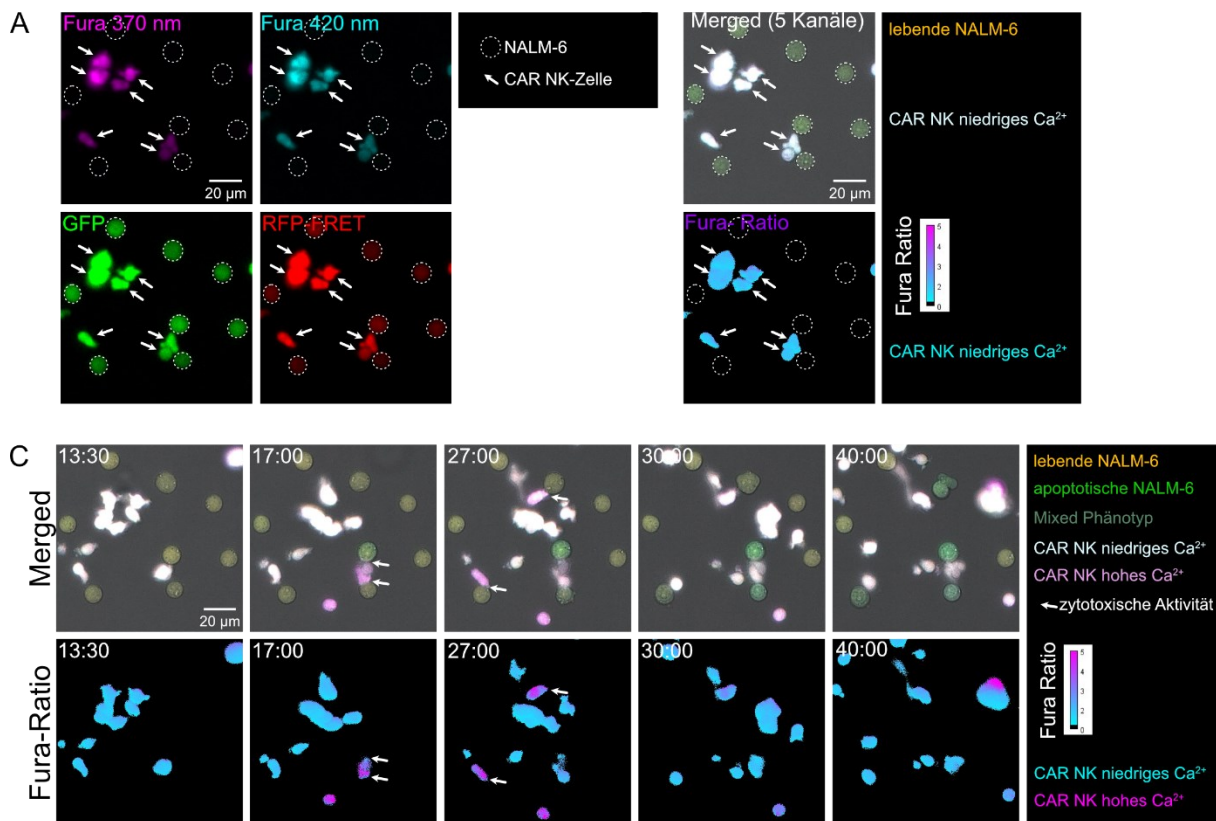


Abbildung 33: Ca^{2+} -Messung in CAR NK-Zellen während der Interaktion mit NALM-6

(A) Darstellung der einzelnen Fluoreszenzkanäle. Fura-10-beladene NK-Zellen (weiße Pfeile) sind in den Anregungskanälen bei 370 nm und 420 nm klar detektierbar, ohne relevante Signalüberlagerung durch pCasper-exprimierenden NALM-6-Zielzellen (weiße gestrichelte Ovale). Im GFP- und RFP-FRET-Kanal sind sowohl NK- als auch Zielzellen sichtbar. (B) Zusammengeführtes Bild aller fünf Kanäle sowie berechnetes Fura-Ratio-Bild. Das ratiometrische Ca^{2+} -Signal ist spezifisch den NK-Zellen zuzuordnen. Die Farbcodierung des Ratiosignals reicht von niedrigem Ca^{2+} (blau) bis hohem Ca^{2+} (pink). Maßstab: 20 μm . (C) Repräsentative Zeitreihe einer CAR NK–NALM-6-Kokultur. Gezeigt sind Merge- und Fura-Ratio-Bilder zu ausgewählten Zeitpunkten. Ein Anstieg des intrazellulären Ca^{2+} -Signals in CAR NK-Zellen (pink) geht dem apoptotischen oder gemischten Zielzellsterben voraus. Die dargestellten Sequenzen entstammen einer insgesamt zweistündigen Messung; gezeigt ist ein exemplarischer 40-minütiger Ausschnitt. Die CAR NK- und NT NK-Zellen wurden in Frankfurt durch Alina Moter generiert und kultiviert. Zellkultur erfolgte in Homburg durch Nadja Küchler und mich, die Ca^{2+} -Messungen und Analysen wurden von mir durchgeführt. Modifiziert übernommen aus Kaschek*, Moter*, Küchler* et al. (in Vorbereitung).

Analog zu den Analysen in primären NK-Zellen wurden auch CAR und NT NK-Zellen entsprechend ihres Interaktionsverhaltens klassifiziert. Die gemittelten Fura-Signale für CAR und NT NK-Zellen gegen NALM-6-Zielzellen sind in Abbildung 34A und B dargestellt.

Kapitel 3 Ergebnisse

NK-Zellen ohne Zielzellkontakt zeigten in beiden Gruppen ein stabiles basales Fura-Ratio von etwa 1,6 ohne relevante Änderungen. Bei CAR NK-Zellen führte jeder Zielzellkontakt unabhängig vom späteren Killing-Phänotyp zu einem vergleichbar starken Ca^{2+} -Anstieg mit anschließend gleichförmigem Abfall. Die gemittelten Signalhöhen und Kinetiken unterschieden sich zwischen den verschiedenen Interaktionsausgängen nur geringfügig. Bei NT NK-Zellen zeigte sich hingegen ein differenzierteres Muster. Kontakte ohne Kill waren mit niedrigen Ca^{2+} -Peaks assoziiert, Apoptosen mit moderaten Signalhöhen und Nekrosen mit höheren Peaks, während Mixed-Phänotypen nahezu die Signalhöhen der CAR NK-Zellen erreichten.

Einzelzellanalysen der Peakhöhen, der Abklingdynamik sowie des basalen Fura-Ratios wurden analog zu den Analysen in primären NK-Zellen durchgeführt (vergleiche Abbildung 17). Die zugrunde liegenden Definitionen sind wie auch in Abb. 17 in den Piktogrammen in Abbildung 34C, E sowie G dargestellt. Die Analyse der Peakhöhen ist in Abbildung 34D aufgetragen. In einer zweifaktoriellen ANOVA zeigte sich ein hochsignifikanter Unterschied zwischen CAR und NT NK-Zellen über alle Formen des Zielzellsterbens hinweg. In der Post-hoc-Analyse war der Ca^{2+} -Peak bei NT NK-Zellen in allen Bedingungen signifikant niedriger als bei CAR NK-Zellen, mit Ausnahme des Mixed-Phänotyps, bei dem kein signifikanter Unterschied nachweisbar war. Innerhalb der jeweiligen NK-Zellgruppen ergab die ANOVA ebenfalls signifikante Unterschiede zwischen den Killingarten. In der Post-hoc-Analyse waren jedoch nur einzelne Vergleiche signifikant. Bei CAR NK-Zellen unterschieden sich Nekrose von Apoptose sowie Nekrose von Kontakt ohne Kill signifikant. Bei NT NK-Zellen gab es signifikante Unterschiede zwischen Mixed-Phänotyp und Apoptose sowie zwischen Mixed-Phänotyp und Kontakt ohne Kill.

Die Abklingzeiten der Ca^{2+} -Signale sind in Abbildung 34F dargestellt. Zwischen CAR und NT NK-Zellen zeigte sich kein signifikanter Unterschied. Zwischen den Killingarten ergab sich in der ANOVA ein signifikanter Gesamteffekt, jedoch konnten in den Post-hoc-Analysen keine signifikanten Unterschiede zwischen einzelnen Bedingungen nachgewiesen werden. Auch die basalen Ca^{2+} -Signale (Abbildung 34H) unterschieden sich nicht zwischen CAR und NT NK-Zellen. Zwischen den Killingarten gab es einen schwach signifikanten Gesamteffekt, der jedoch in der Post-hoc-Analyse keiner spezifischen Bedingung eindeutig zugeordnet werden konnte.

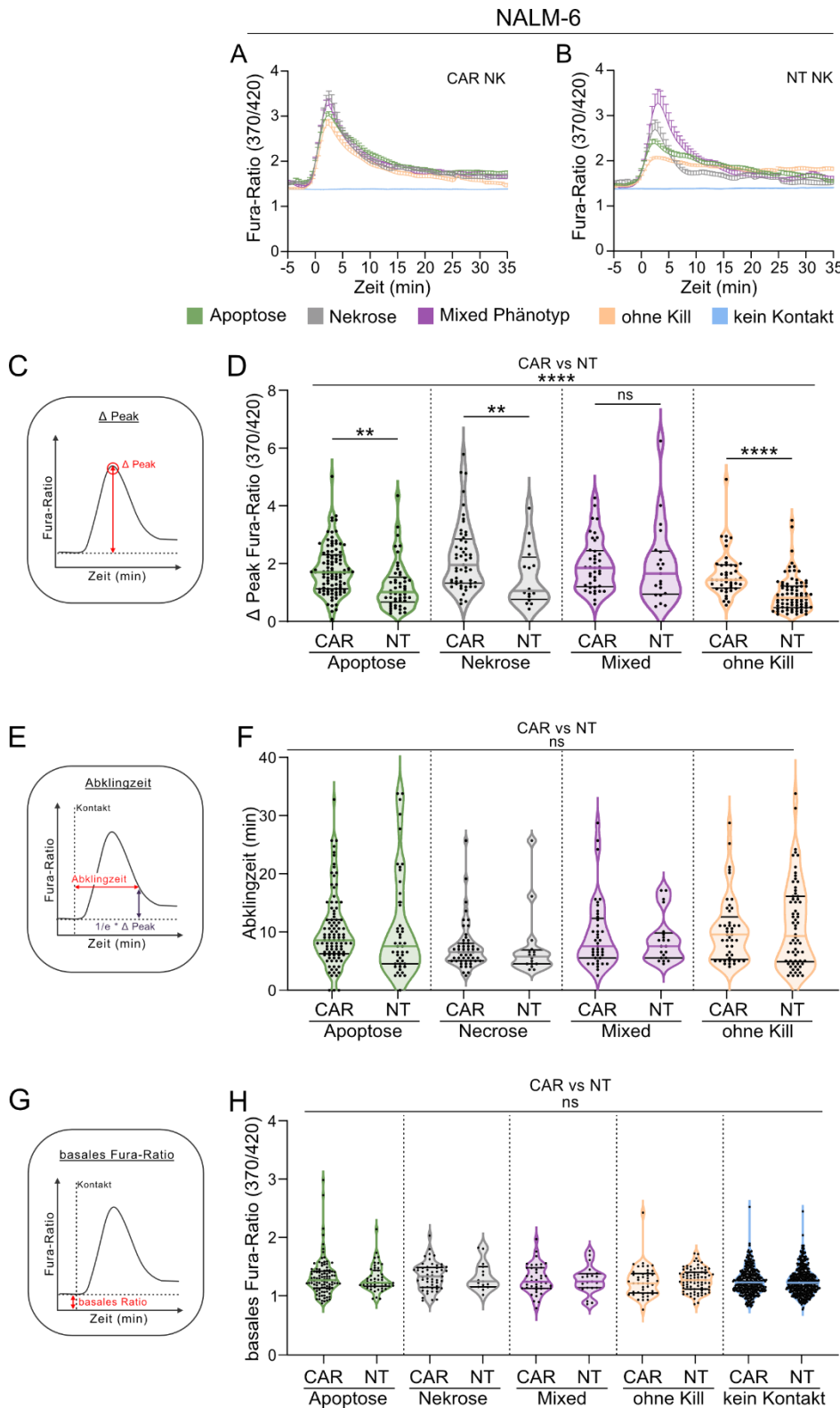


Abbildung 34: Einzelzellanalyse der Ca^{2+} -Signale von CAR und NT NK-Zellen während der Interaktion mit NALM-6
 (A, B) Gemittelte Ca^{2+} -Verläufe von CAR NK-Zellen (A) und NT NK-Zellen (B) relativ zum Zeitpunkt des Zielzellkontakts. (C, E, G) Piktogramme zur Definition der analysierten Parameter $\Delta\text{Peak-Fura-Ratio}$, Abklingzeit der Ca^{2+} -Signale und basales Fura-Ratio. (D, F, H) Einzelzellanalyse der CAR und NT NK-Zellen, aufgetragen als Violinplots mit überlagerter Punktwolke der Einzelzellen. Die Daten sind nach dem Zielzellschicksal (Apoptose, Nekrose, Mixed, ohne Kill, kein Kontakt) gruppiert. (D) $\Delta\text{Peak-Fura-Ratio}$, (F) Abklingzeit der Ca^{2+} -Signale, (H) basales Fura-Ratio. Die statistische Analyse erfolgte mittels zweifaktorieller ANOVA mit anschließenden Post-hoc-Tests. $n(\text{CAR mit Kontakt}) = 240$, $n(\text{CAR ohne Kontakt}) = 374$; $n(\text{NT mit Kontakt}) = 165$, $n(\text{NT ohne Kontakt}) = 411$; $N = 3$. Die CAR NK- und NT NK-Zellen wurden in Frankfurt durch Alina Moter generiert. Zellkultur erfolgte in Homburg durch Nadja Küchler und mich, die Ca^{2+} -Messungen und Analysen wurden von mir durchgeführt, Statistik und graphische Darstellung wurde zusammen mit Nadja Küchler und Alina Moter erstellt. Modifiziert übernommen aus Kaschek*, Moter*, Küchler* et al. (in Vorbereitung).

Kapitel 3 Ergebnisse

Um zu untersuchen, ob die beobachteten Ca^{2+} -Signalcharakteristika spezifisch für die CAR-vermittelte Zielzellerkennung sind oder auch bei natürlicher NK-Zell-Zytotoxizität auftreten, wurden entsprechende Analysen mit K562 durchgeführt. Die gemittelten Ca^{2+} -Verläufe der NK-Zellen während der Interaktion mit K562-Zielzellen sind in Abbildung 35A und B dargestellt. Wie bereits bei den NALM-6-Zellen zeigten NK-Zellen ohne Zielzellkontakt ein stabiles basales Ca^{2+} -Signal ohne ausgeprägte Dynamik. Bei beiden NK-Zellpopulationen führte der Zielzellkontakt zu einem deutlichen Anstieg des intrazellulären Ca^{2+} -Signals, dessen Höhe und Verlauf jedoch zwischen den verschiedenen Interaktionsausgängen variierte. NK-Zellen ohne Kill wiesen tendenziell niedrigere Ca^{2+} -Peaks auf. Apoptotische Ereignisse sowie Kontakte ohne Kill zeigten im Mittel längere Abklingzeiten, während Nekrosen und Mixed-Phänotypen schneller wieder auf das basale Niveau zurückkehrten. Insgesamt unterschieden sich die Signalverläufe zwischen CAR und NT NK-Zellen im K562-System deutlich weniger stark als im NALM-6-Modell.

Die Einzelzellanalysen der Peakhöhen sind in Abbildung 35D dargestellt. In der zweifaktoriellen ANOVA gab es keinen signifikanten Unterschied zwischen CAR und NT NK-Zellen. Zwischen den Abtötungsarten ergab sich hingegen ein signifikanter Gesamteffekt. Insgesamt zeigte sich dabei die Tendenz, dass Interaktionen ohne nachfolgendes Zielzellsterben mit niedrigeren Ca^{2+} -Peaks assoziiert waren als produktive Abtötungs-Ereignisse. In den anschließenden Post-hoc-Analysen traten signifikante Unterschiede ausschließlich in Vergleichen auf, die diese Gruppe einschlossen, während zwischen den verschiedenen Killingphänotypen untereinander keine signifikanten Unterschiede nachgewiesen werden konnten.

Auch bei der Analyse der Abklingzeit des Ca^{2+} -Signals zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen CAR und NT NK-Zellen (Abbildung 35F). Zwischen den Abtötungsarten ergab sich in der zweifaktoriellen ANOVA allerdings ein signifikanter Gesamteffekt. In den anschließenden Post-hoc-Analysen gab es bei den CAR NK-Zellen signifikante Unterschiede zwischen Nekrose und Apoptose, zwischen Nekrose und Kontakt ohne Kill sowie zwischen Mixed-Phänotyp und Apoptose.

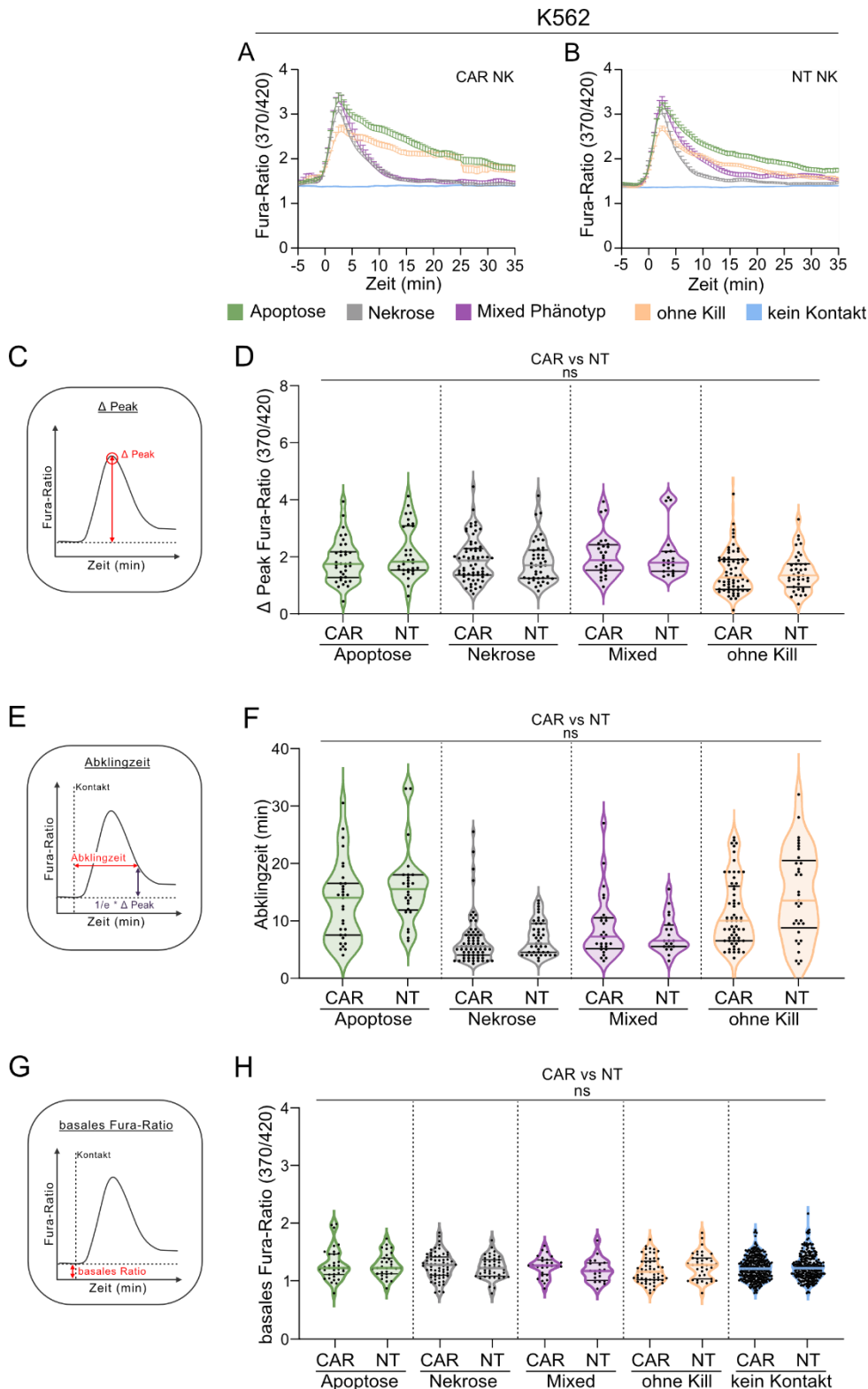


Abbildung 35: Einzelzellanalyse der Ca^{2+} -Signale von CAR und NT NK-Zellen während der Interaktion mit K562

(A, B) Gemittelte Ca^{2+} -Verläufe von CAR NK-Zellen (A) und NT NK-Zellen (B) relativ zum Zeitpunkt des Zielzellkontakts. (C, E, G) Piktogramme zur Definition der analysierten Parameter Δ Peak-Fura-Ratio, Abklingzeit der Ca^{2+} -Signale sowie basales Fura-Ratio. (D, F, H) Einzelzellanalyse der CAR und NT NK-Zellen, aufgetragen als Violinplots mit überlagerter Punktwolke der Einzelzellen. Die Daten sind nach dem Zielzellschicksal (Apoptose, Nekrose, Mixed, ohne Kill, kein Kontakt) gruppiert. (D) Δ Peak-Fura-Ratio, (F) Abklingzeit der Ca^{2+} -Signale, (H) basales Fura-Ratio. Die statistische Analyse erfolgte mittels zweifaktorieller ANOVA mit anschließenden Post-hoc-Tests. $n(\text{CAR mit Kontakt}) = 187$, $n(\text{CAR ohne Kontakt}) = 390$; $n(\text{NT mit Kontakt}) = 133$, $n(\text{NT ohne Kontakt}) = 295$; $N = 3$. Die CAR NK- und NT NK-Zellen wurden in Frankfurt durch Alina Moter generiert. Zellkultur erfolgte in Homburg durch Nadja Küchler und mich, die Ca^{2+} -Messungen und Analysen wurden von mir durchgeführt, Statistik und graphische Darstellung wurde zusammen mit Nadja Küchler und Alina Moter erstellt. Modifiziert übernommen aus Kaschek*, Moter*, Küchler* et al. (in Vorbereitung).

Bei den NT NK-Zellen waren die Unterschiede zwischen Nekrose und Apoptose, zwischen Mixed-Phänotyp und Apoptose, zwischen Nekrose und Kontakt ohne Kill sowie zwischen Mixed-Phänotyp und Kontakt ohne Kill signifikant. Insgesamt deutet dieses Muster darauf hin, dass Interaktionen ohne nachfolgendes Zielzellsterben häufiger mit länger anhaltenden Ca^{2+} -Signalen einhergehen, während erfolgreiche Killing-Ereignisse tendenziell mit einem rascheren Abfall des Signals verbunden sind, wobei Apoptosen länger brauchen.

Das basale Ca^{2+} -Signal unterschied sich weder zwischen CAR und NT NK-Zellen noch zwischen den verschiedenen Interaktionsgruppen (Abbildung 35H).

Insgesamt zeigen diese Ergebnisse, dass sich die Ca^{2+} -Signalcharakteristika von CAR und NT NK-Zellen im Kontext der natürlichen Zielzellerkennung deutlich stärker ähneln als im CAR-spezifischen NALM-6-Modell.

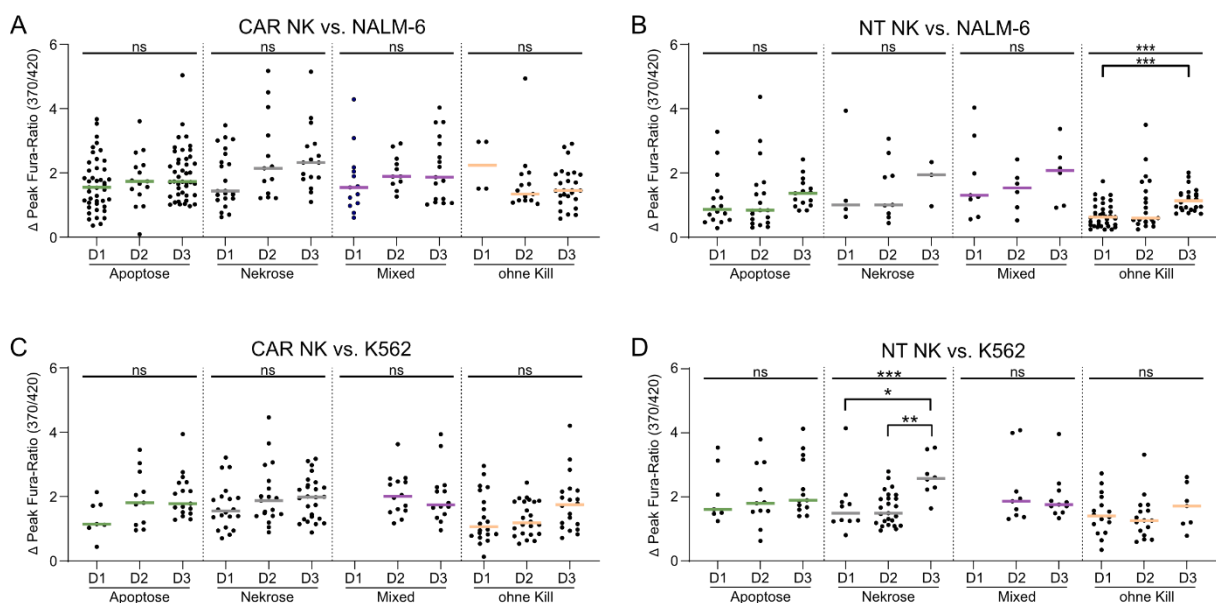


Abbildung 36: Analyse der Ca^{2+} -Peak-Amplituden gegen NALM-6 und K562 getrennt nach NK-Spendern

Dargestellt sind die $\Delta\text{Peak-Fura-Ratios}$ einzelner NK-Zellen während der Interaktion mit NALM-6 und K562 Zielzellen, aufgeschlüsselt nach drei unabhängigen Spendern (D1, D2, D3). Jeder Punkt repräsentiert eine NK-Zelle. Die Daten sind zusätzlich nach dem Zielzellschicksal (Apoptose, Nekrose, Mixed, Kontakt ohne Kill) gruppiert. (A) CAR NK gegen NALM-6 (B) NT NK gegen NALM-6 (C) CAR NK gegen K562 (D) NT NK gegen K562. Die CAR NK- und NT NK-Zellen wurden in Frankfurt durch Alina Moter generiert. Zellkultur erfolgte in Homburg durch Nadja Küchler und mich, die Ca^{2+} -Messungen und Analysen wurden von mir durchgeführt, Statistik und graphische Darstellung wurde zusammen mit Nadja Küchler und Alina Moter erstellt. Modifiziert übernommen aus Kaschek*, Moter*, Küchler* et al. (in Vorbereitung).

Kapitel 3 Ergebnisse

Für die Analysen wurden Daten von drei Spendern gepoolt. Um sicherzustellen, dass keine spenderabhängigen Effekte die Ergebnisse beeinflussen, wurden die ΔPeak -Werte zusätzlich getrennt nach Spendern und Zielzellschicksal analysiert (Abbildung 36).

Dabei zeigten sich insgesamt keine konsistenten spenderabhängigen Unterschiede zwischen den einzelnen Bedingungen. Auffällig war jedoch, dass Spender 3 bei den NT NK-Zellen tendenziell höhere Ca^{2+} -Peaks aufwies. Dieser Effekt erreichte in einzelnen Bedingungen statistische Signifikanz (ohne Kill gegen NALM-6 und Nekrose gegen K562).

Da diese Unterschiede jedoch nicht konsistent über alle Bedingungen hinweg beobachtet wurden, ist nicht von einem systematischen spenderabhängigen Einfluss auszugehen. Die beobachteten Ca^{2+} -Signalcharakteristika waren somit insgesamt unabhängig vom jeweiligen Spender, sodass die Zusammenführung der Daten für die vorhergehenden Analysen gerechtfertigt war.

Zusammenfassend zeigte die CAR-Expression eine erhöhte Wahrscheinlichkeit erfolgreicher Killing-Ereignisse gegenüber CD19-positiven NALM-6-Zellen, ohne die natürliche Zytotoxizität gegenüber CD19-negativen K562-Zellen zu verändern. Auch das Verhältnis apoptotischer und nekrotischer Zelltodphänotypen blieb weitgehend vergleichbar. Auf Ebene der Ca^{2+} -Signalgebung waren die Ca^{2+} -Peaks von CAR NK-Zellen gegenüber NALM-6-Zellen erhöht, während sich gegenüber K562-Zellen keine Unterschiede zwischen CAR und NT NK-Zellen zeigten. Basale Ca^{2+} -Signale und Abklingzeiten unterschieden sich zwischen beiden NK-Zellpopulationen nicht wesentlich.

4 Diskussion

4.1 Etablierung von Ca^{2+} -Messungen in primären NK-Zellen

Die Analyse intrazellulärer Ca^{2+} -Signale ist essenziell für das Verständnis der Zytotoxizität von NK-Zellen. Gleichzeitig ist ihre experimentelle Erfassung mit erheblichen Herausforderungen verbunden, insbesondere in primären Immunzellen. Primäre NK-Zellen reagieren empfindlich auf Stressoren wie Farbstoffbeladung und Lichtbelastung. Gerade für Langzeit-Live-Cell-Imaging unter funktionellen Bedingungen existieren bislang nur wenige belastbare mikroskopische Ansätze (Kaschek et al., 2026). Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, dass ein experimentelles System etabliert werden konnte, das die zeitaufgelöste Erfassung intrazellulärer Ca^{2+} -Signale in primären NK-Zellen mit der simultanen Analyse des Zielzellschicksals kombiniert. Damit wird eine direkte funktionelle Kopplung zwischen Ca^{2+} -Dynamik in der NK-Zelle und zytotoxischem Outcome in der Zielzelle auf Einzelzellebene möglich, was eine wesentliche Voraussetzung für die mechanistische Untersuchung der NK-Zell-Zytotoxizität darstellt.

Ein zentraler methodischer Befund dieser Arbeit ist, dass Ca^{2+} -Messungen nicht als inert gegenüber anderen Zellfunktionen betrachtet werden können. Die Wahl des verwendeten Indikators beeinflusst nicht nur die Qualität der Signale, sondern potenziell auch die zugrunde liegenden zellulären Prozesse selbst. Die Etablierung eines geeigneten Messsystems ist daher nicht nur ein technischer Zwischenschritt, sondern eine Voraussetzung für die Validität funktioneller Analysen. Diese These wird auch durch neuere Arbeiten gestützt, die zeigen, dass chemische Ca^{2+} -Farbstoffe zelluläre Funktionen beeinträchtigen können und daher nicht nur unter Signalgesichtspunkten, sondern immer auch hinsichtlich ihrer biologischen Verträglichkeit bewertet werden müssen (Robinson et al., 2023).

4.1.1 Auswahl geeigneter Farbstoffe

Für die vorliegende Arbeit wurden ausschließlich ratiometrische Ca^{2+} -Indikatoren berücksichtigt, da diese eine robustere Quantifizierung von Ca^{2+} -Signalen ermöglichen und weitgehend unabhängig von Variationen in Farbstoffkonzentration, Zellgröße oder ungleichmäßiger Beladung sind. Gerade bei primären NK-Zellen mit ausgeprägter Zell-zu-Zell-Heterogenität stellt dies einen entscheidenden Vorteil dar. Dieser Grundgedanke entspricht dem klassischen Konzept ratiometrischer Fura-Indikatoren seit Grynkiewicz et al. (1985).

Genetisch kodierte Ca^{2+} -Indikatoren (GECIs) wurden in dieser Arbeit bewusst nicht eingesetzt. Obwohl sie Vorteile für Langzeitmessungen und zelltypspezifische Analysen bieten, ist ihre stabile Expression mit potenziellen Nachteilen verbunden. So wurde gezeigt, dass GECIs langfristig zytotoxische Effekte hervorrufen und die zelluläre Responsivität verändern können (N. Wu et al., 2019). Außerdem ist die Transfektion von NK-Zellen sehr anspruchsvoll und kann die Viabilität und funktionelle Vergleichbarkeit stark beeinflussen (Carlsten & Childs, 2015). Gerade für humane NK-Zellen, die sehr stressempfindlich und sehr schwer zu transfizieren sind, sind GECIs nicht geeignet. So ist es nicht verwunderlich, dass nach meiner Kenntnis bislang keine GECI-Daten für primäre humane NK-Zellen publiziert wurden.

Darüber hinaus wurden im Vorfeld mehrere Indikatoren aufgrund spezifischer Nachteile ausgeschlossen. Farbstoffe mit ungeeigneter Ca^{2+} -Affinität, wie Fura-5N oder Fura-FF, sind für die Messung physiologischer zytosolischer Ca^{2+} -Konzentrationen nicht geeignet. Quin-2 hat eine unzureichende Signalintensität, während Rhod-2 aufgrund seiner bekannten mitochondrialen Akkumulation (Hoth et al., 1997) keine zuverlässige zytosolische Messung erlaubt. Der kürzlich entwickelte Indikator isoCaRed-1Me (Zhou et al., 2025) wurde aufgrund spektraler Überlappung mit dem pCasper-System nicht weiter verfolgt.

Aufgrund dieser Vorauswahl wurden die Fura-Farbstoffe Fura-2, Fura-PE3, Fura-8, Fura-10 und Fura-Red systematisch verglichen.

4.1.2 Bewertungskriterien für ratiometrische Ca^{2+} -Indikatoren

Obwohl Ca^{2+} -Messungen häufig unter nicht-physiologischen Bedingungen durchgeführt werden, erfolgte die Charakterisierung der Farbstoffe bewusst bei 37 °C. Dies ist entscheidend, da sowohl die Ca^{2+} -Bindungseigenschaften als auch die Fluoreszenz der Indikatoren temperaturabhängig sind und sich somit direkt auf die Aussagekraft der Messungen auswirken können (Müller et al., 2021). Zudem wurde die Charakterisierung in primären NK-Zellen durchgeführt, da sich spektrale Eigenschaften und Signalverhalten in lebenden Zellen nicht vollständig aus Messungen in Lösung ableiten lassen. Zelluläre Faktoren wie pH-Wert, Proteinbindung und intrazelluläre Verteilung können die Fluoreszenzeigenschaften maßgeblich beeinflussen (Takahashi et al., 1999).

Der dynamische Bereich beschreibt das Verhältnis zwischen maximalem und minimalem Fura-Ratio und ist eine entscheidende Kenngröße dafür, wie gut ein Indikator Unterschiede in der Ca^{2+} -Konzentration auflösen kann. Die Daten zeigen, dass der gemessene dynamische Bereich stark von der Belichtungszeit abhängt und bei kurzen Belichtungen unterschätzt wird.

Kapitel 4 Diskussion

Bei geringer Belichtung dominiert das Detektionsrauschen, wodurch sich die Fluoreszenzsignale beider Kanäle annähern und das Fura-Ratio gegen 1 konvergiert. Mit zunehmender Belichtungsdauer verbessert sich das Signal-Rausch-Verhältnis, wodurch der tatsächliche dynamische Bereich besser erreicht werden kann.

Ein weiterer zentraler Parameter ist das Signal-zu-Hintergrund-Verhältnis. Für die Einzelzellanalyse ist ein ausreichender Abstand zwischen Zellsignal und Hintergrund essenziell. Nur so sind zuverlässige Segmentierung sowie automatisierte Auswertung möglich. Dieses Kriterium ist insbesondere für spätere Hochdurchsatzanalysen relevant.

Für die Interpretation zytosolischer Ca^{2+} -Signale ist dies deshalb bedeutend, weil Organellen wie ER oder Mitochondrien andere Ca^{2+} -Konzentrationen aufweisen als das Zytosol und eine intrazelluläre Akkumulation von Fura-2 die Messung scheinbar zytosolischer Ca^{2+} -Signale verfälschen kann (Quintana & Hoth, 2004; Takahashi et al., 1999).

Für die Quantifizierung der Ca^{2+} -Signale wurden zwei methodische Ansätze berücksichtigt: die pixelweise Berechnung des Fura-Ratios sowie die Berechnung auf Basis gemittelter Fluoreszenzintensitäten (ROI-basiert). Diese Ansätze unterscheiden sich mathematisch, da der Mittelwert von Quotienten nicht dem Quotienten von Mittelwerten entspricht. Während pixelbasierte Ansätze sensitiv gegenüber lokalen Unterschieden sind, sind ROI-basierte Ansätze robuster gegenüber Rauschen und daher für die Quantifizierung globaler Signale besser geeignet.

Pixelweises Fura-Ratio

$$\frac{\sum_{i=1}^n \frac{x_i}{y_i}}{n}$$

Fura-Ratio aus gemittelten Fluoreszenzwerten

$$\frac{\frac{\sum_{i=1}^n x_i}{n}}{\frac{\sum_{i=1}^n y_i}{n}}$$

Ein entscheidendes Auswahlkriterium ist die Frage, inwieweit die Ca^{2+} -Messung selbst die Funktion der NK-Zellen beeinflusst. Da sich die Farbstoffe stark in ihrer Helligkeit unterscheiden, wurden sie nicht unter identischen Belichtungszeiten getestet, sondern jeweils unter optimierten Bedingungen, die ein ausreichendes Signal bei minimaler Lichtbelastung gewährleisten. Dieses Vorgehen ermöglicht eine realistische Bewertung der Phototoxizität unter experimentell relevanten Bedingungen. Zusätzlich wurde der Einfluss der Farbstoffbeladung sowie die Stabilität der intrazellulären Fluoreszenz über einen Zeitraum von 12 Stunden untersucht.

Zusammenfassend basiert die Auswahl eines geeigneten Ca^{2+} -Indikators nicht auf einem einzelnen Parameter, sondern auf einer integrierten Bewertung aus Signalqualität, Messstabilität und funktioneller Verträglichkeit unter physiologischen Bedingungen.

4.1.3 Vergleich und Auswahl des geeigneten Fura-Farbstoffs

Die experimentellen Ergebnisse zeigen, dass sich die getesteten Fura-Indikatoren trotz ähnlicher Grundprinzipien deutlich in ihren Eigenschaften unterscheiden (Abbildung 37).

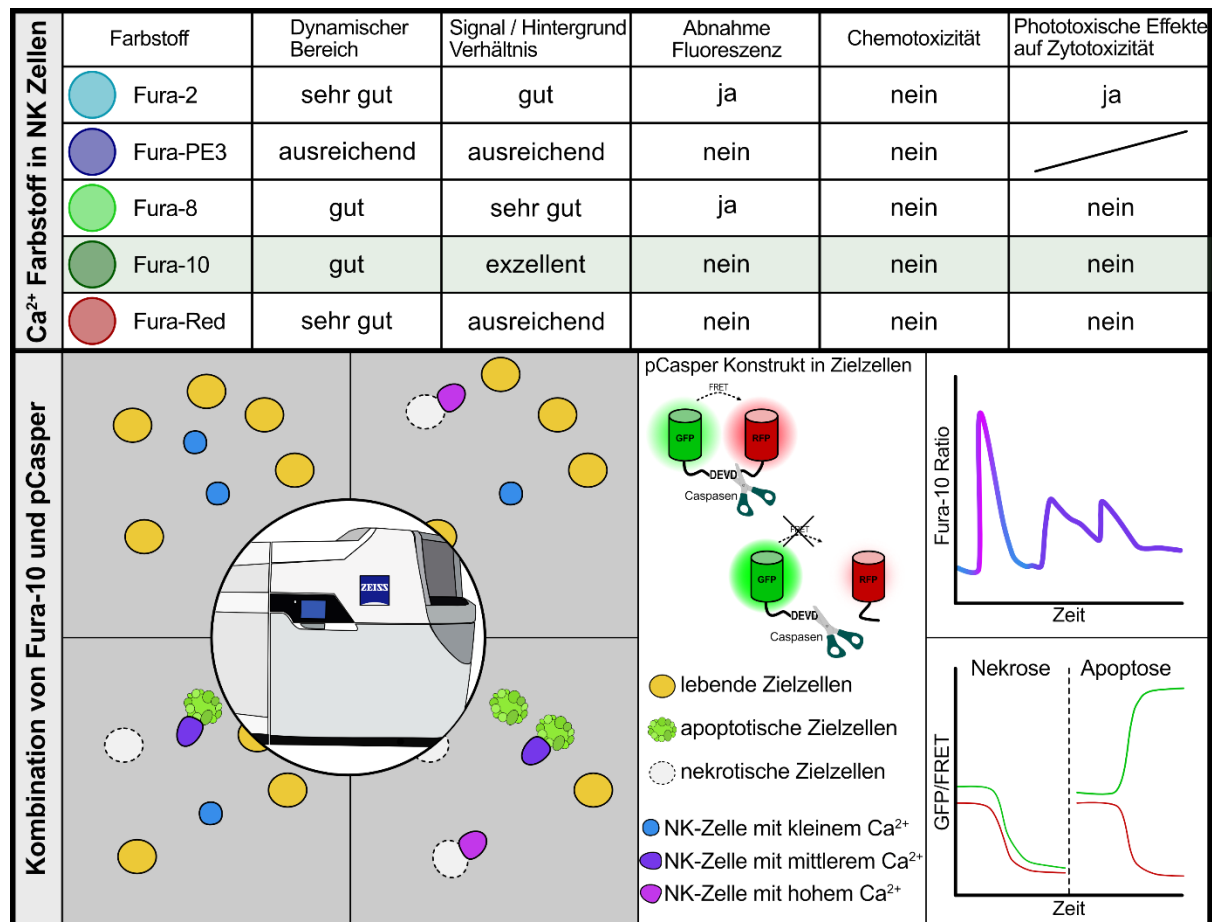


Abbildung 37: Auswahl von Fura-10 und Etablierung des kombinierten Fura-10/pCasper-Messsystems.

Schematische Darstellung der Auswahl von Fura-10 als geeignetem Ca^{2+} -Indikator für NK-Zellen sowie des etablierten Live-Cell-Imaging-Ansatzes zur simultanen Analyse von $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{int}}$ in NK-Zellen und des Zielzellsterbens mittels pCasper im Celldiscoverer 7. Im oberen Panel ist Fura-10 als für die weiteren Experimente ausgewählter Ca^{2+} -Farbstoff in NK-Zellen dargestellt; die Symbole fassen die zentralen Bewertungskriterien der Farbstofftestung zusammen. Links unten sind je nach Ca^{2+} -Niveau unterschiedlich farbkodiert NK-Zellen dargestellt sowie lebende, apoptotische und nekrotische Zielzellen. Rechts unten sind exemplarisch die zugehörigen Fura-10- und pCasper-Signalverläufe gezeigt. Modifiziert nach Kaschek et al. (2026).

Die gemessenen Anregungs- und Emissionsspektren entsprechen weitgehend den Herstellerangaben, bestätigen jedoch zugleich, dass sich das Verhalten der Farbstoffe in lebenden Zellen nicht vollständig aus den in vitro Messungen ableiten lässt. Insbesondere die intrazelluläre Verteilung stellt einen relevanten Einflussfaktor dar. Eine Kompartimentalisierung ist bei allen getesteten Indikatoren zu beobachten, jedoch in unterschiedlichem Ausmaß. Während Fura-2 eine ausgeprägtere intrazelluläre Akkumulation

Kapitel 4 Diskussion

zeigt, ist diese bei Fura-10 deutlich geringer, was auf eine verbesserte zytosolische Verteilung hindeutet.

Im direkten Vergleich hat Fura-2 den größten dynamischen Bereich. Dieser Vorteil relativiert sich jedoch unter Berücksichtigung der experimentellen Randbedingungen. Insbesondere die Abhängigkeit des dynamischen Bereichs von der Belichtungszeit verdeutlicht, dass dieser Parameter nicht isoliert bewertet werden kann. Zudem deutet die beobachtete Streuung zwischen einzelnen Zellen darauf hin, dass hohe Einzelwerte den tatsächlichen dynamischen Bereich eher widerspiegeln als Mittelwerte. An der relativen Einordnung der Farbstoffe ändert dies aber nichts.

Für die praktische Anwendbarkeit erweist sich das Signal-zu-Hintergrund-Verhältnis als entscheidender limitierender Faktor. Während Fura-10 bereits bei kurzen Belichtungszeiten ein starkes Signal liefert, ist die Signalintensität bei Fura-Red deutlich geringer und mit erhöhtem Rauschen verbunden. Dies erschwert insbesondere automatisierte Einzelzellanalysen. Fura-PE3 hat ebenfalls vergleichsweise ungünstige Signalparameter, während Fura-8 eine gute Signalqualität aufweist, jedoch ein stärkeres Ausbleichen über längere Messzeiten zeigt.

Zusätzlich sprechen Unterschiede im Langzeitverhalten für eine differenzierte Bewertung der Farbstoffe. Fura-2 und Fura-8 zeigen stärkeres Ausbleichen, während Fura-PE3 und Fura-10 eine verbesserte intrazelluläre Retention haben. Die verbesserte Eigenschaft von Fura-PE3 lässt sich auf einen Piperazinrest zurückführen (ChemSpider 2026; Yoshida et al., 2006).

Ein zentraler Befund ist die unterschiedliche funktionelle Verträglichkeit der Farbstoffe. Die reine Beladung mit den Indikatoren hat unter den getesteten Bedingungen keinen messbaren Einfluss auf die Zytotoxizität. Bei der Analyse der Phototoxizität wurde jedoch ersichtlich, dass trotz optimierter Belichtungsbedingungen Fura-2 die Zytotoxizität primärer NK-Zellen signifikant reduziert. Dies deutet auf phototoxische Effekte durch die notwendige UV-Anregung hin und steht im Einklang mit aktuellen Studien, die negative Effekte von Fura-2 auf zelluläre Prozesse beschreiben (Robinson et al., 2023; Sinha et al., 2024). Die anderen getesteten Indikatoren zeigen diesen Effekt nicht.

In der Gesamtbewertung ergibt sich, dass Fura-10 der beste Kompromiss aus Signalqualität, Stabilität und funktioneller Verträglichkeit ist. Der Farbstoff zeigt eine geringe Kompartimentalisierung, ein gutes Signal-zu-Hintergrund-Verhältnis bereits bei kurzen Belichtungszeiten sowie keinen messbaren negativen Einfluss auf die zytotoxische Funktion der NK-Zellen.

Kapitel 4 Diskussion

Ein weiterer Vorteil ergibt sich aus den benötigten Anregungswellenlängen. Im Gegensatz zu Fura-2, das eine seltene 340-nm-Anregung erfordert, kann Fura-10 mit in modernen Mikroskopen weit verbreiteten 365-nm-LEDs gemessen werden (Zhou et al., 2025). Dies erleichtert die Übertragbarkeit des Systems auf andere Imaging-Plattformen, einschließlich Hochdurchsatzsysteme wie den Celldiscoverer 7.

Die Kombination von Fura-10 mit dem Apoptosesensor pCasper ermöglicht darüber hinaus eine simultane Analyse von Ca^{2+} -Signalen in NK-Zellen und des Schicksals von Zielzellen auf Einzelzellebene. Dadurch können nicht nur globale Zytotoxizitätseffekte, sondern auch zeitliche und funktionelle Zusammenhänge zwischen Aktivierung und Zielzelltod direkt untersucht werden.

4.1.4 Limitationen und methodische Einordnung der Fura-10 Etablierung

Trotz der erzielten Fortschritte weist das etablierte System mehrere Limitationen auf. Dazu gehören insbesondere spektrale Überlappungen zwischen Fura-10 und dem GFP-basierten Anteil des pCasper-Signals, die die simultane Detektion erschweren können. Allerdings wurde die Analyse in MSparkles durch Gebhard Stopper in unserer Abteilung so erweitert, dass für die Detektion der Zell-ROIs ein HSV-Filter angewendet werden kann. Dieser ermöglicht auch bei überschneidenden Fluoreszenzspektren eine präzise Detektion.

Zudem erfolgte keine absolute Kalibrierung der $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{int}}$, sodass die Interpretation auf relativen Änderungen der Ratios und Signalverläufe basiert. Diese Einschränkung muss für alle später folgenden Ergebnisse bedacht werden.

Weiterhin muss berücksichtigt werden, dass chemische Ca^{2+} -Indikatoren selbst die gemessenen Signale beeinflussen können, etwa durch Ca^{2+} -Pufferung, unvollständige zytosolische Verteilung oder eine begrenzte Erfassung schneller und lokaler Mikrodomänen. Diese Punkte relativieren die absolute Präzision der Messung, stellen aber die grundlegenden Unterschiede zwischen den getesteten Indikatoren nicht infrage. Vielmehr unterstreichen sie erneut die These, dass Ca^{2+} -Imaging immer als Messung eines biologischen Systems unter Einfluss des Messwerkzeugs selbst verstanden werden muss (Takahashi et al., 1999).

Auch die Bildanalyse ist als methodischer Einflussfaktor zu berücksichtigen. Die automatisierte Analyse mittels MSparkles zeigt kleine Unterschiede zu den manuell gemessenen Signalen. Dies liegt wahrscheinlich an den unterschiedlich definierten ROIs. Manuell wurden elliptische ROIs über die NK-Zelle gelegt, während MSparkles mittels Gradient Vector Flow-Algorithmus die ROI erstellt. Unabhängig von der objektiven Richtigkeit ermöglicht MSparkles eine

reproduzierbare Analyse und reduziert die subjektiven Effekte manueller Auswertungen. Zum Zeitpunkt der Analyse wurde die Ca^{2+} -Analyse semiautomatisiert durchgeführt. Es wurden die Ziel- und NK-ROIs automatisiert erstellt und das Zellschicksal sowie das Fura-Ratio analysiert. Die größte Schwierigkeit stellt das Alignment auf den Kontaktzeitpunkt dar. Da aktuell ein Kontakt als räumlich enger Kontakt von einer Ziel- und einer NK-Zelle definiert wird, gab es oft Fehldetektionen. Daher wurde dies manuell korrigiert.

4.2 Ca^{2+} -Signale in primären NK-Zellen

4.2.1 Zusammenfassung der experimentellen Daten

Die Analyse der Ca^{2+} -Signale in primären NK-Zellen zeigt, dass unterschiedliche funktionelle Outcomes der NK-Zell-Zielzell-Interaktion (Apoptose, Nekrose, Mixed Phänotyp und Kontakt ohne Kill) mit charakteristischen Ca^{2+} -Signalmustern assoziiert sind. Abbildung 38 fasst die wesentlichen Parameter und deren signifikante Unterschiede zusammen.

→ gleich
→ verschieden
→ korreliert

K562	Basales Ca^{2+}		Δ Peak		Abklingzeit		Killzeit	
CMA	Ohne CMA	Mit CMA	Ohne CMA	Mit CMA	Ohne CMA	Mit CMA	Ohne CMA	Mit CMA
Inaktive	1,5	1,5						
Apoptose	1,5		2,6		17,8 min		18,7 min	
Nekrose	1,5		2,8		6,5 min		4,5 min	
Mixed	1,5		2,9		13,0 min		10,9 min	
Kontakt ohne Kill	1,6	1,5	2,6	2,2	19,1 min	19,3 min		

TMD8	Basales Ca^{2+}		Δ Peak		Abklingzeit		Killzeit	
Rituximab	Ohne RTX	Mit RTX	Ohne RTX	Mit RTX	Ohne RTX	Mit RTX	Ohne RTX	Mit RTX
Inaktive	1,5	1,5						
Apoptose	1,6	1,5	1,1	2,4	12,3 min	13,3 min		13,1 min
Nekrose	1,5	1,6	1,6	2,5	6,0 min	9,1 min		4,1 min
Mixed	1,6	1,6	1,5	2,7	9,9 min	11,5 min		11,4 min
Kontakt ohne Kill	1,5	1,5	0,9	1,9	18,6 min	15,8 min		

Abbildung 38: Zusammenfassung der Ca^{2+} -Signalparameter primärer NK-Zellen unter verschiedenen Aktivierungsbedingungen.

Schematische Übersicht der wesentlichen Ergebnisse zu basalem Ca^{2+} -Signal, Δ Peak, Abklingzeit und Killzeit primärer NK-Zellen während der Interaktion mit K562- und TMD8-Zielzellen. Für K562-Zellen sind die Bedingungen ohne beziehungsweise mit Concanamycin A (CMA) dargestellt, für TMD8-Zellen ohne beziehungsweise mit Rituximab (RTX). Angegeben sind die gemittelten Werte der jeweiligen Parameter für unterschiedliche Interaktionsausgänge (inaktive NK-Zellen, Apoptose, Nekrose, Mixed Phänotyp und Kontakt ohne Kill). Pfeile kennzeichnen die wesentlichen relativen Trends innerhalb der jeweiligen Parameter: violett insgesamt ohne signifikante Unterschiede, orange Unterschiede mit signifikanten Unterschieden und grün eine Korrelation. Graue Mittelwerte weisen darauf hin, dass die Anzahl an untersuchten Zellen gering ist.

Kapitel 4 Diskussion

Das basale Ca^{2+} -Signal unterscheidet sich weder zwischen den funktionellen Outcomes noch zwischen Zelllinien oder Behandlungsbedingungen (CMA, Rituximab). Trotz ausgeprägter Einzelzellheterogenität zeigt sich kein systematischer Zusammenhang zwischen dem basalen Ca^{2+} -Signal und dem späteren funktionellen Ausgang. Dies spricht dagegen, dass ein erhöhtes basales Ca^{2+} -Signal als allgemeiner Prädiktor für erfolgreiche Zytotoxizität dient. Es stützt vielmehr die Annahme, dass die relevante funktionelle Information erst während oder nach Kontaktaufnahme generiert wird. Zudem kann eine zielzellunabhängige Aktivierung durch Rituximab weitgehend ausgeschlossen werden. Zwar kann der Fc-Teil von Rituximab an CD16 binden, für eine effektive NK-Zell-Aktivierung ist jedoch ein *Clustering* von CD16 erforderlich, das typischerweise erst durch an Zielzellen gebundenes Rituximab vermittelt wird (Freitas Monteiro et al., 2020).

Die entscheidenden Unterschiede zeigen sich somit nicht im basalen Signal, sondern in den kontaktinduzierten Ca^{2+} -Antworten. Ein zentraler Befund ist, dass sich die Höhe der Ca^{2+} -Peaks unter den hier untersuchten Bedingungen nicht konsistent zwischen den verschiedenen Killing-Typen unterscheidet. Ca^{2+} -Signale nach Kontakten, die nicht in einem Kill resultieren, unterscheiden sich jedoch zwischen den Zielzelllinien: Bei K562 werden auch ohne nachfolgendes Killing hohe Peaks beobachtet, während die entsprechenden Signale bei TMD8 deutlich niedriger sind. Dies spricht dafür, dass auch die Zielzelle Einfluss auf die Ca^{2+} -Signalstärke in der NK-Zelle nimmt.

Die Behandlung mit dem V-ATPase-Inhibitor Concanamycin A führt nicht zu einer signifikanten Veränderung der Peak-Höhe. Dies ist gut mit der bekannten Wirkung von CMA erklärbar, da CMA vor allem die perforinabhängige Effektorphase beeinträchtigt, ohne die initiale Aktivierung der NK-Zelle notwendigerweise aufzuheben (Huss et al., 2002). Im Gegensatz dazu führt Rituximab in TMD8-Zellen zu einer deutlichen und signifikanten Erhöhung der Ca^{2+} -Peaks. Dies passt zu den Beobachtungen von Monteiro et al. (2020), wonach nicht die bloße Bindung von IgG an FcγRIIIa/CD16, sondern insbesondere dessen *Clustering* ausgeprägte Ca^{2+} -Signale in NK-Zellen auslöst.

Ohne Rituximab werden nach Kontakt zu TMD8 zwar ebenfalls Ca^{2+} -Signale induziert, diese sind jedoch signifikant niedriger und führen seltener zu einer erfolgreichen Abtötung. Bemerkenswert ist dabei, dass Peak-Werte, die unter Rituximab-Bedingungen keine Zytotoxizität auslösen, teilweise höher sind als solche, die ohne Rituximab zu einer erfolgreichen Zytotoxizität führen. Im Vergleich der Zielzelllinien ergibt sich kein Unterschied

in den Peak-Werten für Apoptose, Nekrose oder Mixed-Phänotypen. Lediglich bei „Kontakt ohne Kill“ sind die Peaks bei TMD8 signifikant niedriger als bei K562.

Die Abklingzeit stellt den Parameter dar, der am stärksten mit dem funktionellen Outcome assoziiert ist. Über alle Bedingungen hinweg zeigt sich ein konsistentes Muster: Die schnellste Signalabnahme wird bei nekrotischen Verläufen beobachtet, gefolgt von Mixed-Phänotypen und apoptotischen Verläufen, während Kontakte ohne Kill die längsten Abklingzeiten aufweisen.

Dieser Zusammenhang ist weitgehend unabhängig von der Aktivierungsart und bleibt sowohl zwischen Zelllinien als auch unter Rituximab-Behandlung erhalten. Dabei unterscheiden sich die absoluten Abklingzeiten zwischen TMD8 und K562 für Nekrosen und Mixed-Phänotypen nicht signifikant, während bei Apoptosen und Kontakten ohne Kill bei TMD8 die Ca^{2+} -Signale schneller abklingen als bei K562.

Die Zeit vom initialen Zellkontakt bis zum Eintritt des Zielzelltodes folgt einem ähnlichen Muster wie die Abklingzeit: Nekrosen treten am schnellsten auf, gefolgt von Mixed-Phänotypen, während Apoptosen die längste Dauer aufweisen. Unterschiede zwischen Zelllinien zeigen sich insbesondere bei apoptotischen Verläufen, die bei TMD8 schneller eintreten als bei K562. Eine mögliche Erklärung ist, dass die Rituximab-vermittelte CD16-Aktivierung in NK-Zellen ein besonders effizientes und synchrones Aktivierungssignal auslöst. Für CD20-gerichtete Antikörper wurde gezeigt, dass CD16-Crosslinking ausgeprägte Ca^{2+} -Signale und ADCC induziert. Bereits die Ligierung von CD16 führt zu einem raschen Anstieg von $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{int}}$. Dies könnte dazu beitragen, dass apoptotische Zelltodprogramme in TMD8-Zellen schneller ausgelöst werden als bei der breiter verteilten natürlichen Aktivierung gegen K562 (Freitas Monteiro et al., 2020).

Auf Einzelzellebene besteht eine signifikante Korrelation zwischen Abklingzeit und Killzeit. Dieser Zusammenhang ist bei K562 moderat ausgeprägt, bei TMD8 allerdings schwächer, was auf zusätzliche, zelltypspezifische Einflussfaktoren hindeutet.

4.2.2 Ein Modell der Ca^{2+} -abhängigen NK-Zell-Zytotoxizität

Die vorliegenden Daten zeigen, dass das basale Ca^{2+} -Niveau keine direkte funktionelle Rolle für die Zytotoxizität spielt. Ca^{2+} -Peaks sind zwar notwendig für die Auslösung der Effektorphase, jedoch weder hinreichend für ein erfolgreiches Abtöten noch determinierend für die Art des Zielzelltodes. Demgegenüber zeigt die Abklingzeit des Ca^{2+} -Signals eine klare Assoziation mit dem Verlauf des Zellsterbens.

Diese Befunde sprechen gegen ein einfaches Schwellenmodell und deuten stattdessen auf ein mehrstufiges, probabilistisches Modell der NK-Zell-Zytotoxizität hin, in dem Ca^{2+} -Signale unterschiedliche funktionelle Rollen in verschiedenen Phasen der Zell-Zell-Interaktion übernehmen.

Die Bedeutung von Ca^{2+} -Signalen für die Effektorantwort von NK-Zellen ist gut etabliert. Insbesondere der SOCE, vermittelt durch STIM- und ORAI-Proteine, ist essenziell für Degranulation und Zytokinproduktion, während frühe Schritte wie Zielzellerkennung, Adhäsion und Granulapolarisation auch bei gestörter Ca^{2+} -Signalweiterleitung weitgehend erhalten bleiben können (Feske et al., 2006; Maul-Pavicic et al., 2011). Diese funktionelle Trennung legt nahe, dass Ca^{2+} -Signale primär als Gatekeeper der Effektorphase fungieren.

Auf Grundlage der vorliegenden Daten lässt sich die Ca^{2+} -abhängige NK-Zell-Zytotoxizität in mehrere funktionelle Phasen unterteilen (Abbildung 39).

Signalentstehung und Aktivierungsintegration

In der initialen Phase befindet sich die NK-Zelle in einem heterogenen Ausgangszustand, der durch minimal unterschiedliche basale Ca^{2+} -Niveaus geprägt ist. Die vorliegenden Daten zeigen, dass dieses basale Ca^{2+} -Signal keinen systematischen Einfluss auf das spätere funktionelle Outcome hat. Dies spricht gegen eine notwendige Voraktivierung durch ein erhöhtes Ruhe- Ca^{2+} -Niveau. Eine solche Interpretation passt auch zu früheren Arbeiten an mukosalen T-Lymphozyten, in denen die Bedeutung des basalen Ca^{2+} -Signals unterschiedlich bewertet wurde. De Maria et al. (1993) beschrieben erhöhte basale $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{int}}$ -Werte in Lamina-propria-Lymphozyten und interpretierten diese gleichzeitig als Ausdruck eines kontinuierlich aktivierten und vorübergehend hyporesponsiven Zustands mit verminderter rezeptorinduzierter Ca^{2+} -Antwort. Demgegenüber fanden A. Schwarz et al. (2004) jedoch keine konsistent erhöhten Ruhe- Ca^{2+} -Spiegel im selben System, beschrieben allerdings deutliche Unterschiede im Ca^{2+} -Einstrom, der eng mit der funktionellen Reaktivität der Zellen assoziiert war. Zudem wiesen sie darauf hin, dass erhöhte basale Ca^{2+} -Werte vor allem bei suboptimaler Zellpräparation beobachtet wurden. Die vorliegenden NK-Zell-Daten stehen damit eher im Einklang mit den Beobachtungen von Schwarz et al. und sprechen dafür, dass nicht das basale Ca^{2+} -Niveau selbst, sondern vielmehr die Fähigkeit zur stimulusabhängigen Ca^{2+} -Mobilisierung und deren zeitliche Verarbeitung funktionell entscheidend ist.

An der immunologischen Synapse erfolgt die Integration aktivierender und inhibierender Rezeptorsignale. Aktivierende Rezeptoren induzieren über ITAM-vermittelte Signalwege die

Aktivierung von $\text{PLC}\gamma$, wodurch PIP_2 in IP_3 und DAG gespalten wird. IP_3 vermittelt die Freisetzung von Ca^{2+} aus dem endoplasmatischen Retikulum, gefolgt von der Aktivierung von STIM-Proteinen und dem Ca^{2+} -Einstrom über ORAI-Kanäle (Hogan et al., 2010).

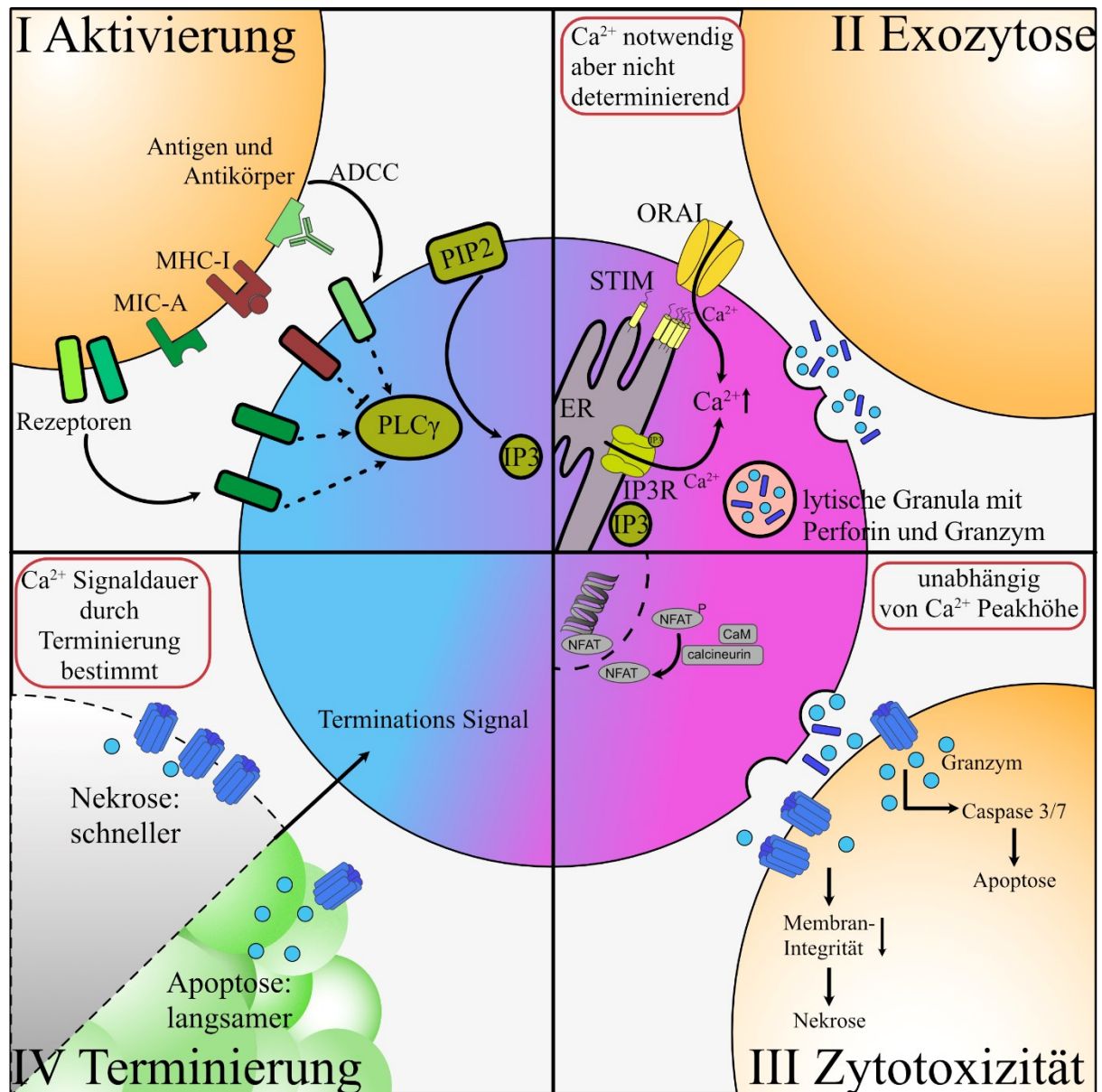


Abbildung 39: Ein Modell der Ca^{2+} -abhängigen NK-Zell-Zytotoxizität

Schematische Darstellung eines vierstufigen Modells der NK-Zell-Zytotoxizität, in dem Ca^{2+} -Signale unterschiedliche funktionelle Rollen in aufeinanderfolgenden Phasen der Zell-Zell-Interaktion übernehmen. In Phase I (Aktivierung) werden aktivierende und inhibierende Rezeptorsignale an der immunologischen Synapse integriert, was zu SOCE führt. In Phase II (Exozytose) ist Ca^{2+} für die Auslösung der Degranulation erforderlich, wirkt jedoch nicht determinierend für das konkrete funktionelle Outcome. In Phase III (Zytotoxizität) werden Perforin und Granzym freigesetzt und in der Zielzelle apoptotische oder nekrotische Prozesse ausgelöst. Die Art des Zielzelltodes wird dabei nicht direkt durch die Höhe des Ca^{2+} -Peaks bestimmt, sondern durch nachgeschaltete Zielzell- und Effektormechanismen moduliert. In Phase IV (Terminierung) wird die Dauer des Ca^{2+} -Signals durch den Verlauf der Interaktion mit der Zielzelle bestimmt. Rasches Zielzellsterben, insbesondere nekrotische Verläufe, geht mit einer schnelleren Signalabnahme einher, während apoptotische Verläufe und Kontakte ohne erfolgreichem Kill mit länger anhaltenden Ca^{2+} -Signalen assoziiert sind.

Ca²⁺ als probabilistischer Trigger der Effektorphase

Ein Befund dieser Arbeit ist, dass Ca²⁺-Signale für die Auslösung der Exozytose lytischer Granula erforderlich sind, ohne dass sich ein deterministischer Schwellenwert erkennen lässt, der erfolgreiche von erfolgloser Zytotoxizität trennt. Stattdessen spricht vieles dafür, dass die Höhe des Ca²⁺-Signals die Wahrscheinlichkeit einer effektiven Effektorantwort moduliert. In diesem Sinne fungiert das Ca²⁺-Signal als integrativer Parameter der Gesamtaktivierung, der verschiedene *upstream*-Signale in eine gemeinsame funktionelle Größe überführt. Dies ist konsistent mit allgemeinen Modellen der Immunzellaktivierung, die eine mögliche graduelle und probabilistische Signalverarbeitung anstelle binärer Schaltermechanismen beschreiben (Aguilar et al., 2024; Feinerman et al., 2008; Tkach et al., 2014).

Die vorliegenden Daten schließen ein schwellenartiges Verhalten auf Ebene der frühen Rezeptorintegration aber nicht aus. Vielmehr erscheint es plausibel, dass aktivierende, häufig ITAM-gekoppelte Signale zunächst inhibitorische, ITIM-vermittelte Kontrollmechanismen überwinden müssen, bevor eine produktive Aktivierung der NK-Zelle zustande kommt. Ein solcher Schwellenprozess würde jedoch vorgelagert zum hier gemessenen Ca²⁺-Peaks liegen, also auf der Ebene früher Signalereignisse vor oder während der Aktivierung von PLC γ , IP₃-vermittelter Ca²⁺-Freisetzung und SOCE. Dafür spricht auch, dass ITAM-haltige Adaptermoleküle selbst einer proximalen Regulation unterliegen und erst nach Rezeptorengagement für die Phosphorylierung und Signalweiterleitung zugänglich werden. Der gemessene Ca²⁺-Peak wäre in diesem Modell somit eher Ausdruck einer bereits erfolgten Integration und Verstärkung als der primäre Ort der initialen Schwellenentscheidung (Aguilar et al., 2024; Lanier, 2008).

Die beobachtete Variabilität der Ca²⁺-Peak-Amplituden lässt sich plausibel durch die kombinierte Heterogenität von Zielzellen und NK-Zellen erklären. Selbst innerhalb etablierter Zelllinien bestehen Unterschiede in der Expression aktivierender und inhibierender Liganden, während primäre NK-Zellen trotz standardisierter Kulturbedingungen funktionell heterogen bleiben. Diese Heterogenität betrifft nicht nur das Ausmaß einzelner Signale, sondern auch die jeweils wirksame Kombination aus Rezeptorrepertoire, Differenzierungszustand und Aktivierungsmodus (Freud et al., 2014; Vivier et al., 2011).

Bemerkenswert ist jedoch, dass sowohl das breite Rezeptorrepertoire bei K562 als auch die durch Rituximab vermittelte CD16-abhängige Aktivierung bei TMD8 zu vergleichbaren Ca²⁺-Peak-Höhen führen können. Auch dies spricht dafür, dass verschiedene Rezeptorsignale auf gemeinsame Ca²⁺-abhängige nachgeschaltete Mechanismen konvergieren, das anschließend

gemessene Ca^{2+} -Signal jedoch nicht in einfacher Weise die Stärke dieser frühen Rezeptorbalance widerspiegelt.

$[\text{Ca}^{2+}]_{\text{int}}$ bestimmt nicht den Zelltodmodus

Die vorliegenden Daten zeigen, dass die Art des Zielzelltodes nicht mit der Höhe des Ca^{2+} -Peaks korreliert. Die Hypothese, dass höhere Ca^{2+} -Peaks zu einer verstärkten Granulafreisetzung und damit bevorzugt zu nekrotischen Verläufen führen, wird durch die vorliegenden Daten nicht gestützt.

Frühere Arbeiten berichten jedoch über Unterschiede in der Ca^{2+} -Signalhöhe zwischen apoptotischen und nekrotischen Verläufen (Honda & Miyazaki, 1996; Mang, 2017). So beschrieben Honda und Miyazaki, dass Nekrosen durch einen starken, kurzzeitigen Ca^{2+} -Peak charakterisiert sind, während Apoptosen mit schwächeren, länger anhaltenden Signalen einhergehen. Diese Ergebnisse basieren allerdings auf einer begrenzten Anzahl analysierter Zellen und sind stark vom verwendeten Zielzellmodell abhängig. Insbesondere wurde der direkte Vergleich zwischen Apoptose und Nekrose nur in MOLT-4-Zellen durchgeführt, während in K562-Zellen ausschließlich nekrotische Verläufe beobachtet wurden.

Ein möglicher Erklärungsansatz für diese Unterschiede liegt in der Expression spezifischer Todesrezeptoren wie Fas. Im Gegensatz zur hier hauptsächlich verwendeten Zelllinie K562 sind die von Sebastian Mang in unserer Abteilung untersuchte Zelllinie Jurkat E6.1 sowie MOLT-4 Fas-sensitiv, sodass durch die Interaktion mit Fas-Ligand auf NK-Zellen apoptotische Signalwege unabhängig von der klassischen, Ca^{2+} -abhängigen Degranulation aktiviert werden können (Mang, 2017). Dies könnte die beobachteten Unterschiede in der Ca^{2+} -Signalcharakteristik zwischen verschiedenen Studien erklären.

Darüber hinaus zeigen experimentelle Daten aus Mausmodellen, dass auch intrinsische Eigenschaften der Effektorzellen das Zytotoxizitätsverhalten maßgeblich beeinflussen. So konnte gezeigt werden, dass CD8^+ T-Zellen älterer Mäuse erhöhte Perforin- und Granzym-Spiegel aufweisen, was mit einer beschleunigten Zielzellabtötung einhergeht. Diese erhöhte Verfügbarkeit von Effektormolekülen kann dabei nicht nur die Kinetik, sondern auch den Modus des Zelltods beeinflussen (D. Zöphel et al., 2022, 2023). Diese Befunde unterstreichen, dass die Determination des Zellschicksals nicht allein durch Signale wie Ca^{2+} -Peaks festgelegt wird, sondern auch durch die Verfügbarkeit und die molekulare Zusammensetzung zytotoxischer Vesikel.

Kapitel 4 Diskussion

Unabhängig davon legen sowohl die vorliegenden Daten als auch die Literatur nahe, dass im Granzym-Perforin-abhängigen Weg nachgeschaltete Faktoren entscheidend für die Determination des Zellschicksals sind. Die Zielzelle spielt hierbei eine aktive Rolle. Perforin-induzierte Membranschäden können durch Ca^{2+} -abhängige Reparaturmechanismen teilweise kompensiert werden, was unterschiedliche zelluläre Antworten ermöglicht (Filali et al., 2022; Keefe et al., 2005; Thiery et al., 2010). Filali et al. zeigten, dass bereits die initiale Granulafreisetzung von CTLs in Melanomzellen eine sehr schnelle $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{int}}$ -Erhöhung auslöst und dadurch Resistenzwege aktiviert. Eine effiziente Ca^{2+} -abhängige Membranreparatur könnte damit Granzym-abhängige Apoptosen begünstigen, während eine unzureichende Reparatur eher zu einer raschen Membrandestruktion und zu nekrotischen Verläufen führt (Filali et al., 2022).

Außerdem wurde gezeigt, dass zytotoxische Interaktionen nicht unabhängig voneinander ablaufen, sondern dass vorausgehende Angriffe den funktionellen Zustand von Zielzellen verändern und damit nachfolgende Zytotoxizitäts-Ereignisse beeinflussen können (Friedmann et al., 2022)

Darüber hinaus beeinflussen biophysikalische Eigenschaften der Zielzellmembran wie Lipidzusammensetzung, Membranordnung und mechanische Steifigkeit die Effizienz der Perforinwirkung (Tuomela et al., 2022). Zellen mit geringerer Steifigkeit zeigen dabei eine geringere Anfälligkeit gegenüber NK-vermitteltem Abtöten. Ob dies primär auf eine reduzierte Perforin-Einlagerung (Y. Liu et al., 2021) oder auf Unterschiede in der Aktivierung der NK-Zelle zurückzuführen ist (Friedman et al., 2021), ist bislang nicht abschließend geklärt.

Neuere Arbeiten deuten zudem darauf hin, dass mechanische Eigenschaften der Zielzelle direkt auf die NK-Zelle wirken können. So wurde gezeigt, dass NK-Zellen die Steifigkeit von Zielzellen über den mechanosensitiven Ionenkanal PIEZO1 wahrnehmen und dass dies die Effizienz und Dynamik des Abtötens beeinflusst (Yanamandra et al., 2024).

Ein weiterer wichtiger Faktor ist die extrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration. Niedrige extrazelluläre Ca^{2+} -Spiegel begrenzen den Ca^{2+} -Einstrom und vermindern dadurch die zytotoxische Funktion von CTLs und NK-Zellen. Umgekehrt führt eine Erhöhung der extrazellulären Ca^{2+} -Konzentration nicht zu einer unbegrenzten Steigerung der Zytotoxizität. Vielmehr wurde ein Ca^{2+} -Optimum beschrieben, was auf eine nichtlineare Abhängigkeit verschiedener Ca^{2+} -abhängiger Teilprozesse wie Degranulation und Migration hinweist (E. C. Schwarz et al., 2013; Zhou et al., 2018). Eine mögliche Erklärung ist, dass eine erhöhte $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{int}}$ die Anzahl freigesetzter lytischer Granula pro Abtötungs-Ereignis erhöht und dadurch langfristig die

Kapitel 4 Diskussion

Effizienz der NK-Zelle reduziert. Dies wird durch Befunde gestützt, die eine erhöhte Degranulation (gemessen durch CD107a) bei verstärktem Ca^{2+} -Signaling zeigen (Y. Li et al., 2022).

Frühere Arbeiten zeigen jedoch, dass nicht die Peakhöhe des intrazellulären Ca^{2+} -Signals, sondern vielmehr die Dauer bzw. das Plateau des Signals durch extrazelluläres Ca^{2+} beeinflusst wird (Mang, 2017). Gleichzeitig verschiebt extrazelluläres Ca^{2+} das Gleichgewicht zwischen apoptotischen und nekrotischen Verläufen (Backes et al., 2018), ohne dass dies direkt durch die Höhe des initialen Ca^{2+} -Peaks erklärbar ist.

Bekannt ist zudem, dass bereits wenige Degranulationsereignisse ausreichen können, um den Zelltod auszulösen (Gwalani & Orange, 2018). Dies unterstreicht, dass nicht die absolute Stärke des initialen Ca^{2+} -Signals, sondern vielmehr die Effizienz einzelner Degranulationsereignisse sowie die Sensitivität der Zielzelle gegenüber perforin- und granzymvermittelter Schädigung entscheidend für das funktionelle Outcome sind.

Insgesamt sprechen diese Befunde dafür, dass die Determination des Zielzelltodes primär durch zielzellabhängige und nachgeschaltete Prozesse erfolgt, während das Ca^{2+} -Signal der NK-Zelle vor allem als Auslöser der Effektorphase fungiert, nicht jedoch deren spezifischen Ausgang festlegt.

Terminierung des Signals

Die vorliegenden Daten zeigen, dass die Abklingzeit des Ca^{2+} -Signals stärker mit dem Verlauf der Zytotoxizität assoziiert ist als die Peak-Höhe. Die Terminierung des Ca^{2+} -Signals scheint dabei eng mit dem Zustand der Zielzelle verknüpft zu sein. Je schneller eine Zielzelle stirbt, desto rascher fällt das Ca^{2+} -Signal ab, auch wenn diese Beziehung nicht strikt linear ist.

Dies fügt sich in die Ergebnisse von Anft et al. (2020) ein. Diese zeigten, dass NK-Zellen sich nicht zufällig von Zielzellen lösen. Eine effiziente Ablösung erfolgt erst, wenn die Zielzelle erfolgreich getötet wurde. Wenn das Töten fehlschlägt, bleiben NK-Zellen länger gebunden und haben daraus resultierend länger anhaltende Ca^{2+} -Signale. Bereits Netter et al. (2017) belegten, dass das Aufrechterhalten der immunologischen Synapse ein aktiver und regulierter Prozess ist. Es konnte auch gezeigt werden, dass diese verlängerte Kontaktzeit sowie die längeren Ca^{2+} -Signale bei gestörter Zytotoxizität mit einer erhöhten Sekretion von Zytokinen zusammenhängt (Anft et al., 2020; Jenkins et al., 2015). Dies erklärt auch die Gefahr eines Zytokinsturms bei Patienten mit FHL-2, bei denen das Perforin fehlt und dadurch die Zytotoxizität gestört ist (Henter et al., 1991).

Zusammenfassend ergibt sich ein Modell, in dem Ca^{2+} -Signale notwendig, aber nicht hinreichend sind. Während die Signalstärke die Wahrscheinlichkeit der Effektoraktivierung moduliert, wird das konkrete Outcome durch ein Zusammenspiel aus NK-intrinsischen Faktoren, Zielzeleigenschaften und der Dynamik der immunologischen Synapse bestimmt. Die Dauer des Ca^{2+} -Signals reflektiert dabei weniger ein intrinsisches Programm der NK-Zelle als vielmehr den Verlauf der Interaktion mit der Zielzelle.

4.2.3 Limitationen der $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{int}}$ -Messung in primären NK-Zellen

Die vorliegenden Ergebnisse liefern neue Einblicke in die Rolle von Ca^{2+} -Signalen während der NK-Zell-Zytotoxizität, unterliegen jedoch mehreren methodischen und konzeptionellen Limitationen, die bei der Interpretation berücksichtigt werden müssen.

Methodische Limitationen

Jede Messung beeinflusst das untersuchte System. Der verwendete Ca^{2+} -Indikator Fura-10 wirkt als Chelator und bindet freie Ca^{2+} -Ionen. Dadurch kommt es zu einer Pufferung von $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{int}}$, die insbesondere die Amplitude sowie die Kinetik schneller Signaländerungen beeinflussen könnte. Ein direkter Effekt auf die Zytotoxizität konnte zwar nicht beobachtet werden, jedoch können subtile Veränderungen intrazellulärer Prozesse nicht ausgeschlossen werden. Dabei ist zu berücksichtigen, dass eine moderate Pufferung von Ca^{2+} -Signalen nicht nur hemmend, sondern potenziell auch funktionell günstig wirken könnte.

Auch die Anregung des Farbstoffs könnte zelluläre Funktionen beeinflussen. Zwar zeigte sich unter den gewählten Bedingungen kein Effekt auf die Zytotoxizität, jedoch wurden mögliche Auswirkungen auf andere zelluläre Prozesse nicht systematisch untersucht. Darüber hinaus erfolgte keine absolute Kalibrierung der Ca^{2+} -Konzentrationen, sodass die gemessenen Werte als relative Veränderungen interpretiert werden müssen.

Die Analyse basiert auf einem mittleren Fura-Ratio pro Zelle und erfasst somit globale Ca^{2+} -Signale. Es ist aber bekannt, dass Ca^{2+} -Signale in Immunzellen hochgradig lokal organisiert sein können und insbesondere Mikrodomänen an der immunologischen Synapse eine entscheidende Rolle bei der Regulation der Vesikelfusion spielen (Guse, 2015; Quintana et al., 2011; E. C. Schwarz et al., 2013). Solche lokalen Signalereignisse werden durch die gewählte Methodik nicht erfasst und könnten funktionell relevante Dynamiken überdecken. Mit den vorhandenen experimentellen Werkzeugen wäre eine Analyse solcher lokalen Signale möglich, wurde jedoch im Rahmen dieser Arbeit nicht durchgeführt.

Kapitel 4 Diskussion

Ein weiterer limitierender Faktor ist die zeitliche Auflösung der Messungen. Die Aufnahmeintervalle von 30 Sekunden erlauben keine Detektion sehr schneller oder transienter Ca^{2+} -Signale. Insbesondere frühe Aktivierungsprozesse, kurzzeitige Signalfluktuationen oder auch die Peakhöhe könnten daher unterschätzt worden sein.

Konzeptionelle Limitationen

Neben methodischen Aspekten bestehen auch Limitationen hinsichtlich der funktionellen Interpretation der Daten. So wurde nicht direkt untersucht, ob Kontakte ohne nachfolgende Zytotoxizität auf ein vollständiges Ausbleiben von Degranulation oder auf eine ineffiziente Wirkung freigesetzter Granula zurückzuführen sind. Die Kombination von Ca^{2+} -Messungen mit funktionellen Degranulationsassays, beispielsweise durch parallele Detektion von LAMP1-Exposition, könnte hier Klarheit schaffen.

Ein weiterer nicht untersuchter Aspekt ist das serielle Töten von Zielzellen durch einzelne NK-Zellen. Da sich die zytotoxische Kapazität sowie die eingesetzten Mechanismen im Verlauf mehrerer Zielzellkontakte verändern können, ist es denkbar, dass Ca^{2+} -Signale in späteren Interaktionen anderen Dynamiken folgen als in initialen Kontakten.

Das verwendete pCasper-System erlaubt die Unterscheidung zwischen lebenden, apoptotischen und nekrotischen Zellen. Allerdings ist bekannt, dass eine Vielzahl weiterer Zelltodformen existiert, die phänotypisch ähnlich erscheinen, jedoch unterschiedlichen molekularen Mechanismen folgen (Galluzzi et al., 2018). So können Pyroptosen morphologisch als Nekrosen erscheinen, werden jedoch durch Granzym-B-vermittelte Aktivierung von Gasdermin E ausgelöst (Y. Liu et al., 2020; Tuomela et al., 2022). Dieser Prozess erfolgt über die Aktivierung von Caspase-3, die wiederum Gasdermin E spaltet (Y. Liu et al., 2024). In pCasper-exprimierenden Zellen würde dies sowohl zu einer Spaltung des FRET-Konstrukts als auch zu einer Membranruptur führen. Der als „mixed Phänotyp“ klassifizierte Zelltod könnte daher zumindest teilweise pyroptotische Ereignisse umfassen.

Zusätzlich existieren weitere Zelltodformen wie die Nekroptose, bei der MLKL („mixed lineage kinase domain like“)-Oligomere Poren in der Zellmembran bilden (Newton et al., 2024). Es gibt Hinweise darauf, dass durch NK-Zellen induzierte Nekrosen in bestimmten Kontexten Nekroptosen darstellen könnten (Zhu et al., 2021). Allerdings ist auch bekannt, dass Apoptoseinduktion durch Granzym und Nekroseninduktion durch Perforin parallel stattfinden können (Tuomela et al., 2022). Diese Prozesse lassen sich mit den hier verwendeten Methoden nicht eindeutig differenzieren.

4.2.4 Perspektiven und Implikationen der $[Ca^{2+}]_{int}$ -Messung in primären NK-Zellen

Experimentelle Perspektiven

Ausgehend von den vorliegenden Ergebnissen ergeben sich mehrere Ansätze für weiterführende Untersuchungen. Die gezielte Induktion definierter Ca^{2+} -Signale, beispielsweise durch photolabile Chelatoren wie NP-EGTA, könnte helfen, die kausale Rolle von Signalstärke und -dauer unabhängig von Rezeptoraktivierung zu analysieren (Ellis-Davies and Kaplan, 1994).

Ebenso erscheint die Untersuchung weiterer Zielzelllinien sinnvoll, um zu klären, inwieweit die beobachtete Konvergenz der Ca^{2+} -Signalstärke unabhängig von den jeweils beteiligten Aktivierungsrezeptoren ist. Ergänzend könnten Ca^{2+} -Messungen nach artifizieller Rezeptoraktivierung, wie sie beispielsweise von Bryceson et al. (2009) beschrieben wurden, weitere Einblicke liefern. Auch die Analyse von Fas-sensitiven Zielzelllinien wie Jurkat E6.1 wäre hilfreich. Mittels CMA-Inkubation ließen sich zusätzlich Fas-sensitive von perforinabhängiger Zytotoxizität unterscheiden.

Die systematische Variation der extrazellulären Ca^{2+} -Konzentration stellt einen weiteren vielversprechenden Ansatz dar, um den Einfluss auf die Wahrscheinlichkeit von Abtötungs-Ereignissen sowie auf das Verhältnis unterschiedlicher Zelltodformen zu untersuchen. Ebenso könnten gezielte Eingriffe in das Ca^{2+} -Signaling, etwa durch Blockade von ORAI-Kanälen oder durch den Einsatz von Chelatoren wie BAPTA, genutzt werden, wobei mögliche Effekte auf Zielzellen berücksichtigt werden müssen.

Klinische Implikationen

Schließlich ergeben sich aus den vorliegenden Daten auch klinische Implikationen. Ca^{2+} -Kanäle, insbesondere Komponenten des SOCE, stellen vielversprechende pharmakologische Zielstrukturen dar. So beeinflussen entsprechende Interventionen nicht nur Immunzellen, sondern auch Tumorzellen selbst, in denen Ca^{2+} -Kanäle häufig überexprimiert sind und zur Proliferation beitragen (Hoth, 2016; E. C. Schwarz et al., 2013). Frühere Arbeiten zeigen, dass eine reduzierte extrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration die Proliferation von Tumorzellen hemmen kann, während die zytotoxische Funktion von NK-Zellen vergleichsweise weniger stark beeinträchtigt wird (Kaschek et al., 2021). STIM- und ORAI-Proteine sind daher für die Krebstherapie von Interesse, da ihre veränderte Expression und Aktivität in vielen Tumorarten mit tumorfördernden Eigenschaften assoziiert ist (Moccia et al., 2016). Sie stellen aber auch bei nicht-onkologischen Erkrankungen wie der akuten Pankreatitis potenzielle Zielstrukturen dar, weil dort pathologische Ca^{2+} -Überladung wesentlich zur

Zellschädigung beiträgt (J.-H. Chen et al., 2025). Mit Zegocractin (CM4620) befindet sich ein SOCE-Inhibitor aktuell in klinischer Entwicklung. Dieser beeinflusst sowohl die Zytotoxizität als auch die Zytokinproduktion von NK-Zellen, unter anderem durch Modulation von NFAT- und NF- κ B-Signalwegen, und führt zu transkriptionellen Veränderungen, die aktivierte NK-Zellen in einen weniger stimulierten Zustand überführen (Stephanou et al., 2026).

Für die gezielte therapeutische Nutzung solcher Ansätze ist jedoch ein noch detaillierteres Verständnis der zugrunde liegenden Ca^{2+} -abhängigen Mechanismen erforderlich, insbesondere im Hinblick auf die nichtlineare und probabilistische Beziehung zwischen Ca^{2+} -Signalen und zytotoxischem Outcome.

4.3 Einfluss der CAR-Expression auf Ca^{2+} -Signale und Zytotoxizität

4.3.1 Zytotoxizität von CAR NK-Zellen

Die Einzelzellanalysen zeigen, dass CAR NK-Zellen im Vergleich zu NT NK-Zellen eine deutlich erhöhte Effizienz in der Zielzellabtötung der CD19-positiven Zelllinie NALM-6 aufweisen. Insbesondere steigt die Wahrscheinlichkeit produktiver Interaktionen, während Kontakte ohne nachfolgende Lyse bei NT NK-Zellen häufiger auftreten. Gleichzeitig bleibt die Fähigkeit zum seriellen Töten in beiden Populationen erhalten, ist jedoch bei CAR NK-Zellen häufiger ausgeprägt.

Die beobachtete erhöhte Effizienz der CAR NK-Zellen steht im Einklang mit früheren Arbeiten, die für CD19-spezifische CAR NK-Zellen eine gesteigerte antigenspezifische Zytotoxizität beschrieben haben (E. Liu et al., 2020). Die in dieser Arbeit verwendeten CAR NK-Zellen basieren dabei auf einem von Bexte et al. etablierten System, das bereits eine hohe antileukämische Effizienz bei gleichzeitig günstiger Sicherheitscharakteristik gezeigt hat (Bexte et al., 2024, Bexte et al., 2021). Trotz dieser quantitativen Unterschiede zeigen die Daten keine Hinweise auf eine grundlegende Veränderung der zytotoxischen Mechanismen. Die Art des Zielzelltodes bleibt vergleichbar, wobei apoptotische Verläufe dominieren, jedoch auch gemischte und nekrotische Phänotypen auftreten. Dies spricht dafür, dass die Expression des CD19-CAR primär die Effizienz der Zielzellabtötung erhöht, ohne die zugrunde liegende Effektorbiologie der NK-Zellen wesentlich zu verändern.

Auch der Erhalt der natürlichen Zytotoxizität stützt diese Interpretation. Gegen CD19-negative K562-Zellen zeigen CAR und NT NK-Zellen vergleichbare Zytotoxizitäts-Raten und ein

ähnliches Verhältnis von apoptotischen und nekrotischen Verläufen. Dies entspricht früheren Beobachtungen, wonach CAR-modifizierte NK-Zellen ihre intrinsischen Erkennungs- und Effektormechanismen weitgehend beibehalten und durch CAR-Signale funktionell ergänzt werden (Dash et al., 2024).

Bemerkenswert ist die ausgeprägte funktionelle Heterogenität auf Einzelzelebene. Individuelle NK-Zellen zeigen unterschiedliche Interaktionsmuster und können im Verlauf mehrere Abtötungs-Modi durchlaufen. Diese Beobachtung unterstreicht, dass populationsbasierte Analysen die funktionelle Diversität von NK-Zellen nur unzureichend abbilden und dass die Effektivität der Immunantwort maßgeblich durch die Dynamik einzelner Zellinteraktionen bestimmt wird.

Insgesamt deuten die Daten darauf hin, dass CAR-Expression primär die Wahrscheinlichkeit erfolgreicher Zielzellabtötung erhöht, während die grundlegenden Mechanismen der NK-Zell-Zytotoxizität erhalten bleiben.

4.3.2 Ca^{2+} Signale von CAR NK-Zellen

Die Analyse der Ca^{2+} -Signale (Abbildung 40) zeigt, dass die CAR-Expression zu einer deutlichen Verstärkung der Aktivierungssignale führt. Bei CD19-positiven Zielzellen (NALM-6) sind die Ca^{2+} -Peaks in CAR NK-Zellen signifikant erhöht im Vergleich zu NT NK-Zellen. Dies ist konsistent mit der zusätzlichen Aktivierung durch den CAR, der funktionell als starker aktivierender Rezeptor wirkt und die Signalintegration zugunsten aktivierender Signale verschiebt (Sadelain et al., 2013).

Das in dieser Arbeit verwendete CAR-Konstrukt basiert auf einer zweiten Generation mit 4-1BB-Co-Stimulation und CD3 ζ -Signaldomäne, wobei insbesondere die CD3 ζ -assoziierten ITAM-Motive nach Antigenbindung über ZAP70/Syk-vermittelte Signalwege zur Aktivierung von PLC γ führen (Bexte et al., 2024).

Trotz dieser verstärkten Aktivierung bleiben grundlegende Parameter der Ca^{2+} -Dynamik unverändert. Weder das basale Ca^{2+} -Niveau noch die Abklingzeit der Ca^{2+} -Signale unterscheiden sich zwischen CAR und NT NK-Zellen. Dies spricht gegen eine generelle Voraktivierung oder globale Dysregulation der Ca^{2+} -Homöostase durch die CAR-Expression.

Auch in CAR-unabhängigen Interaktionen bestätigt sich dieses Bild: Bei CD19-negativen Zielzellen (K562) zeigen CAR und NT NK-Zellen vergleichbare Ca^{2+} -Signale und Zytotoxizität, was darauf hinweist, dass die natürliche Zytotoxizität durch die CAR-Transduktion nicht beeinträchtigt wird.

		gleich		verschieden			
K562	Basales Ca^{2+}		Δ Peak		Abklingzeit		
CAR	NT NK	CAR NK	NT NK	CAR NK	NT NK	CAR NK	
Inaktive	1,4	1,4					
Apoptose	1,4	1,4	2,1	1,9	16 min	13,3 min	
Nekrose	1,4	1,4	1,9	1,9	6,9 min	6,5 min	
Mixed	1,3	1,4	2,1	2,0	7,5 min	8,8 min	
Kontakt ohne Kill	1,4	1,3	1,5	1,5	14,6 min	11,17 min	

NALM-6	Basales Ca^{2+}		Δ Peak		Abklingzeit		
CAR	NT NK	CAR NK	NT NK	CAR NK	NT NK	CAR NK	
Inaktive	1,4	1,4					
Apoptose	1,4	1,4	1,2	1,8	10,9 min	10,1 min	
Nekrose	1,5	1,5	1,6	2,2	7,3 min	7,3 min	
Mixed	1,4	1,4	1,9	1,9	8,7 min	9,5 min	
Kontakt ohne Kill	1,4	1,4	1,0	1,7	11,1 min	10,3 min	

Abbildung 40: Tabelle mit Ca^{2+} -Signalen in CAR und NT NK-Zellen

Schematische Übersicht der wesentlichen Ergebnisse zu basalem Ca^{2+} -Signal, Δ Peak, Abklingzeit und Killzeit CAR und NT NK-Zellen während der Interaktion mit K562- und NALM-6-Zielzellen. Angegeben sind die gemittelten Werte der jeweiligen Parameter für unterschiedliche Interaktionsausgänge (inaktive NK-Zellen, Apoptose, Nekrose, Mixed Phänotyp und Kontakt ohne Kill). Pfeile kennzeichnen die wesentlichen relativen Trends innerhalb der jeweiligen Parameter: violett insgesamt ohne signifikante Unterschiede und orange Unterschiede mit signifikanten Unterschieden. Graue Mittelwerte weisen darauf hin, dass die Anzahl an untersuchten Zellen gering ist.

Wie bereits in primären NK-Zellen beobachtet, besteht trotz erhöhter Ca^{2+} -Peaks keine klare Korrelation mit dem konkreten Abtötungsphänotyp. Weder innerhalb der CAR NK-Zellen noch im Vergleich zu NT NK-Zellen lässt sich ein eindeutiger Zusammenhang zwischen Peak-Höhe und Art des Zielzelltodes herstellen. Dies unterstützt die in Kapitel 4.2 formulierte Hypothese, dass Ca^{2+} -Signale die Wahrscheinlichkeit einer Abtötung modulieren, jedoch nicht deterministisch dessen Ausgang festlegen.

Die Abklingzeit der Ca^{2+} -Signale unterscheidet sich primär zwischen verschiedenen Zielzelltypen, nicht jedoch zwischen CAR und NT NK-Zellen. Dies bestätigt die Beobachtung aus den primären NK-Zellen, dass die Signalterminierung maßgeblich durch die Interaktion mit der Zielzelle bestimmt wird. Unterschiede zwischen NALM-6, K562 und TMD8 könnten dabei auf variierende Sensitivität gegenüber zytotoxischen Mechanismen, auf

Membraneigenschaften oder auf intrinsische Signalprozesse der Zielzellen zurückzuführen sein.

Auffällig ist jedoch, dass sich für NALM-6 keine Unterschiede in der Abklingzeit zwischen den verschiedenen Zytotoxizitätsarten zeigen, was in Kontrast zu den Ergebnissen aus TMD8 und K562 steht. Anders als bei den Analysen mit primären NK-Zellen wurde für NALM-6 die Zeit bis zum Zielzelltod nicht gesondert ausgewertet. Es wäre daher interessant zu prüfen, ob sich hier eine ähnliche Verteilung wie bei K562 und TMD8 zeigt oder ob analog zur Abklingzeit keine Unterschiede zwischen den Zytotoxizitätsarten erkennbar sind. Zudem ist nicht auszuschließen, dass die geringe Zahl analysierter Nekrosen dazu beigetragen hat, dass bestehende Unterschiede statistisch nicht nachweisbar waren, auch wenn sich ein entsprechender Trend andeutet. Auch hier unterscheiden sich die Ca^{2+} -Signalhöhen signifikant zwischen NK-Zellen mit erfolgreichem Killing und NK-Zellen, die nur Kontakte ohne nachfolgende Abtötung eingehen, entsprechend den Beobachtungen bei TMD8.

Zudem sind die absoluten Ca^{2+} -Signalhöhen in CAR und NT NK-Zellen insgesamt niedriger als in den zuvor untersuchten primären NK-Zellen. Dies könnte auf Unterschiede im Aktivierungszustand zurückzuführen sein, da die hier verwendeten Zellen über längere Zeit expandiert und mit IL-2 und IL-15 stimuliert wurden, während die primären NK-Zellen frisch isoliert und nur kurzfristig stimuliert wurden.

Zusammenfassend zeigen die Daten, dass CAR-Signaling die Stärke der initialen Ca^{2+} -Aktivierung erhöht und damit die Wahrscheinlichkeit einer erfolgreichen Abtötung steigert, ohne die grundlegende Regulation der Ca^{2+} -Dynamik oder die Mechanismen der Zielzellabtötung zu verändern.

4.3.3 Klinische Relevanz und Implikationen der Analysen in CAR NK-Zellen

Die vorliegenden Ergebnisse liefern wichtige mechanistische Einblicke in die Wirkweise von CAR NK-Zellen und deren potenzielle therapeutische Vorteile. Im Gegensatz zu CAR T-Zellen, bei denen starke Aktivierungssignale häufig mit schweren Nebenwirkungen wie Cytokine Release Syndrome (CRS) oder Neurotoxizität einhergehen, zeigen CAR NK-Zellen in diesem Modell keine Hinweise auf eine globale Hyperaktivierung. Dies steht im Einklang mit aktuellen Studien, die für CAR NK-Zellen ein günstigeres Sicherheitsprofil mit reduzierter systemischer Zytokinfreisetzung und geringer Neurotoxizität beschreiben (Biederstädt and Rezvani, 2025; E. Liu et al., 2020; Morcillo-Martín-Romo et al., 2025).

Kapitel 4 Diskussion

Limitationen der vorliegenden Arbeit ergeben sich insbesondere aus dem in vitro Charakter des Systems sowie der begrenzten Spenderzahl. Zudem erlaubt die verwendete Methodik keine direkte Quantifizierung von Degranulation oder synaptischer Stabilität. Dennoch liefert die Kombination aus Ca^{2+} -Imaging und Einzelzellanalyse einen detaillierten Einblick in die Dynamik der NK-Zell-Zytotoxizität und stellt eine wertvolle Grundlage für zukünftige Studien dar.

Die vorliegenden Daten deuten darauf hin, dass CAR-Signaling in NK-Zellen primär die Aktivierungsschwelle moduliert und die Wahrscheinlichkeit eines erfolgreichen Abtötungs-Ereignisses erhöht, ohne die grundlegende Effektorbiologie der Zellen zu verändern. Diese Beobachtung ist insbesondere vor dem Hintergrund des in Kapitel 4.2 entwickelten probabilistischen Modells der NK-Zell-Zytotoxizität von Bedeutung. Demnach wirkt das Ca^{2+} -Signal nicht als deterministischer Schalter, sondern als integrativer Parameter, der die Wahrscheinlichkeit der Effektorphase moduliert. Die Verstärkung der Ca^{2+} -Peaks durch CAR-Signaling lässt sich somit als gezielte Verschiebung dieser Aktivierungswahrscheinlichkeit interpretieren, ohne die nachgeschalteten zellulären Entscheidungsprozesse grundlegend zu verändern.

Diese Form der funktionellen Modulation könnte ein entscheidender Vorteil für therapeutische Anwendungen sein. Während CAR T-Zellen häufig eine starke und teils schwer kontrollierbare Aktivierung auslösen, die mit Zytokinfreisetzungssyndrom und Neurotoxizität einhergehen kann (Morris et al., 2022), scheinen CAR NK-Zellen ihre natürlichen Rezeptorprogramme und ihre intrinsische Zytotoxizität weitgehend zu erhalten und durch CAR-Signale funktionell zu ergänzen (Kong et al., 2024). Die in dieser Arbeit beobachtete Erhaltung der natürlichen Zytotoxizität unterstützt diese Beobachtungen. CAR NK-Zellen bleiben in der Lage, auch CAR-unabhängige Zielzellen effizient zu erkennen und zu eliminieren, was insbesondere bei heterogenen Tumoren oder Antigenverlustvarianten von klinischer Relevanz ist (Chiossone & Vivier, 2022; Vivier et al., 2024).

Klinische Daten bestätigen das therapeutische Potenzial dieses Ansatzes. In einer ersten klinischen Studie mit CD19-spezifischen CAR NK-Zellen zeigten behandelte Patienten ein rasches Ansprechen mit teilweise vollständigen Remissionen bei gleichzeitig geringer Toxizität (E. Liu et al., 2020). Dies wurden in einer späteren Phase-1/2-Studie mit allogenen CD19-spezifischen CAR/IL-15-NK-Zellen bestätigt, die ebenfalls eine gute Verträglichkeit und klinische Wirksamkeit bei CD19-positiven B-Zell-Malignomen belegte (Marin et al., 2024). Aktuelle Entwicklungen zielen darauf ab, die Persistenz und Funktionalität von CAR

Kapitel 4 Diskussion

NK-Zellen weiter zu verbessern, beispielsweise durch die Expression zusätzlicher Zytokine oder durch genetische Modulation inhibitorischer Signalwege (Jørgensen et al., 2025).

Darüber hinaus könnte auch die Kombination von CAR NK- und CAR T-Zellen therapeutisch interessant sein. Friedmann et al., (2022) zeigten, dass die Reihenfolge sequenzieller NK- und T-Zell-Angriffe das Ansprechen überlebender Tumorzellen beeinflusst. Dies legt nahe, dass auch für kombinierte CAR NK-/CAR T-Strategien die zeitliche Abfolge der Therapie relevant sein könnte.

Über die Onkologie hinaus eröffnen sich zunehmend neue Anwendungsfelder für CAR-basierte NK-Zelltherapien. Insbesondere bei Autoimmunerkrankungen, bei denen eine selektive Eliminierung pathogener Zellpopulationen erforderlich ist, könnten CAR NK-Zellen aufgrund ihrer kontrollierten Aktivierung und ihres günstigen Sicherheitsprofils von besonderem Vorteil sein (Cayatte et al., 2026). Die Daten zeigen, dass CAR NK-Zellen effizienter in ihrer Zytotoxizität werden, wobei sie ihre Regulation nicht verlieren. Dies legt nahe, dass CAR NK-Zellen gezielt auf pathologische Zielzellen reagieren können, ohne in einen dauerhaft überaktivierten Zustand überzugehen. Dies könnte das Risiko überschießender Immunreaktionen reduzieren und die langfristige therapeutische Anwendung erleichtern.

Gleichzeitig unterstreichen die Ergebnisse die Bedeutung der funktionellen Heterogenität von NK-Zellen. Die beobachteten Unterschiede auf Einzelzellebene deuten darauf hin, dass die Effektivität der Immunantwort maßgeblich durch die Dynamik individueller Zellinteraktionen bestimmt wird. Zukünftige therapeutische Strategien könnten daher davon profitieren, besonders effektive Subpopulationen gezielt zu expandieren oder CAR-Designs so zu optimieren, dass sie spezifische Aktivierungsprofile fördern.

Zusammenfassend zeigen die vorliegenden Daten, dass Ca^{2+} -Signale eine zentrale, jedoch nicht deterministische Rolle in der NK-Zell-Zytotoxizität einnehmen. Während der Ca^{2+} -Einstrom essenziell für die Ausführung zytotoxischer Effektormechanismen ist, moduliert er primär die Wahrscheinlichkeit eines erfolgreichen Abtötungs-Ereignisses. Im Kontext CAR-modifizierter NK-Zellen führt dies zu einer gezielten Verstärkung der Aktivierung, ohne die zugrunde liegende Regulation der Zellfunktion zu verändern. Diese Eigenschaft macht CAR NK-Zellen zu einem vielversprechenden Ansatz für zukünftige Immuntherapien, bei denen eine präzise Balance zwischen Effektivität und Kontrolle erforderlich ist.

5 Literaturverzeichnis

- Adib, Y., Boy, M., Serror, K., Dulphy, N., Des Courtils, C., Duciel, L., Boccara, D., Mimoun, M., Samardzic, M., Bagot, M., Bensussan, A., & Michel, L. (2023). Modulation of NK cell activation by exogenous calcium from alginate dressings in vitro. *Frontiers in Immunology*, 14, 1141047. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1141047>
- Aguilar, O. A., Fong, L.-K., & Lanier, L. L. (2024). ITAM-based Receptors in Natural Killer cells. *Immunological reviews*, 323(1), 40–53. <https://doi.org/10.1111/imr.13313>
- Allbritton, N. L., Meyer, T., & Stryer, L. (1992). Range of messenger action of calcium ion and inositol 1,4,5-trisphosphate. *Science*, 258(5089), 1812–1815. <https://doi.org/10.1126/science.1465619>
- Anft, M., Netter, P., Urlaub, D., Prager, I., Schaffner, S., & Watzl, C. (2020). NK cell detachment from target cells is regulated by successful cytotoxicity and influences cytokine production. *Cellular and Molecular Immunology*, 17(4), 347–355. <https://doi.org/10.1038/s41423-019-0277-2>
- Backes, C. S., Friedmann, K. S., Mang, S., Knörck, A., Hoth, M., & Kummerow, C. (2018). Natural killer cells induce distinct modes of cancer cell death: Discrimination, quantification, and modulation of apoptosis, necrosis, and mixed forms. *The Journal of Biological Chemistry*, 293(42), 16348–16363. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA118.004549>
- Barber, D. F., & Long, E. O. (2003). Coexpression of CD58 or CD48 with intercellular adhesion molecule 1 on target cells enhances adhesion of resting NK cells. *Journal of Immunology*, 170(1), 294–299. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.170.1.294>
- Bautista, D. M., Hoth, M., & Lewis, R. S. (2002). Enhancement of calcium signalling dynamics and stability by delayed modulation of the plasma-membrane calcium-ATPase in human T cells. *The Journal of Physiology*, 541(Pt 3), 877–894. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2001.016154>
- Becherer, U., & Rettig, J. (2006). Vesicle pools, docking, priming, and release. *Cell and Tissue Research*, 326(2), 393–407. <https://doi.org/10.1007/s00441-006-0243-z>
- Berridge, M. J., Bootman, M. D., & Roderick, H. L. (2003). Calcium signalling: Dynamics, homeostasis and remodelling. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 4(7), 517–529. <https://doi.org/10.1038/nrm1155>
- Bewarder, M., Kiefer, M., Will, H., Olesch, K., Moelle, C., Stilgenbauer, S., Christofyllakis, K., Kaddu-Mulindwa, D., Bittenbring, J. T., Fadle, N., Regitz, E., Kaschek, L., Hoth, M., Neumann, F., Preuss, K.-D., Pfreundschuh, M., & Thurner, L. (2021). The B-cell Receptor Autoantigen LRPAP1 Can Replace Variable Antibody Regions to Target Mantle Cell Lymphoma Cells. *HemaSphere*, 5(8), e620. <https://doi.org/10.1097/HS9.0000000000000620>
- Bexte, T., Botezatu, L., Miskey, C., Campe, J., Reindl, L. M., Gebel, V., Wels, W. S., Hudecek, M., Ivics, Z., & Ullrich, E. (2021). Non-Viral *Sleeping Beauty* Transposon Engineered CD19-CAR-NK Cells Show a Safe Genomic Integration Profile and High Antileukemic Efficiency. *Blood*, 138, 2797. <https://doi.org/10.1182/blood-2021-153999>
- Bexte, T., Botezatu, L., Miskey, C., Gierschek, F., Moter, A., Wendel, P., Reindl, L. M., Campe, J., Villena-Ossa, J. F., Gebel, V., Stein, K., Cathomen, T., Cremer, A., Wels, W. S., Hudecek, M., Ivics, Z., & Ullrich, E. (2024). Engineering of potent CAR NK cells using non-viral *Sleeping Beauty* transposition from minimalistic DNA vectors. *Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy*, 32(7), 2357–2372. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2024.05.022>
- Biederstädt, A., & Rezvani, K. (2025). Engineered natural killer cells for cancer therapy. *Cancer Cell*, 43(11), 1987–2013. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2025.09.013>

- Bryceson, Y. T., Ljunggren, H.-G., & Long, E. O. (2009). Minimal requirement for induction of natural cytotoxicity and intersection of activation signals by inhibitory receptors. *Blood*, 114(13), 2657–2666. <https://doi.org/10.1182/blood-2009-01-201632>
- Bryceson, Y. T., & Long, E. O. (2008). Line of attack: NK cell specificity and integration of signals. *Current Opinion in Immunology*, 20(3), 344–352. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2008.03.005>
- Bryceson, Y. T., March, M. E., Ljunggren, H.-G., & Long, E. O. (2006a). Activation, co-activation, and co-stimulation of resting human NK cells. *Immunological reviews*, 214, 10.1111/j.1600-065X.2006.00457.x. <https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2006.00457.x>
- Bryceson, Y. T., March, M. E., Ljunggren, H.-G., & Long, E. O. (2006b). Synergy among receptors on resting NK cells for the activation of natural cytotoxicity and cytokine secretion. *Blood*, 107(1), 159–166. <https://doi.org/10.1182/blood-2005-04-1351>
- Caligiuri, M. A. (2008). Human natural killer cells. *Blood*, 112(3), 461–469. <https://doi.org/10.1182/blood-2007-09-077438>
- Carlsten, M., & Childs, R. W. (2015). Genetic Manipulation of NK Cells for Cancer Immunotherapy: Techniques and Clinical Implications. *Frontiers in Immunology*, 6, 266. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00266>
- Cayatte, M., Picant, V., Vétizou, M., & Vivier, E. (2026). Bringing natural killer cells to the clinic: Opportunities beyond cancer. *The Journal of Experimental Medicine*, 223(1), e20250612. <https://doi.org/10.1084/jem.20250612>
- Chemspider. (2026, April 6). *Chemspider 2026*. <https://www.chemspider.com/Chemical-Structure.17289963.html>
- Chen, J.-H., Sutton, R., & Wen, L. (2025). Novel drug targets for the early treatment of acute pancreatitis: Focusing on calcium signaling. *Hepatobiliary & Pancreatic Diseases International: HBPDI*, 24(4), 359–370. <https://doi.org/10.1016/j.hbpd.2025.06.001>
- Chen, S., Zhu, H., & Jounaidi, Y. (2024). Comprehensive snapshots of natural killer cells functions, signaling, molecular mechanisms and clinical utilization. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 9(1), 302. <https://doi.org/10.1038/s41392-024-02005-w>
- Chen, T.-W., Wardill, T. J., Sun, Y., Pulver, S. R., Renninger, S. L., Baohan, A., Schreiter, E. R., Kerr, R. A., Orger, M. B., Jayaraman, V., Looger, L. L., Svoboda, K., & Kim, D. S. (2013). Ultrasensitive fluorescent proteins for imaging neuronal activity. *Nature*, 499(7458), 295–300. <https://doi.org/10.1038/nature12354>
- Chen, Y., Lu, D., Churov, A., & Fu, R. (2020). Research Progress on NK Cell Receptors and Their Signaling Pathways. *Mediators of Inflammation*, 2020, 6437057. <https://doi.org/10.1155/2020/6437057>
- Chiossone, L., & Vivier, E. (2022). Bringing natural killer cells to the clinic. *The Journal of Experimental Medicine*, 219(10), e20220830. <https://doi.org/10.1084/jem.20220830>
- Chitirala, P., Ravichandran, K., Galgano, D., Sleiman, M., Krause, E., Bryceson, Y. T., & Rettig, J. (2019). Cytotoxic Granule Exocytosis From Human Cytotoxic T Lymphocytes Is Mediated by VAMP7. *Frontiers in Immunology*, 10, 1855. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01855>
- Clapham, D. E. (2007). Calcium signaling. *Cell*, 131(6), 1047–1058. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.11.028>
- Crinier, A., Milpied, P., Escalière, B., Piperoglou, C., Galluso, J., Balsamo, A., Spinelli, L., Cervera-Marzal, I., Ebbo, M., Girard-Madoux, M., Jaeger, S., Bollon, E., Hamed, S., Hardwigsen, J., Ugolini, S., Vély, F., Narni-Mancinelli, E., & Vivier, E. (2018). High-Dimensional Single-Cell Analysis Identifies Organ-Specific Signatures and Conserved NK Cell Subsets in Humans and Mice. *Immunity*, 49(5), 971–986.e5. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2018.09.009>

- Dabrazhynetskaya, A., Ma, J., Guerreiro-Cacais, A. O., Arany, Z., Rudd, E., Henter, J.-I., Karre, K., Levitskaya, J., & Levitsky, V. (2012). Syntaxin 11 marks a distinct intracellular compartment recruited to the immunological synapse of NK cells to colocalize with cytotoxic granules. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 16(1), 129–141. <https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2011.01280.x>
- Dash, C. P., Sonowal, D., Dhaka, P., Yadav, R., Chettri, D., Satapathy, B. P., Sheoran, P., Uttam, V., Jain, M., & Jain, A. (2024). Antitumor activity of genetically engineered NK-cells in non-hematological solid tumor: A comprehensive review. *Frontiers in Immunology*, 15. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2024.1390498>
- De Maria, R., Fais, S., Silvestri, M., Frati, L., Pallone, F., Santoni, A., & Testi, R. (1993). Continuous in vivo activation and transient hyporesponsiveness to TcR/CD3 triggering of human gut lamina propria lymphocytes. *European Journal of Immunology*, 23(12), 3104–3108. <https://doi.org/10.1002/eji.1830231209>
- de Saint Basile, G., Ménasché, G., & Fischer, A. (2010). Molecular mechanisms of biogenesis and exocytosis of cytotoxic granules. *Nature Reviews. Immunology*, 10(8), 568–579. <https://doi.org/10.1038/nri2803>
- Degli-Esposti, M. A., & Smyth, M. J. (2005). Close encounters of different kinds: Dendritic cells and NK cells take centre stage. *Nature Reviews. Immunology*, 5(2), 112–124. <https://doi.org/10.1038/nri1549>
- Deguine, J., Breart, B., Lemaître, F., Di Santo, J. P., & Bousso, P. (2010). Intravital imaging reveals distinct dynamics for natural killer and CD8(+) T cells during tumor regression. *Immunity*, 33(4), 632–644. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2010.09.016>
- Dustin, M. L. (2007). Cell adhesion molecules and actin cytoskeleton at immune synapses and kinapses. *Current opinion in cell biology*, 19(5), 529–533. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2007.08.003>
- Dustin, M. L. (2014). The immunological synapse. *Cancer Immunology Research*, 2(11), 1023–1033. <https://doi.org/10.1158/2326-6066.CIR-14-0161>
- Dustin, M. L., & Long, E. O. (2010). Cytotoxic immunological synapses. *Immunological Reviews*, 235(1), 24–34. <https://doi.org/10.1111/j.0105-2896.2010.00904.x>
- Ellis-Davies, G. C., & Kaplan, J. H. (1994). Nitrophenyl-EGTA, a photolabile chelator that selectively binds Ca²⁺ with high affinity and releases it rapidly upon photolysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91(1), 187–191. <https://doi.org/10.1073/pnas.91.1.187>
- Erdogmus, S., Concepcion, A. R., Yamashita, M., Sidhu, I., Tao, A. Y., Li, W., Rocha, P. P., Huang, B., Garippa, R., Lee, B., Lee, A., Hell, J. W., Lewis, R. S., Prakriya, M., & Feske, S. (2022). Cavβ1 regulates T cell expansion and apoptosis independently of voltage-gated Ca²⁺ channel function. *Nature Communications*, 13, 2033. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-29725-3>
- Fehniger, T. A., Shah, M. H., Turner, M. J., VanDeusen, J. B., Whitman, S. P., Cooper, M. A., Suzuki, K., Wechser, M., Goodsaid, F., & Caligiuri, M. A. (1999). Differential cytokine and chemokine gene expression by human NK cells following activation with IL-18 or IL-15 in combination with IL-12: Implications for the innate immune response. *Journal of Immunology*, 162(8), 4511–4520.
- Feinerman, O., Veiga, J., Dorfman, J. R., Germain, R. N., & Altan-Bonnet, G. (2008). Variability and robustness in T cell activation from regulated heterogeneity in protein levels. *Science*, 321(5892), 1081–1084. <https://doi.org/10.1126/science.1158013>
- Feldmann, J., Callebaut, I., Raposo, G., Certain, S., Bacq, D., Dumont, C., Lambert, N., Ouachée-Chardin, M., Chedeville, G., Tamary, H., Minard-Colin, V., Vilmer, E., Blanche, S., Le Deist, F., Fischer, A., & de Saint Basile, G. (2003). Munc13-4 is essential for cytolytic granules fusion and is mutated in a form of familial

- hemophagocytic lymphohistiocytosis (FHL3). *Cell*, 115(4), 461–473. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(03\)00855-9](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(03)00855-9)
- Feske, S. (2007). Calcium signalling in lymphocyte activation and disease. *Nature Reviews Immunology*, 7(9), 690–702. <https://doi.org/10.1038/nri2152>
- Feske, S., Gwack, Y., Prakriya, M., Srikanth, S., Puppel, S.-H., Tanasa, B., Hogan, P. G., Lewis, R. S., Daly, M., & Rao, A. (2006). A mutation in Orai1 causes immune deficiency by abrogating CRAC channel function. *Nature*, 441(7090), 179–185. <https://doi.org/10.1038/nature04702>
- Feske, S., Skolnik, E. Y., & Prakriya, M. (2012). Ion channels and transporters in lymphocyte function and immunity. *Nature Reviews Immunology*, 12(7), 532–547. <https://doi.org/10.1038/nri3233>
- Feske, S., Wulff, H., & Skolnik, E. Y. (2015). Ion channels in innate and adaptive immunity. *Annual Review of Immunology*, 33, 291–353. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-032414-112212>
- Filali, L., Puissegur, M.-P., Cortacero, K., Cussat-Blanc, S., Khazen, R., Van Acker, N., Frenois, F.-X., Abreu, A., Lamant, L., Meyer, N., Vergier, B., Müller, S., McKenzie, B., & Valitutti, S. (2022). Ultrarapid lytic granule release from CTLs activates Ca²⁺-dependent synaptic resistance pathways in melanoma cells. *Science Advances*, 8(7), eabk3234. <https://doi.org/10.1126/sciadv.abk3234>
- Freitas Monteiro, M., Papaserafeim, M., Réal, A., Puga Yung, G. L., & Seebach, J. D. (2020). Anti-CD20 rituximab IgG1, IgG3, and IgG4 but not IgG2 subclass trigger Ca²⁺ mobilization and cytotoxicity in human NK cells. *Journal of Leukocyte Biology*, 108(4), 1409–1423. <https://doi.org/10.1002/JLB.5MA0620-039R>
- Freud, A. G., Yu, J., & Caligiuri, M. A. (2014). Human natural killer cell development in secondary lymphoid tissues. *Seminars in immunology*, 26(2), 132–137. <https://doi.org/10.1016/j.smim.2014.02.008>
- Friedman, D., Simmonds, P., Hale, A., Bere, L., Hodson, N. W., White, M. R. H., & Davis, D. M. (2021). Natural killer cell immune synapse formation and cytotoxicity are controlled by tension of the target interface. *Journal of Cell Science*, 134(7), jcs258570. <https://doi.org/10.1242/jcs.258570>
- Friedmann, K. S., Bozem, M., & Hoth, M. (2019). Calcium signal dynamics in T lymphocytes: Comparing *in vivo* and *in vitro* measurements. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, SI: Calcium signalling, 94, 84–93. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2019.01.004>
- Friedmann, K. S., Kaschek, L., Knörck, A., Cappello, S., Lünsmann, N., Kückler, N., Hoxha, C., Schäfer, G., Iden, S., Bogeski, I., Kummerow, C., Schwarz, E. C., & Hoth, M. (2022). Interdependence of sequential cytotoxic T lymphocyte and natural killer cell cytotoxicity against melanoma cells. *The Journal of Physiology*, 600(23), 5027–5054. <https://doi.org/10.1113/JP283667>
- Galluzzi, L., Vitale, I., Aaronson, S. A., Abrams, J. M., Adam, D., Agostinis, P., Alnemri, E. S., Altucci, L., Amelio, I., Andrews, D. W., Annicchiarico-Petruzzelli, M., Antonov, A. V., Arama, E., Baehrecke, E. H., Barlev, N. A., Bazan, N. G., Bernassola, F., Bertrand, M. J. M., Bianchi, K., ... Kroemer, G. (2018). Molecular mechanisms of cell death: Recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. *Cell Death & Differentiation*, 25(3), 486–541. <https://doi.org/10.1038/s41418-017-0012-4>
- Ganesan, S., & Höglund, P. (2019). Inhibitory Receptor Crosslinking Quantitatively Dampens Calcium Flux Induced by Activating Receptor Triggering in NK Cells. *Frontiers in Immunology*, 9, 3173. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.03173>
- Ganesan, S., & Höglund, P. (2021). MHC class I molecules co-stimulate NK1.1 signaling and enhance Ca²⁺ flux in murine NK cells. *European Journal of Immunology*, 51(10), 2531–2534. <https://doi.org/10.1002/eji.202048709>

- Geiger, T. L., & Sun, J. C. (2016). Development and maturation of natural killer cells. *Current Opinion in Immunology*, 39, 82–89. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2016.01.007>
- Gerasimenko, O., & Tepikin, A. (2005). How to measure Ca^{2+} in cellular organelles? *Cell Calcium*, 38(3–4), 201–211. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2005.06.025>
- Gierschek, F., Schlueter, J., Kühnel, I., Feigl, F. F., Schmiedel, D., Prüfer, M., Buchinger, L., Cerwenka, A., Cappel, C., Huenecke, S., Köhl, U., Wels, W. S., & Ullrich, E. (2024). Empowering Natural Killer Cells to Combat Acute Myeloid Leukemia: Perspective on CAR-NK Cell Therapy. *Transfusion Medicine and Hemotherapy*, 52(1), 42–60. <https://doi.org/10.1159/000540962>
- Grandclément, C., Pick, H., Vogel, H., & Held, W. (2016). NK Cells Respond to Haptens by the Activation of Calcium Permeable Plasma Membrane Channels. *PLOS ONE*, 11(3), e0151031. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0151031>
- Grossman, W. J., Revell, P. A., Lu, Z. H., Johnson, H., Bredemeyer, A. J., & Ley, T. J. (2003). The orphan granzymes of humans and mice. *Current Opinion in Immunology*, 15(5), 544–552. [https://doi.org/10.1016/s0952-7915\(03\)00099-2](https://doi.org/10.1016/s0952-7915(03)00099-2)
- Grynkiewicz, G., Poenie, M., & Tsien, R. Y. (1985). A new generation of Ca^{2+} indicators with greatly improved fluorescence properties. *Journal of Biological Chemistry*, 260(6), 3440–3450. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)83641-4](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)83641-4)
- Guse, A. H. (2015). Calcium mobilizing second messengers derived from NAD. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1854(9), 1132–1137. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2014.12.015>
- Gwalani, L. A., & Orange, J. S. (2018). Single degranulations in Natural Killer cells can mediate target cell killing. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 200(9), 3231–3243. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1701500>
- Henter, J. I., Elinder, G., Söder, O., Hansson, M., Andersson, B., & Andersson, U. (1991). Hypercytokinemia in familial hemophagocytic lymphohistiocytosis. *Blood*, 78(11), 2918–2922.
- Herberman, R. B., Nunn, M. E., & Lavrin, D. H. (1975). Natural cytotoxic reactivity of mouse lymphoid cells against syngeneic acid allogeneic tumors. I. Distribution of reactivity and specificity. *International Journal of Cancer*, 16(2), 216–229. <https://doi.org/10.1002/ijc.2910160204>
- Hess, S. D., Oortgiesen, M., & Cahalan, M. D. (1993). Calcium oscillations in human T and natural killer cells depend upon membrane potential and calcium influx. *Journal of Immunology*, 150(7), 2620–2633.
- Hogan, P. G., Chen, L., Nardone, J., & Rao, A. (2003). Transcriptional regulation by calcium, calcineurin, and NFAT. *Genes & Development*, 17(18), 2205–2232. <https://doi.org/10.1101/gad.1102703>
- Hogan, P. G., Lewis, R. S., & Rao, A. (2010). Molecular basis of calcium signaling in lymphocytes: STIM and ORAI. *Annual Review of Immunology*, 28, 491–533. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.021908.132550>
- Honda, Y., & Miyazaki, S. (1996). Distinct Ca^{2+} response patterns in human natural killer cells during induction of necrosis or apoptosis of target cells. *Cell Calcium*, 19(4), 297–306. [https://doi.org/10.1016/S0143-4160\(96\)90070-6](https://doi.org/10.1016/S0143-4160(96)90070-6)
- Hoth, M. (2016). CRAC channels, calcium, and cancer in light of the driver and passenger concept. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research, Calcium and Cell Fate*, 1863(6, Part B), 1408–1417. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2015.12.009>
- Hoth, M., Fanger, C. M., & Lewis, R. S. (1997). Mitochondrial Regulation of Store-operated Calcium Signaling in T Lymphocytes. *The Journal of Cell Biology*, 137(3), 633–648. <https://doi.org/10.1083/jcb.137.3.633>
- Huss, M., Ingenhorst, G., König, S., Gassel, M., Dröse, S., Zeeck, A., Altendorf, K., & Wiczorek, H. (2002). Concanamycin A, the specific inhibitor of V-ATPases, binds to

- the V(o) subunit c. *The Journal of Biological Chemistry*, 277(43), 40544–40548. <https://doi.org/10.1074/jbc.M207345200>
- Jenkins, M. R., Rudd-Schmidt, J. A., Lopez, J. A., Ramsbottom, K. M., Mannering, S. I., Andrews, D. M., Voskoboinik, I., & Trapani, J. A. (2015). Failed CTL/NK cell killing and cytokine hypersecretion are directly linked through prolonged synapse time. *The Journal of Experimental Medicine*, 212(3), 307–317. <https://doi.org/10.1084/jem.20140964>
- Jørgensen, L. V., Christensen, E. B., Barnkob, M. B., & Barington, T. (2025). The clinical landscape of CAR NK cells. *Experimental Hematology & Oncology*, 14(1), 46. <https://doi.org/10.1186/s40164-025-00633-8>
- Kägi, D., Ledermann, B., Bürki, K., Seiler, P., Odermatt, B., Olsen, K. J., Podack, E. R., Zinkernagel, R. M., & Hengartner, H. (1994). Cytotoxicity mediated by T cells and natural killer cells is greatly impaired in perforin-deficient mice. *Nature*, 369(6475), 31–37. <https://doi.org/10.1038/369031a0>
- Kalman, R. E. (1960). A New Approach to Linear Filtering and Prediction Problems. *Journal of Basic Engineering*, 82(1), 35–45. <https://doi.org/10.1115/1.3662552>
- Kaschek, L., Vialle, J., Stopper, G., Hoffmann, M. D. A., Zöphel, S., Jansky, J., Kuchler, N., Schäfer, G., Moter, A., Wendel, P., Neumann, F., Schormann, C., Ullrich, E., Roma, L. P., Kummerow, C., Thurner, L., Schwarz, E. C., & Hoth, M. (2026). Fura-10, unlike fura-2, is suitable for long-term calcium imaging in natural killer (NK) cells without compromising cytotoxicity and can be combined with target cell death analysis. *Cell Calcium*, 133, 103091. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2025.103091>
- Kaschek, L., Zöphel, S., Knörck, A., & Hoth, M. (2021). A calcium optimum for cytotoxic T lymphocyte and natural killer cell cytotoxicity. *Seminars in Cell & Developmental Biology, Metals in Infectious Diseases*, 115, 10–18. <https://doi.org/10.1016/j.semcd.2020.12.002>
- Keefe, D., Shi, L., Feske, S., Massol, R., Navarro, F., Kirchhausen, T., & Lieberman, J. (2005). Perforin triggers a plasma membrane-repair response that facilitates CTL induction of apoptosis. *Immunity*, 23(3), 249–262. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2005.08.001>
- Kerr, J. F., Wyllie, A. H., & Currie, A. R. (1972). Apoptosis: A basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *British Journal of Cancer*, 26(4), 239–257. <https://doi.org/10.1038/bjc.1972.33>
- Khosravi-Far, R., & Esposti, M. D. (2004). Death receptor signals to mitochondria. *Cancer Biology & Therapy*, 3(11), 1051–1057. <https://doi.org/10.4161/cbt.3.11.1173>
- Kiessling, R., Klein, E., & Wigzell, H. (1975). „Natural“ killer cells in the mouse. I. Cytotoxic cells with specificity for mouse Moloney leukemia cells. Specificity and distribution according to genotype. *European Journal of Immunology*, 5(2), 112–117. <https://doi.org/10.1002/eji.1830050208>
- Knörck, A., Marx, S., Friedmann, K. S., Zöphel, S., Lieblang, L., Hässig, C., Müller, I., Pilch, J., Sester, U., Hoth, M., Eichler, H., Sester, M., & Schwarz, E. C. (2018). Quantity, quality, and functionality of peripheral blood cells derived from residual blood of different apheresis kits. *Transfusion*, 58(6), 1516–1526. <https://doi.org/10.1111/trf.14616>
- Kong, J. C., Sa’ad, M. A., Vijayan, H. M., Ravichandran, M., Balakrishnan, V., Tham, S. K., & Tye, G. J. (2024). Chimeric antigen receptor-natural killer cell therapy: Current advancements and strategies to overcome challenges. *Frontiers in Immunology*, 15. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2024.1384039>
- Krzewski, K., & Strominger, J. L. (2008). The killer’s kiss: The many functions of NK cell immunological synapses. *Current Opinion in Cell Biology*, 20(5), 597–605. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2008.05.006>

- Lane, R., Ghazi, S. O., & Whalen, M. M. (2009). Increases in Cytosolic Calcium Ion Levels in Human Natural Killer Cells in Response to Butyltin Exposure. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 57(4), 816–825. <https://doi.org/10.1007/s00244-009-9313-z>
- Lanier, L. L. (2005). NK cell recognition. *Annual Review of Immunology*, 23, 225–274. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.23.021704.115526>
- Lanier, L. L. (2008). Up on the tightrope: Natural killer cell activation and inhibition. *Nature immunology*, 9(5), 495–502. <https://doi.org/10.1038/ni1581>
- Li, G., Liu, T., Nie, J., Guo, L., Chen, J., Zhu, J., Xia, W., Mara, A., Holley, S., & Wong, S. T. C. (2008). Segmentation of touching cell nuclei using gradient flow tracking. *Journal of Microscopy*, 231(1), 47–58. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2818.2008.02016.x>
- Li, Y., Yu, M., Yin, J., Yan, H., & Wang, X. (2022). Enhanced Calcium Signal Induces NK Cell Degranulation but Inhibits Its Cytotoxic Activity. *Journal of Immunology*, 208(2), 347–357. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.2001141>
- Liou, J., Kim, M. L., Do Heo, W., Jones, J. T., Myers, J. W., Ferrell, J. E., & Meyer, T. (2005). STIM Is a Ca²⁺ Sensor Essential for Ca²⁺-Store-Depletion-Triggered Ca²⁺ Influx. *Current Biology*, 15(13), 1235–1241. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2005.05.055>
- Litman, G. W., Cannon, J. P., & Dishaw, L. J. (2005). RECONSTRUCTING IMMUNE PHYLOGENY: NEW PERSPECTIVES. *Nature reviews. Immunology*, 5(11), 866–879. <https://doi.org/10.1038/nri1712>
- Liu, E., Marin, D., Banerjee, P., Macapinlac, H. A., Thompson, P., Basar, R., Kerbaux, L. N., Overman, B., Thall, P., Kaplan, M., Nandivada, V., Kaur, I., Cortes, A. N., Cao, K., Daher, M., Hosing, C., Cohen, E. N., Kebriaei, P., Mehta, R., ... Rezvani, K. (2020). Use of CAR-Transduced Natural Killer Cells in CD19-Positive Lymphoid Tumors. *New England Journal of Medicine*, 382(6), 545–553. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1910607>
- Liu, Y., Fang, Y., Chen, X., Wang, Z., Liang, X., Zhang, T., Liu, M., Zhou, N., Lv, J., Tang, K., Xie, J., Gao, Y., Cheng, F., Zhou, Y., Zhang, Z., Hu, Y., Zhang, X., Gao, Q., Zhang, Y., & Huang, B. (2020). Gasdermin E-mediated target cell pyroptosis by CAR T cells triggers cytokine release syndrome. *Science Immunology*, 5(43), eaax7969. <https://doi.org/10.1126/sciimmunol.aax7969>
- Liu, Y., Pan, R., Ouyang, Y., Gu, W., Xiao, T., Yang, H., Tang, L., Wang, H., Xiang, B., & Chen, P. (2024). Pyroptosis in health and disease: Mechanisms, regulation and clinical perspective. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 9(1), 245. <https://doi.org/10.1038/s41392-024-01958-2>
- Liu, Y., Zhang, T., Zhang, H., Li, J., Zhou, N., Fiskesund, R., Chen, J., Lv, J., Ma, J., Zhang, H., Tang, K., Cheng, F., Zhou, Y., Zhang, X., Wang, N., & Huang, B. (2021). Cell Softness Prevents Cytolytic T-cell Killing of Tumor-Repopulating Cells. *Cancer Research*, 81(2), 476–488. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-20-2569>
- Long, E. O. (2007). Ready for Prime Time: NK Cell Priming by Dendritic Cells. *Immunity*, 26(4), 385–387. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2007.04.001>
- Long, E. O., Kim, H. S., Liu, D., Peterson, M. E., & Rajagopalan, S. (2013). Controlling natural killer cell responses: Integration of signals for activation and inhibition. *Annual Review of Immunology*, 31, 227–258. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-020711-075005>
- MacFarlane, A. W., Oesterling, J. F., & Campbell, K. S. (2010). Measuring Intracellular Calcium Signaling in Murine NK Cells by Flow Cytometry. In K. S. Campbell (Hrsg.), *Natural Killer Cell Protocols* (Bd. 612, S. 149–157). Humana Press. https://doi.org/10.1007/978-1-60761-362-6_10

- Maghazachi, A. A. (2010). Role of chemokines in the biology of natural killer cells. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 341, 37–58. https://doi.org/10.1007/82_2010_20
- Mang, S. (2017). *Über Kalziumsignale und Zytotoxizität menschlicher natürlicher Killerzellen: Calcium signaling and cytotoxicity of human natural killer cells* [doctoralThesis, Saarländische Universitäts- und Landesbibliothek]. <https://doi.org/10.22028/D291-27060>
- Marin, D., Li, Y., Basar, R., Rafei, H., Daher, M., Dou, J., Mohanty, V., Dede, M., Nieto, Y., Uprety, N., Acharya, S., Liu, E., Wilson, J., Banerjee, P., Macapinlac, H. A., Ganesh, C., Thall, P. F., Bassett, R., Ammari, M., ... Rezvani, K. (2024). Safety, efficacy and determinants of response of allogeneic CD19-specific CAR-NK cells in CD19+ B cell tumors: A phase 1/2 trial. *Nature Medicine*, 30(3), 772–784. <https://doi.org/10.1038/s41591-023-02785-8>
- Marr, B., Jo, D., Jang, M., & Lee, S.-H. (2025). Cytokines in Focus: IL-2 and IL-15 in NK Adoptive Cell Cancer Immunotherapy. *Immune Network*, 25(2), e17. <https://doi.org/10.4110/in.2025.25.e17>
- Mauel, J., Rudolf, H., Chapuis, B., & Brunner, K. T. (1970). Studies of allograft immunity in mice. II. Mechanism of target cell inactivation in vitro by sensitized lymphocytes. *Immunology*, 18(4), 517–535.
- Maul-Pavicic, A., Chiang, S. C. C., Rensing-Ehl, A., Jessen, B., Fauriat, C., Wood, S. M., Sjöqvist, S., Hufnagel, M., Schulze, I., Bass, T., Schamel, W. W., Fuchs, S., Pircher, H., McCarl, C.-A., Mikoshiba, K., Schwarz, K., Feske, S., Bryceson, Y. T., & Ehl, S. (2011). ORAI1-mediated calcium influx is required for human cytotoxic lymphocyte degranulation and target cell lysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(8), 3324–3329. <https://doi.org/10.1073/pnas.1013285108>
- Ménasché, G., Pastural, E., Feldmann, J., Certain, S., Ersoy, F., Dupuis, S., Wulffraat, N., Bianchi, D., Fischer, A., Le Deist, F., & de Saint Basile, G. (2000). Mutations in RAB27A cause Griscelli syndrome associated with haemophagocytic syndrome. *Nature Genetics*, 25(2), 173–176. <https://doi.org/10.1038/76024>
- Mistry, A. R., & O’Callaghan, C. A. (2007). Regulation of ligands for the activating receptor NKG2D. *Immunology*, 121(4), 439–447. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2007.02652.x>
- Miyawaki, A., Llopis, J., Heim, R., McCaffery, J. M., Adams, J. A., Ikura, M., & Tsien, R. Y. (1997). Fluorescent indicators for Ca²⁺ based on green fluorescent proteins and calmodulin. *Nature*, 388(6645), 882–887. <https://doi.org/10.1038/42264>
- Moccia, F., Zuccolo, E., Poletto, V., Turin, I., Guerra, G., Pedrazzoli, P., Rosti, V., Porta, C., & Montagna, D. (2016). Targeting Stim and Orai Proteins as an Alternative Approach in Anticancer Therapy. *Current Medicinal Chemistry*, 23(30), 3450–3480. <https://doi.org/10.2174/0929867323666160607111220>
- Morcillo-Martín-Romo, P., Valverde-Pozo, J., Ortiz-Bueno, M., Arnone, M., Espinar-Barranco, L., Espinar-Barranco, C., & García-Rubiño, M. E. (2025). The Role of NK Cells in Cancer Immunotherapy: Mechanisms, Evasion Strategies, and Therapeutic Advances. *Biomedicines*, 13(4), 857. <https://doi.org/10.3390/biomedicines13040857>
- Morris, E. C., Neelapu, S. S., Giavridis, T., & Sadelain, M. (2022). Cytokine release syndrome and associated neurotoxicity in cancer immunotherapy. *Nature Reviews. Immunology*, 22(2), 85–96. <https://doi.org/10.1038/s41577-021-00547-6>
- Müller, F. E., Cherkas, V., Stopper, G., Caudal, L. C., Stopper, L., Kirchhoff, F., Henneberger, C., Ponimaskin, E. G., & Zeug, A. (2021). Elucidating regulators of astrocytic Ca²⁺ signaling via multi-threshold event detection (MTED). *Glia*, 69(12), 2798–2811. <https://doi.org/10.1002/glia.24070>

- Murphy, K. M., & Weaver, C. (with Janeway, C. A., Mowat, A., Berg, L. J., Chaplin, D. D., Travers, P., & Walport, M.). (2017). *Janeway's immunobiology* (9th edition). GS, Garland Science, Taylor & Francis Group.
- Netter, P., Anft, M., & Watzl, C. (2017). Termination of the Activating NK Cell Immunological Synapse Is an Active and Regulated Process. *Journal of Immunology*, 199(7), 2528–2535. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1700394>
- Newton, K., Strasser, A., Kayagaki, N., & Dixit, V. M. (2024). Cell death. *Cell*, 187(2), 235–256. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2023.11.044>
- Nguyen, T., Johnston, S., Clarke, L., Smith, P., Staines, D., & Marshall-Gradisnik, S. (2017). Impaired calcium mobilization in natural killer cells from chronic fatigue syndrome/myalgic encephalomyelitis patients is associated with transient receptor potential melastatin 3 ion channels. *Clinical and Experimental Immunology*, 187(2), 284–293. <https://doi.org/10.1111/cei.12882>
- Nguyen, T., Staines, D., Nilius, B., Smith, P., & Marshall-Gradisnik, S. (2016). Novel identification and characterisation of Transient receptor potential melastatin 3 ion channels on Natural Killer cells and B lymphocytes: Effects on cell signalling in Chronic fatigue syndrome/Myalgic encephalomyelitis patients. *Biological Research*, 49(1), 27. <https://doi.org/10.1186/s40659-016-0087-2>
- Olivas-Aguirre, M., Cruz-Aguilar, L. H., Pottosin, I., & Dobrovinskaya, O. (2023). Reduction of Ca²⁺ Entry by a Specific Block of KCa3.1 Channels Optimizes Cytotoxic Activity of NK Cells against T-ALL Jurkat Cells. *Cells*, 12(16), 2065. <https://doi.org/10.3390/cells12162065>
- Osińska, I., Popko, K., & Demkow, U. (2014). Perforin: An important player in immune response. *Central-European Journal of Immunology*, 39(1), 109–115. <https://doi.org/10.5114/ceji.2014.42135>
- Perera Molligoda Arachchige, A. S. (2021). Human NK cells: From development to effector functions. *Innate Immunity*, 27(3), 212–229. <https://doi.org/10.1177/17534259211001512>
- Prager, I., & Watzl, C. (2019). Mechanisms of natural killer cell-mediated cellular cytotoxicity. *Journal of Leukocyte Biology*, 105(6), 1319–1329. <https://doi.org/10.1002/JLB.MR0718-269R>
- Prakriya, M., Feske, S., Gwack, Y., Srikanth, S., Rao, A., & Hogan, P. G. (2006). Orai1 is an essential pore subunit of the CRAC channel. *Nature*, 443(7108), 230–233. <https://doi.org/10.1038/nature05122>
- Prakriya, M., & Lewis, R. S. (2015). Store-Operated Calcium Channels. *Physiological Reviews*, 95(4), 1383–1436. <https://doi.org/10.1152/physrev.00020.2014>
- Qu, B., Pattu, V., Junker, C., Schwarz, E. C., Bhat, S. S., Kummerow, C., Marshall, M., Matti, U., Neumann, F., Pfreundschuh, M., Becherer, U., Rieger, H., Rettig, J., & Hoth, M. (2011). Docking of lytic granules at the immunological synapse in human CTL requires Vti1b-dependent pairing with CD3 endosomes. *Journal of Immunology*, 186(12), 6894–6904. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1003471>
- Quintana, A., & Hoth, M. (2004). Apparent cytosolic calcium gradients in T-lymphocytes due to fura-2 accumulation in mitochondria. *Cell Calcium*, 36(2), 99–109. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2004.01.003>
- Quintana, A., Pasche, M., Junker, C., Al-Ansary, D., Rieger, H., Kummerow, C., Nuñez, L., Villalobos, C., Meraner, P., Becherer, U., Rettig, J., Niemeyer, B. A., & Hoth, M. (2011). Calcium microdomains at the immunological synapse: How ORAI channels, mitochondria and calcium pumps generate local calcium signals for efficient T-cell activation. *The EMBO Journal*, 30(19), 3895–3912. <https://doi.org/10.1038/emboj.2011.289>

- Rebuffet, L., Melsen, J. E., Escalière, B., Basurto-Lozada, D., Bhandardola, A., Björkström, N. K., Bryceson, Y. T., Castriconi, R., Cichocki, F., Colonna, M., Davis, D. M., Diefenbach, A., Ding, Y., Haniffa, M., Horowitz, A., Lanier, L. L., Malmberg, K.-J., Miller, J. S., Moretta, L., ... Vivier, E. (2024). High-dimensional single-cell analysis of human natural killer cell heterogeneity. *Nature Immunology*, 25(8), 1474–1488. <https://doi.org/10.1038/s41590-024-01883-0>
- Robinson, P., Sparrow, A. J., Psaras, Y., Steeples, V., Simon, J. N., Broyles, C. N., Chang, Y.-F., Brook, F. A., Wang, Y.-J., Blease, A., Zhang, X., Abassi, Y. A., Geeves, M. A., Toepfer, C. N., Watkins, H., Redwood, C., & Daniels, M. J. (2023). Comparing the effects of chemical Ca²⁺ dyes and R-GECO on contractility and Ca²⁺ transients in adult and human iPSC cardiomyocytes. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 180, 44–57. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2023.04.008>
- Rudd-Schmidt, J. A., Hodel, A. W., Noori, T., Lopez, J. A., Cho, H.-J., Verschoor, S., Ciccone, A., Trapani, J. A., Hoogenboom, B. W., & Voskoboinik, I. (2019). Lipid order and charge protect killer T cells from accidental death. *Nature Communications*, 10(1), 5396. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-13385-x>
- Sadelain, M., Brentjens, R., & Rivière, I. (2013). The basic principles of chimeric antigen receptor design. *Cancer Discovery*, 3(4), 388–398. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-12-0548>
- Schirmmann, T., & Pecher, G. (2002). Human natural killer cell line modified with a chimeric immunoglobulin T-cell receptor gene leads to tumor growth inhibition in vivo. *Cancer Gene Therapy*, 9(4), 390–398. <https://doi.org/10.1038/sj.cgt.7700453>
- Schuster, I. S., Andoniou, C. E., & Degli-Esposti, M. A. (2024). Tissue Resident Memory NK cells: Homing in on local effectors and regulators. *Immunological reviews*, 323(1), 54–60. <https://doi.org/10.1111/imr.13332>
- Schwarz, A., Tutsch, E., Ludwig, B., Schwarz, E. C., Stallmach, A., & Hoth, M. (2004). Ca²⁺ signaling in identified T-lymphocytes from human intestinal mucosa. Relation to hyporeactivity, proliferation, and inflammatory bowel disease. *The Journal of Biological Chemistry*, 279(7), 5641–5647. <https://doi.org/10.1074/jbc.M309317200>
- Schwarz, E. C., Qu, B., & Hoth, M. (2013). Calcium, cancer and killing: The role of calcium in killing cancer cells by cytotoxic T lymphocytes and natural killer cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 12th European Symposium on Calcium, 1833(7), 1603–1611. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2012.11.016>
- Sender, R., Weiss, Y., Navon, Y., Milo, I., Azulay, N., Keren, L., Fuchs, S., Ben-Zvi, D., Noor, E., & Milo, R. (2023). The total mass, number, and distribution of immune cells in the human body. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 120(44), e2308511120. <https://doi.org/10.1073/pnas.2308511120>
- Shenoy, A. M., Sidner, R. A., & Brahmi, Z. (1993). Signal Transduction in Cytotoxic Lymphocytes: Decreased Calcium Influx in NK Cell Inactivated with Sensitive Target Cells. *Cellular Immunology*, (147), 294–301.
- Silva-Rojas, R., Laporte, J., & Böhm, J. (2020). STIM1/ORAI1 Loss-of-Function and Gain-of-Function Mutations Inversely Impact on SOCE and Calcium Homeostasis and Cause Multi-Systemic Mirror Diseases. *Frontiers in Physiology*, 11, 604941. <https://doi.org/10.3389/fphys.2020.604941>
- Sinha, N. K., McKenney, C., Yeow, Z. Y., Li, J. J., Nam, K. H., Yaron-Barir, T. M., Johnson, J. L., Huntsman, E. M., Cantley, L. C., Ordureau, A., Regot, S., & Green, R. (2024). The ribotoxic stress response drives UV-mediated cell death. *Cell*, 187(14), 3652–3670.e40. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2024.05.018>
- Smyth, M. J., Cretney, E., Kelly, J. M., Westwood, J. A., Street, S. E. A., Yagita, H., Takeda, K., van Dommelen, S. L. H., Degli-Esposti, M. A., & Hayakawa, Y. (2005). Activation of

- NK cell cytotoxicity. *Molecular Immunology*, 42(4), 501–510. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2004.07.034>
- Stephanou, A., Mantri, M., Shankaranarayanan, D., Li, C., Lagman, M., Xiang, J., Pan, C., Sun, Y., Muthukumar, T., Machaca, K., De Vlaminc, I., & Suthanthiran, M. (2026). Single-cell transcriptomics reveals targeted modulation of inflammatory repertoire by SOCE blockers. *Human Immunology*, 87(4), 111687. <https://doi.org/10.1016/j.humimm.2026.111687>
- Stinchcombe, J. C., & Griffiths, G. M. (2014). Communication, the centrosome and the immunological synapse. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 369(1650), 20130463. <https://doi.org/10.1098/rstb.2013.0463>
- Stinchcombe, J. C., Majorovits, E., Bossi, G., Fuller, S., & Griffiths, G. M. (2006). Centrosome polarization delivers secretory granules to the immunological synapse. *Nature*, 443(7110), 462–465. <https://doi.org/10.1038/nature05071>
- Stringer, C., Wang, T., Michaelos, M., & Pachitariu, M. (2021). Cellpose: A generalist algorithm for cellular segmentation. *Nature Methods*, 18(1), 100–106. <https://doi.org/10.1038/s41592-020-01018-x>
- Takahashi, A., Camacho, P., Lechleiter, J. D., & Herman, B. (1999). Measurement of Intracellular Calcium. *Physiological Reviews*, 79(4), 1089–1125. <https://doi.org/10.1152/physrev.1999.79.4.1089>
- Takeuchi, K., Sato, S. I., Abe, K., Kimura, M., Abe, T. A., Yoshinaga, K., & Inaba, H. (1989). Intracellular compartmentalization of fura-2 dye demonstrated by laser-excitation fluorescence microscopy: A problem in measuring cytosolic free calcium concentration using fura-2 fluorescence in vascular smooth muscle cells. *The Tohoku Journal of Experimental Medicine*, 159(1), 23–35. <https://doi.org/10.1620/tjem.159.23>
- Thestrup, T., Litzlbauer, J., Bartholomäus, I., Mues, M., Russo, L., Dana, H., Kovalchuk, Y., Liang, Y., Kalamakis, G., Laukat, Y., Becker, S., Witte, G., Geiger, A., Allen, T., Rome, L. C., Chen, T.-W., Kim, D. S., Garaschuk, O., Griesinger, C., & Griesbeck, O. (2014). Optimized ratiometric calcium sensors for functional in vivo imaging of neurons and T lymphocytes. *Nature Methods*, 11(2), 175–182. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2773>
- Thiery, J., Keefe, D., Saffarian, S., Martinvalet, D., Walch, M., Boucrot, E., Kirchhausen, T., & Lieberman, J. (2010). Perforin activates clathrin- and dynamin-dependent endocytosis, which is required for plasma membrane repair and delivery of granzyme B for granzyme-mediated apoptosis. *Blood*, 115(8), 1582–1593. <https://doi.org/10.1182/blood-2009-10-246116>
- Tkach, K. E., Barik, D., Voisinne, G., Malandro, N., Hathorn, M. M., Cotari, J. W., Vogel, R., Merghoub, T., Wolchok, J., Krichevsky, O., & Altan-Bonnet, G. (2014). T cells translate individual, quantal activation into collective, analog cytokine responses via time-integrated feedbacks. *eLife*, 3, e01944. <https://doi.org/10.7554/eLife.01944>
- Trebak, M., & Kinet, J.-P. (2019). Calcium signalling in T cells. *Nature Reviews Immunology*, 19(3), 154–169. <https://doi.org/10.1038/s41577-018-0110-7>
- Tsien, R. Y. (1981). A non-disruptive technique for loading calcium buffers and indicators into cells. *Nature*, 290(5806), 527–528. <https://doi.org/10.1038/290527a0>
- Tuomela, K., Ambrose, A. R., & Davis, D. M. (2022). Escaping Death: How Cancer Cells and Infected Cells Resist Cell-Mediated Cytotoxicity. *Frontiers in Immunology*, 13, 867098. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.867098>
- Uherek, C., Tonn, T., Uherek, B., Becker, S., Schnierle, B., Klingemann, H.-G., & Wels, W. (2002). Retargeting of natural killer-cell cytolytic activity to ErbB2-expressing cancer cells results in efficient and selective tumor cell destruction. *Blood*, 100(4), 1265–1273.
- Vaja, S., Khandelwal, S., Vora, C., Khan, A. A., Wajeed, S., Hassan Sk, M., & Baig, M. S. (2026). CAR-T/NK/M-based combination therapies in cancer: A comprehensive review.

- Current Problems in Cancer*, 61, 101269.
<https://doi.org/10.1016/j.currprobcancer.2026.101269>
- Van Graft, M., Kraan, Y. M., Segers, I. M. J., Radošević, K., De Grooth, B. G., & Greve, J. (1993). Flow cytometric measurement of [Ca²⁺]_i and pHi in conjugated natural killer cells and K562 target cells during the cytotoxic process. *Cytometry*, 14(3), 257–264. <https://doi.org/10.1002/cyto.990140304>
- Vanherberghen, B., Olofsson, P. E., Forslund, E., Sternberg-Simon, M., Khorshidi, M. A., Pacouret, S., Guldevall, K., Enqvist, M., Malmberg, K.-J., Mehr, R., & Önfelt, B. (2013). Classification of human natural killer cells based on migration behavior and cytotoxic response. *Blood*, 121(8), 1326–1334. <https://doi.org/10.1182/blood-2012-06-439851>
- Vivier, E., Raulet, D. H., Moretta, A., Caligiuri, M. A., Zitvogel, L., Lanier, L. L., Yokoyama, W. M., & Ugolini, S. (2011). Innate or Adaptive Immunity? The Example of Natural Killer Cells. *Science (New York, N.Y.)*, 331(6013), 44–49. <https://doi.org/10.1126/science.1198687>
- Vivier, E., Rebuffet, L., Narni-Mancinelli, E., Cornen, S., Igarashi, R. Y., & Fantin, V. R. (2024). Natural killer cell therapies. *Nature*, 626(8000), 727–736. <https://doi.org/10.1038/s41586-023-06945-1>
- Vivier, E., Tomasello, E., Baratin, M., Walzer, T., & Ugolini, S. (2008). Functions of natural killer cells. *Nature Immunology*, 9(5), 503–510. <https://doi.org/10.1038/ni1582>
- Voskoboinik, I., & Trapani, J. A. (2006). Addressing the mysteries of perforin function. *Immunology and Cell Biology*, 84(1), 66–71. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1711.2005.01409.x>
- Voskoboinik, I., Whisstock, J. C., & Trapani, J. A. (2015). Perforin and granzymes: Function, dysfunction and human pathology. *Nature Reviews. Immunology*, 15(6), 388–400. <https://doi.org/10.1038/nri3839>
- Wakasugi, R., Suzuki, K., & Kaneko-Kawano, T. (2024). Molecular Mechanisms Regulating Vascular Endothelial Permeability. *International Journal of Molecular Sciences*, 25(12), 6415. <https://doi.org/10.3390/ijms25126415>
- Walzer, T., Chiossone, L., Chaix, J., Calver, A., Carozzo, C., Garrigue-Antar, L., Jacques, Y., Baratin, M., Tomasello, E., & Vivier, E. (2007). Natural killer cell trafficking in vivo requires a dedicated sphingosine 1-phosphate receptor. *Nature Immunology*, 8(12), 1337–1344. <https://doi.org/10.1038/ni1523>
- Walzer, T., Jaeger, S., Chaix, J., & Vivier, E. (2007). Natural killer cells: From CD3–NKp46+ to post-genomics meta-analyses. *Current Opinion in Immunology, Lymphocyte activation/Lymphocyte effector functions*, 19(3), 365–372. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2007.04.004>
- Watzl, C., & Long, E. O. (2010). Signal transduction during activation and inhibition of natural killer cells. *Current Protocols in Immunology, Chapter 11, Unit 11.9B*. <https://doi.org/10.1002/0471142735.im1109bs90>
- Wu, N., Nishioka, W. K., Derecki, N. C., & Maher, M. P. (2019). High-throughput-compatible assays using a genetically-encoded calcium indicator. *Scientific Reports*, 9(1), 12692. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-49070-8>
- Wu, Z., Park, S., Lau, C. M., Zhong, Y., Sheppard, S., Sun, J. C., Das, J., Altan-Bonnet, G., & Hsu, K. C. (2021). Dynamic variability in SHP-1 abundance determines natural killer cell responsiveness. *Science signaling*, 14(708), eabe5380. <https://doi.org/10.1126/scisignal.abe5380>
- Yanamandra, A. K., Zhang, J., Montalvo, G., Zhou, X., Biedenweg, D., Zhao, R., Sharma, S., Hoth, M., Lautenschläger, F., Otto, O., Del Campo, A., & Qu, B. (2024). PIEZO1-mediated mechanosensing governs NK-cell killing efficiency and infiltration in three-

- dimensional matrices. *European Journal of Immunology*, 54(3), e2350693. <https://doi.org/10.1002/eji.202350693>
- Yatim, K. M., & Lakkis, F. G. (2015). A Brief Journey through the Immune System. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology: CJASN*, 10(7), 1274–1281. <https://doi.org/10.2215/CJN.10031014>
- Yoshida, I., Monji, A., Tashiro, K., Nakamura, K., Inoue, R., & Kanba, S. (2006). Depletion of intracellular Ca²⁺ store itself may be a major factor in thapsigargin-induced ER stress and apoptosis in PC12 cells. *Neurochemistry International*, 48(8), 696–702. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2005.12.012>
- Zheng, S., Wang, X., Zhao, D., Liu, H., & Hu, Y. (2023). Calcium homeostasis and cancer: Insights from endoplasmic reticulum-centered organelle communications. *Trends in Cell Biology*, 33(4), 312–323. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2022.07.004>
- Zhou, X., Belavek, K. J., Navarro, M. X., Martinez, K. N., Hinojosa, A., & Miller, E. W. (2025). Ratio-based indicators for cytosolic Ca²⁺ with visible light excitation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 122(7), e2410436122. <https://doi.org/10.1073/pnas.2410436122>
- Zhou, X., Friedmann, K. S., Lyrmann, H., Zhou, Y., Schoppmeyer, R., Knörck, A., Mang, S., Hoxha, C., Angenendt, A., Backes, C. S., Mangerich, C., Zhao, R., Cappello, S., Schwär, G., Hässig, C., Neef, M., Bufe, B., Zufall, F., Kruse, K., ... Hoth, M. (2018). A calcium optimum for cytotoxic T lymphocyte and natural killer cell cytotoxicity. *The Journal of Physiology*, 596(14), 2681–2698. <https://doi.org/10.1113/JP274964>
- Zhu, Y., Huang, B., & Shi, J. (2016). Fas ligand and lytic granule differentially control cytotoxic dynamics of natural killer cell against cancer target. *Oncotarget*, 7(30), 47163–47172. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.9980>
- Zhu, Y., Xie, J., & Shi, J. (2021). Rac1/ROCK-driven membrane dynamics promote natural killer cell cytotoxicity via granzyme-induced necroptosis. *BMC Biology*, 19, 140. <https://doi.org/10.1186/s12915-021-01068-3>
- Zöphel, D., Angenendt, A., Kaschek, L., Ravichandran, K., Hof, C., Janku, S., Hoth, M., & Lis, A. (2022). Faster cytotoxicity with age: Increased perforin and granzyme levels in cytotoxic CD8 + T cells boost cancer cell elimination. *Aging Cell*, 21(8), e13668. <https://doi.org/10.1111/accel.13668>
- Zöphel, D., Kaschek, L., Steiner, R., Janku, S., Chang, H.-F., & Lis, A. (2023). Heterozygous OT-I mice reveal that antigen-specific CD8⁺ T cells shift from apoptotic to necrotic killers in the elderly. *Aging Cell*, 22(6), e13824. <https://doi.org/10.1111/accel.13824>
- Zöphel, S., Küchler, N., Jansky, J., Hoxha, C., Schäfer, G., Weise, J. J., Vialle, J., Kaschek, L., Stopper, G., Eichler, H., Yildiz, D., Moter, A., Wendel, P., Ullrich, E., Schormann, C., Rixecker, T., Cetin, O., Neumann, F., Orth, P., ... Schwarz, E. C. (2024). CD16⁺ as predictive marker for early relapse in aggressive B-NHL/DLBCL patients. *Molecular Cancer*, 23, 210. <https://doi.org/10.1186/s12943-024-02123-7>
- Zweifach, A. (2000). Target-Cell Contact Activates a Highly Selective Capacitative Calcium Entry Pathway in Cytotoxic T Lymphocytes. *The Journal of Cell Biology*, 148(3), 603–614. <https://doi.org/10.1083/jcb.148.3.603>

6 Anhang

6.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung der Ca^{2+} -abhängigen Aktivierung und Zytotoxizität von NK-Zellen.....	11
Abbildung 2: Funktionsweise des pCasper-Konstrukts.....	27
Abbildung 3: Anregungs- und Emissionsspektren der getesteten Fura-Indikatoren	44
Abbildung 4: Ca^{2+} -Imaging von Fura-gefärbten NK-Zellen im Cell Observer unter Verwendung einer Perfusionskammer.....	46
Abbildung 5: Messung von Fura-Ratios in gefärbten NK-Zellen im Cell-Observer	48
Abbildung 6: Dynamischer Bereich der Fura-Farbstoffe in Abhängigkeit von der Belichtungszeit	50
Abbildung 7: Einfluss der Belichtungszeit auf den dynamischen Bereich und die Signalqualität der Fura-Farbstoffe	51
Abbildung 8: Vergleich unterschiedlicher Methoden zur Berechnung des Fura-Ratios und des dynamischen Bereichs.....	53
Abbildung 9: Eignung der Fura-Indikatoren für Langzeitmessungen und Einfluss auf die Zytotoxizität von NK-Zellen.....	54
Abbildung 10: Zusammenfassende Bewertung der getesteten Fura-Farbstoffe.....	57
Abbildung 11: Kombinierte Messung von intrazellulärem Ca^{2+} in NK-Zellen und Zielzellsterben mittels pCasper im Celldiscoverer 7	58
Abbildung 12: Untersuchung der Autofluoreszenz der Fura-Kanäle.....	59
Abbildung 13: Automatisierte Analyse von NK-Zell-Zielzell-Interaktionen und Ca^{2+} -Signalen mit MSparkles	61
Abbildung 14 Vergleich der automatisierten Ca^{2+} -Analyse mit MSparkles und manueller Auswertung.....	62
Abbildung 15: Klassifikation von NK-Zell-vermittelten Zelltodphänotypen anhand des pCasper-Reporters	64
Abbildung 16: Ca^{2+} -Signale von NK-Zellen während unterschiedlicher Interaktionen mit K562-Zielzellen.....	65
Abbildung 17: Definition der analysierten Parameter der Ca^{2+} -Signale einzelner NK-Zellen.....	67

Kapitel 6 Anhang

Abbildung 18: Einzelzellanalyse der Ca^{2+} -Signale von NK-Zellen während der Interaktion mit K562-Zellen.....	69
Abbildung 19: Zusammenhang zwischen Dauer des Zielzellsterbens (Killzeit) und Ca^{2+} -Signalabklingzeit.	70
Abbildung 20: Analyse der Ca^{2+} -Peak-Amplituden gegen K562 getrennt nach NK-Zellspendern.....	71
Abbildung 21: Auswirkung von CMA auf Zytotoxizität und Ca^{2+} -Signal der NK-Zellen gegen K562	72
Abbildung 22: Ca^{2+} -Signale von CMA-behandelten NK-Zellen während der Interaktion mit K562-Zielzellen	74
Abbildung 23: Analyse der Ca^{2+} -Peaks von CMA-behandelten NK-Zellen gegen K562 getrennt nach NK-Zellspendern.....	75
Abbildung 24: Zytotoxizität und Ca^{2+} -Signale von NK-Zellen gegen TMD8-Zielzellen mit und ohne Rituximab.....	76
Abbildung 25: Einzelzellanalyse der Ca^{2+} -Signale von NK-Zellen gegen TMD8-Zielzellen mit und ohne Rituximab.....	78
Abbildung 26: Zusammenhang zwischen Dauer des Zielzellsterbens (Killzeit) und Ca^{2+} -Signalabklingzeit bei TMD8-Zellen.....	79
Abbildung 27: Analyse der Ca^{2+} -Peak-Amplituden gegen TMD8 getrennt nach NK-Zellspendern.....	80
Abbildung 28: Zytotoxizität von CAR NK und NT NK-Zellen gegen NALM-6 und K562.....	82
Abbildung 29: Einzelzell- und Übersichtsaufnahmen der Interaktion von CAR NK- und NT NK-Zellen mit NALM-6 sowie K562 Zellen.....	83
Abbildung 30: Analyse der Zielzelltode von NALM-6 und K562 auf Populationsebene	85
Abbildung 31: Einzelzellanalyse des Zytotoxizitätsverhaltens von CAR und NT NK-Zellen gegen NALM-6.....	86
Abbildung 32: Schicksalsräder für CAR und NT NK-Zellen gegen NALM-6	88
Abbildung 33: Ca^{2+} -Messung in CAR NK-Zellen während der Interaktion mit NALM-6	89
Abbildung 34: Einzelzellanalyse der Ca^{2+} -Signale von CAR und NT NK-Zellen während der Interaktion mit NALM-6.....	91
Abbildung 35: Einzelzellanalyse der Ca^{2+} -Signale von CAR und NT NK-Zellen während der Interaktion mit K562	93
Abbildung 36: Analyse der Ca^{2+} -Peak-Amplituden gegen NALM-6 und K562 getrennt nach NK-Spendern	94

Kapitel 6 Anhang

Abbildung 37: Auswahl von Fura-10 und Etablierung des kombinierten Fura-10/pCasper-Messsystems.	99
Abbildung 38: Zusammenfassung der Ca^{2+} -Signalparameter primärer NK-Zellen unter verschiedenen Aktivierungsbedingungen.	102
Abbildung 39: Ein Modell der Ca^{2+} -abhängigen NK-Zell-Zytotoxizität.....	106
Abbildung 40: Tabelle mit Ca^{2+} -Signalen in CAR und NT NK-Zellen	116

6.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Geräte und Instrumente	20
Tabelle 2: Material zur Zellgenerierung und Zellkultivierung.....	20
Tabelle 3: Calciumfarbstoffe und Fluoreszenzfarbstoffe.....	21
Tabelle 4: Antikörper und FACS-Färbungen.....	21
Tabelle 5: Chemikalien und Inhibitoren	21
Tabelle 6: Platten und Verbrauchsmaterialien	22
Tabelle 7: pCasper Zielzellen	26
Tabelle 8: Messung von Anregungs- und Emissionsspektrum im Plattenlesegerät.....	30
Tabelle 9: Anregungs- und Emissionseinstellungen für Ca^{2+} Imaging im Cell Observer	33
Tabelle 10: Anregungs- und Emissionsparameter für Phototoxizitätsassays	35
Tabelle 11: Anregungs- und Emissionsspektren am Celldiscoverer 7	38
Tabelle 12: Verwendete Anregungs- und Emissionswellenlängen im Cell Observer für die getesteten Fura-Indikatoren.....	45
Tabelle 13: Bestimmung geeigneter Belichtungszeiten für die Phototoxizitätsanalyse der Fura-Indikatoren	55

6.3 Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Ausgeschriebene Form / Bedeutung
2B4	CD244
7-AAD	7-Aminoactinomycin D
ADCC	antikörperabhängige zellvermittelte Zytotoxizität
AIM-V	AIM V Medium (serumfreies Zellkulturmedium; Produktname)
AM	Acetoxymethylester
ANOVA	analysis of variance / Varianzanalyse
APC	Allophycocyanin
ATCC	American Type Culture Collection
BAPTA	1,2-Bis(o-aminophenoxy)ethane-N,N,N',N'-tetraacetic acid
BSA	bovines Serumalbumin
BV421	Brilliant Violet 421
CAR	chimärer Antigenrezeptor
CAR NK-Zelle	CAR-modifizierte natürliche Killerzelle
CAR T-Zelle	CAR-modifizierte T-Zelle
Ca ²⁺	Calciumion(en)
CD	cluster of differentiation
CMA	Concanamycin A
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CRAC	calcium release-activated calcium channel
CRS	Cytokine Release Syndrome
CTL	zytotoxische T-Lymphozyten
DAG	Diacylglycerol
DLBCL	diffus großzelliges B-Zell-Lymphom
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNAM-1	DNAX accessory molecule 1
DPBS	Dulbecco's phosphate-buffered saline
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
E:T	Effektor-zu-Zielzell-Verhältnis
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglycol-bis(β-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
EMCCD	electron multiplying charge-coupled device
ER	endoplasmatisches Retikulum
FACS	fluorescence-activated cell sorting / Durchflusszytometrie
FBS	fetales Kälberserum
FcγRIII	Fc-Gamma-Rezeptor III
FHL	familiäre hämophagozytische Lymphohistiozytose
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FRET	Förster-Resonanzenergietransfer

Kapitel 6 Anhang

FSC-A	forward scatter area
FSC-H	forward scatter height
G418	Geneticin G418
GECI	genetisch kodierter Calciumindikator
GFP	green fluorescent protein
GM-CSF	granulocyte-macrophage colony-stimulating factor
HBSS	Hank's balanced salt solution
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonsäure
HLA	humanes Leukozytenantigen
HLH	hämophagozytische Lymphohistiozytose
HSV	Hue-Saturation-Value
IFN- γ	Interferon gamma
IgG	Immunglobulin G
IL	Interleukin
ILC	innate lymphoid cell / angeborene lymphatische Zelle
IP ₃	Inositol-1,4,5-trisphosphat
IP ₃ R	Inositol-1,4,5-trisphosphat-Rezeptor
ITAM	immunoreceptor tyrosine-based activation motif
ITIM	immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif
KIR	killer-cell immunoglobulin-like receptor
LAMP1	lysosome-associated membrane protein 1
LFA-1	lymphocyte function-associated antigen 1
LRS	leukocyte reduction system
Luc2	Luciferase 2
MCU	mitochondrial calcium uniporter
MHC-I	major histocompatibility complex class I
MICA/B	MHC class I chain-related protein A/B
MIP-1 α/β	macrophage inflammatory protein 1 alpha/beta
MLKL	mixed lineage kinase domain-like protein
MTOC	Mikrotubuli-organisierendes Zentrum
NCLX	Na ⁺ /Ca ²⁺ /Li ⁺ exchanger / mitochondrialer Na ⁺ /Ca ²⁺ -Austauscher
NCR	natürlicher Zytotoxizitätsrezeptor
NFAT	nuclear factor of activated T cells
NK	natürliche Killerzelle
NKG2A	natural killer group 2A
NP-EGTA	o-Nitrophenyl-EGTA (photolabiler Calcium-Chelator)
NT	nicht-transduziert
ORAI	ORAI-Calciumkanal / pore-forming subunit of CRAC channel
PBMC	periphere mononukleäre Blutzelle
PE-Cy7	Phycoerythrin-Cyanin 7
PerCP	Peridinin-Chlorophyll-Protein-Komplex
PI	Propidiumiodid
PIP ₂	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PLC γ	Phospholipase C gamma

Kapitel 6 Anhang

PMCA	Plasmamembran- Ca^{2+} -ATPase
PRF1	Perforin 1
REA746	Recombinant engineered antibody 746 (Klonbezeichnung)
RFP	red fluorescent protein
RNA	Ribonukleinsäure
ROI	region of interest
RPMI	Roswell Park Memorial Institute Medium 1640
RTX	Rituximab
SCC	Segelclub Cuxhaven
scFv	single-chain variable fragment
SD	Standardabweichung
SEM	Standardfehler
SERCA	sarco/endoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase
SHP-1	Src homology region 2 domain-containing phosphatase-1
SNAP23	synaptosome-associated protein 23
SNARE	soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor
SOCE	store-operated calcium entry
SSC-A	side scatter area
STIM	stromal interaction molecule
SYK	spleen tyrosine kinase
tEGFR	trunkierter epidermaler Wachstumsfaktorrezeptor
TG	Thapsigargin
TGF- β	transforming growth factor beta
TNF- α	Tumornekrosefaktor alpha
TRAIL	TNF-related apoptosis-inducing ligand
TRP	transient receptor potential
UV	ultraviolett
V-ATPase	vakuoläre H^{+} -ATPase
VAMP	vesicle-associated membrane protein
ZAP-70	zeta-chain-associated protein kinase 70

Abkürzung/Symbol	Bedeutung
pH	<i>potentia hydrogenii</i> ; Maß für Säuregrad einer Lösung
nm	Nanometer
μm	Mikrometer
mm	Millimeter
μl	Mikroliter
ml	Milliliter
s	Sekunde
min	Minute
h	Stunde
$^{\circ}\text{C}$	Grad Celsius
%	Prozent

nM	Nanomolar
μ M	Mikromolar
mM	Millimolar
U	Units
x g	Vielfaches der Erdbeschleunigung

6.4 Automatisierte Analyse der Plattenleser-basierten Zytotoxizitätsassays

Geschrieben in MATLAB

%% ReaderAnalysis

%% Version 2: Programmed: October 2023

% Lea Kaschek; AG Hoth

%% 1) Input options

clear;

%%Abfrage Variablen

[fileName1, filePath1]=uigetfile('*.xlsx', 'Please select well plate configuration');

[fileName2, filePath2]=uigetfile('*.xlsx', 'Please select your data file');

digits=1;

%% 2) Recall function

[Data,LysisF,NameKill,NameAll,MVF,IdxF,Overflow,VarError,vF]=ReaderFunction(filePath1,fileName1,filePath2,fileName2);%opens Imarisfkt

%% 3) Output graphs

%Define graph

t=0:10:240;

plot(t,LysisF, '-o','MarkerSize',3)

ylim([-10 100]);

xlim([0 240]);

xlabel('Time [min]');

ylabel('Lysis [%]');

Kapitel 6 Anhang

```
xticklocations = 0:60:240;
xticks(xticklocations);
legend(NameKill,'Location','northwest','NumColumns',2);
%save graph
Speichername=strcat(fileName2, '.fig');
Speichername2=strcat(fileName2, '.svg');
Speichername3=strcat(fileName2, '.png');
saveas(gcf,Speichername);
saveas(gcf,Speichername2);
saveas(gcf,Speichername3);
```

%% 4) Output Excel

%Add time

```
LysisF=[t', LysisF];
LysisF2=round(LysisF,digits);
```

%Calculate maximal killingrate and add

```
maxd= max(diff(LysisF));
LysisF2(28,:)=maxd;
IdxF=[0,IdxF];
LysisF2(29,:)=IdxF;
```

%add condition names

```
LysisC=num2cell(LysisF2);
LysisC{28,1}="Max Lyse";
LysisC{29,1}="Index";
NameKill2=["Time', NameKill];
LysisC=[NameKill2; LysisC];
```

%new matrix with the mean values

```
MVF=[t', MVF];
MVFC=num2cell(MVF);
FinalnameT2=["Time',NameAll','Medium','Triton'];
M=[FinalnameT2; MVFC];
```

%new matrix with errors etc

```
ErrInfo=cell(1,2);
```


Kapitel 6 Anhang

```
ErrInfo{1,1}='Overflow Error Number';
ErrInfo{1,2}=Overflow;
ErrInfo{3,1}='normalized standard deviation between duplicates';
v=[NameAll;vF];
```

%Create Output Excel

```
fileName22 = fileName2(1:end-8);
ExcelName=strcat(fileName22, '_Analysed.xlsx');
writematrix(LysisC, ExcelName, Sheet = 'Main', FileType = "spreadsheet");
writematrix(M, ExcelName, Sheet = 'MeanFluorescence', FileType = "spreadsheet");
writecell(ErrInfo, ExcelName, Range ='A2', Sheet = 'Errors', FileType = "spreadsheet");
writematrix(v, ExcelName,Range = 'A5', Sheet = 'Errors', FileType = "spreadsheet");
```

%% Imarisfkt

%% Version 2: Programmed: December 2023;

```
function
[Data,LysisF,NameKill,NameAll,MVF,IdxF,Overflow,VarError,vF]=ReaderFunction(filePath1,fileName1,filePath2,fileName2)
```

%% 1) Opens Excel and creating matrix (Plate Configuration)

```
opt = spreadsheetImportOptions;

opt.VariableNames = ["Var1","Var2","Var3","Var4","Var5","Var6","Var7","Var8","Var9","Var10","Var11","Var12","Var13","Var14"];

opt = opt.setvartype('char');

Scheme=readtable(fullfile(filePath1, fileName1), opt); %read excel with this options
SchemeCell=table2cell(Scheme); % converts table into cell
```

%% 2) Opens Excel and creating matrix (Raw Values)

```
cd(filePath2); %set this path as current path
Input=readtable( fullfile(filePath2, fileName2) );
Input2=removevars(Input,{'Var1'}); %Input table but without first column with labelings
InputCell=table2array(Input2); % converts table into cell
Data={}; %creates cell with only necessary data
for i=1:1:14
```

Kapitel 6 Anhang

```
j=0;
for letter='A':'H'
    letter=convertCharsToStrings(letter);
    j=j+1;
    T=InputCell([Input.Var1==letter],[InputCell(1,:)==i]);
    Data {j,i}=T;
end
end
```

%% 3) "Understand" Plate configuration

%Find the linear row-index of the letter 'A'

```
% 1) Use cellfun to get logical index of letter 'A' in column Var2
```

```
% 2) convert to linear index with 'find'
```

```
idx = cellfun(@(x) ~isempty(x) && x=='A', Scheme.Var2, "UniformOutput", false);
```

```
idx = find( cell2mat(idx) );
```

%Extract matrix from cell array (fixed width and height, but variable x offset)

```
a = SchemeCell(idx(1):idx(1)+7,3:14);
```

```
b = SchemeCell(idx(2):idx(2)+7,3:14);
```

%Combine cells

```
SchemaData = cellfun(@(x,y) {x,y}, a,b,'UniformOutput',false);
```

% split up in

```
% s1: scheme for Target cells
```

```
% s2: scheme for Killing condition
```

```
% z1: list of Target cells
```

```
s1 = cellfun(@(x) string(x{1}), SchemaData);
```

```
s2 = cellfun(@(x) string(x{2}), SchemaData);
```

```
z1 = unique(s1(:));
```

```
z1 = z1(~ismissing(z1));
```

```
z1(cellfun('isempty',z1)) = [];
```

```
z1(z1=="Medium")=[];
```

```
z1(z1=="Triton")=[];
```

%% 4) Overflow values(==260000)defined as NaN and are counted for Output

Kapitel 6 Anhang

%Overflow: counts overflow events

```
Overflow=0;
for i=1:1:12 %for every collumn
    for j=1:1:8 %in every row
        if Data{j,i}==260000
            Overflow=Overflow+1;
        end
        Data{j,i}(Data{j,i}==260000)=NaN;
    end
end
```

%% 5) Fluorescence of Medium and Medium w. Triton

```
LocationMed=contains(s2,"Medium");
LocationTriton=contains(s2,"Triton");
FVMed=Data(LocationMed==1);
FVMed=cell2mat(FVMed');
FVMed=mean(FVMed,2);
FVTriton=Data(LocationTriton==1);
FVTriton=cell2mat(FVTriton');
FVTriton=mean(FVTriton,2);
```

%% 6) Lysis Calculation

```
VarError=0;
%Counts number of duplicates, with normalized standard deviation over 10%
a2=1; %a2: counter for position in LysisF
IdxF=[]; %empty cell for indices
for a=1:1:length(z1)
    % For every Target-Cellline (a) do...
    CurrTC=z1(a);
    % Name of current Target cell
    LocTC=contains(s1,CurrTC);
    %LocTC: Index (=Location) of current Target cell
    MVX=[];
```

Kapitel 6 Anhang

```
Stdev=[];
Cond=s2(LocTC==1); %creates list of condition names for current target cell
FV=Data(LocTC==1); %Fluorescences
FV=cell2mat(FV); %From Cell to Matrix
%What Killing conditions are there for this target?
CondU = unique(Cond(:));
%build mean fluorescence (duplicates/triplicates/...)
for x=1:1:length(CondU)
%For every Killing condition (x) do...
    CurrX=CondU(x); %CurrX: current condition to look at
    LocX = Cond == CurrX; %LocX: Index (Location) of current condition
    FVX=FV(:,LocX==1); %FVX: Fluorescence values of current condition
    MVX(:,x)=mean(FVX,2); %MVX: Meanvalue of current condition
    MVAll{1,a}=MVX; %save all in a cell
    Stdev(:,x)=std(FVX,0,2); %Stdev: standarddeviation
    v=MVX./Stdev; %v: normalized standard deviation
    v(isinf(v))=0; %if v is infinite, it is transformed to 0
    if v(1,x)>1.1 || v(25,x)>1.1
        VarError=VarError+1; %Counts when normalized standard deviation over 10%
    end
    vAll{1,a}=v; %save all in a cell; final order
end
%Substract Medium/Medium+Triton
for x=1:1:length(CondU)
%For every Killing condition (x) do...
    if CondU(x)=="Tot"
        M(:,x)=MVX(:,x)-FVTriton; %M: Mean values substracted with correct medium control
    else
        M(:,x)=MVX(:,x)-FVMed;
    end
end
%build Index und Lysis
Conditions=CondU;
```

Kapitel 6 Anhang

```
Conditions(Conditions=="Lebend")=[]; %'Lebend' is live control
```

```
Conditions(Conditions=="Tot")=[]; %'Tot' is lysis control
```

**%Condition: Same as CondU but without control conditions with Live and
%Lysis control**

```
for x=1:1:length(Conditions)
```

```
    CurrX=Conditions(x); %CurrX: current condition to look at
```

```
    LocX = CondU == CurrX; %LocX: Index (Location) of current condition
```

```
    cond=M(:,LocX); %cond: substracted mean value of the current condition
```

```
    IdxL=contains(CondU,"Lebend");
```

```
    l=M(:,IdxL); %l: substracted mean value of the live control
```

```
    IdxT=contains(CondU,"Tot");
```

```
    d=M(:,IdxT); %d: substracted mean value of the lysis control (dead cells)
```

```
    IDX(a,x)=cond(1)./l(1); %calculates the Index
```

```
    idx=IDX(a,x); %save all in a matrix
```

```
    LyseX=(cond-(idx.*l))./(d-l).*100./idx;
```

```
    LyseTotal{x,a}=LyseX; %save all in a cell
```

```
    LysisF(:,a2)=LyseTotal{x,a};
```

```
    a2=a2+1;
```

```
    IdxF=[IdxF,IDX(a,x)];
```

```
end
```

```
end
```

```
MVAll{1,a+1}=[FVMed,FVTriton]; %add mean value of medium/medium+T to cell
```

%% 7) Reorder for output

```
MVF=[]; %empty cell for meanvalues
```

```
vF=[]; %empty cell for normalized errors
```

```
for z=1:1:length(z1)+1
```

```
    MVF=[MVF,MVAll{1,z}];
```

```
end
```

```
for z=1:1:length(z1)
```

```
    vF=[vF,vAll{1,z}];
```

```
end
```

Kapitel 6 Anhang

%% 8) Creating condition-names

%Same procedure than above

n1=1; %counter for NameAll

n2=1; %counter for NameKill

for a=1:1:length(z1)

 CurrTC=z1(a);

 LocTC=contains(s1,CurrTC);

 Cond=s2(LocTC==1);

 CondU = unique(Cond(:));

 for x=1:1:length(CondU)

 ai=z1(a);

 xi=CondU(x);

 FN=strcat(ai, '-', xi);

 NameAll(n1)=FN;

 n1=n1+1;

 end

 Conditions=CondU;

 Conditions(Conditions=="Lebend")=[];

 Conditions(Conditions=="Tot")=[];

 for x=1:1:length(Conditions)

 ai=z1(a);

 xi=Conditions(x);

 FN2=strcat(ai, '-', xi);

 NameKill(n2)=FN2;

 n2=n2+1;

 end

end

end

6.5 Statistische Analysen der Ca^{2+} -Signale

Analyse primärer NK-Zellen

pNK TMD8 Basales Ca^{2+}

Quelle der Variation	% Gesamtvariation	p-Wert (angepasst)
Interaktion	0,3342	0,2446
Zielzellschicksal	0,6809	0,0258
Rituximab-Behandlung	0,01379	0,6354

Post-hoc Vergleich (Tukey's)		p-Wert (angepasst)
Rituximab vs. Kontrolle	Apoptose	0,7668
	Nekrose	0,2768
	Mixed Phänotyp	0,6439
	Kontakt ohne Kill	0,1901
	Kein Kontakt	0,1
Ohne Rituximab (Kontrolle)	Apoptose vs. Nekrose	0,9964
	Apoptose vs. Mixed	0,9333
	Apoptose vs. Kontakt ohne Kill	0,9376
	Apoptose vs. Kein Kontakt	0,9482
	Nekrose vs. Mixed	0,9011
	Nekrose vs. Kontakt ohne Kill	>0,9999
	Nekrose vs. Kein Kontakt	>0,9999
	Mixed vs. Kontakt ohne Kill	0,5563
	Mixed vs. Kein Kontakt	0,5724
Rituximab	Kontakt ohne Kill vs. Kein Kontakt	0,9998
	Apoptose vs. Nekrose	0,1341
	Apoptose vs. Mixed	0,7016
	Apoptose vs. Kontakt ohne Kill	>0,9999
	Apoptose vs. Kein Kontakt	0,3133
	Nekrose vs. Mixed	0,8949
	Nekrose vs. Kontakt ohne Kill	0,104
	Nekrose vs. Kein Kontakt	0,001
	Mixed vs. Kontakt ohne Kill	0,678
	Mixed vs. Kein Kontakt	0,0502
	Kontakt ohne Kill vs. Kein Kontakt	0,0791

TMD8 ΔPeak

Quelle der Variation	% Gesamtvariation	p-Wert (angepasst)
Interaktion	0,7476	0,1473
Zielzellschicksal	3,411	<0,0001
Rituximab-Behandlung	5,116	<0,0001

Kapitel 6 Anhang

Post-hoc Vergleich (Tukey's)		p-Wert (angepasst)
Rituximab vs. Kontrolle	Apoptose	<0,0001
	Nekrose	0,1241
	Mixed	0,0032
	Kontakt ohne Kill	<0,0001
Ohne Rituximab (Kontrolle)	Nekrose vs. Apoptose	0,6841
	Mixed vs. Apoptose	0,728
	Kontakt ohne Kill vs. Apoptose	0,9494
	Mixed vs. Nekrose	0,9924
	Kontakt ohne Kill vs. Nekrose	0,4352
	Kontakt ohne Kill vs. Mixed	0,361
Rituximab	Nekrose vs. Apoptose	0,9885
	Mixed vs. Apoptose	0,9433
	Kontakt ohne Kill vs. Apoptose	<0,0001
	Mixed vs. Nekrose	0,9073
	Kontakt ohne Kill vs. Nekrose	0,0941
	Kontakt ohne Kill vs. Mixed	0,0048

pNK TMD8 Abklingzeit

Quelle der Variation	% Gesamtvariation	p-Wert (angepasst)
Interaktion	0,7476	0,1473
Zielzellschicksal	3,411	<0,0001
Rituximab-Behandlung	5,116	<0,0001

Post-hoc Vergleich (Tukey's)		p-Wert (angepasst)
Rituximab vs. Kontrolle	Apoptose	0,9645
	Nekrose	0,5202
	Mixed	0,5225
	Kontakt ohne Kill	0,1253
Ohne Rituximab (Kontrolle)	Nekrose vs. Apoptose	0,4892
	Mixed vs. Apoptose	0,9109
	Kontakt ohne Kill vs. Apoptose	0,2115
	Mixed vs. Nekrose	0,8313
	Kontakt ohne Kill vs. Nekrose	0,0248
	Kontakt ohne Kill vs. Mixed	0,0579
Rituximab	Nekrose vs. Apoptose	0,0473
	Mixed vs. Apoptose	0,98
	Kontakt ohne Kill vs. Apoptose	0,006
	Mixed vs. Nekrose	0,2424
	Kontakt ohne Kill vs. Nekrose	<0,0001
	Kontakt ohne Kill vs. Mixed	0,029

pNK K562 Basales Ca^{2+}

Kapitel 6 Anhang

Kruskal-Wallis Test		p-Wert (angepasst)
ohne CMA	Apoptose vs. Mixed	>0,9999
	Apoptose vs. Nekrose	>0,9999
	Apoptose vs. Kontakt ohne Kill	>0,9999
	Apoptose vs. Kein Kontakt	>0,9999
	Nekrose vs. Mixed	>0,9999
	Nekrose vs. Kontakt ohne Kill	0,6177
	Nekrose vs. Kein Kontakt	>0,9999
	Mixed vs. Kontakt ohne Kill	>0,9999
	Mixed vs. Kontakt ohne Kill	>0,9999
	Kontakt ohne Kill vs. Kein Kontakt	0,1169
mit CMA	Kontakt ohne Kill vs. Kein Kontakt	>0,9999
ohne CMA vs. mit CMA	Kontakt ohne Kill	>0,9999
	Kein Kontakt	>0,9999

pNK K562 Δ Peak

Kruskal-Wallis Test		p-Wert (angepasst)
ohne CMA	Apoptose vs. Nekrose	>0,9999
	Apoptose vs. Mixed	>0,9999
	Apoptose vs. Kontakt ohne Kill	>0,9999
	Nekrose vs. Mixed	>0,9999
	Nekrose vs. Kontakt ohne Kill	>0,9999
	Mixed vs. Kontakt ohne Kill	>0,9999
ohne CMA vs. mit CMA	Kontakt ohne Kill	0,3957

pNK K562 Abklingzeit

Kruskal-Wallis Test		p-Wert (angepasst)
ohne CMA	Apoptose vs. Nekrose	<0,0001
	Apoptose vs. Mixed	0,0593
	Apoptose vs. Kontakt ohne Kill	>0,9999
	Nekrose vs. Mixed	0,0044
	Nekrose vs. Kontakt ohne Kill	<0,0001
	Mixed vs. Kontakt ohne Kill	0,0023
ohne CMA vs. mit CMA	Kontakt ohne Kill	>0,9999

Analyse CAR NK-Zellen

CAR NALM-6 Δ Peak

Quelle der Variation	% der Gesamtvariation	p-Wert (angepasst)
Interaktion	0,1872	0,8636
Killing-Art	3,363	0,0044
CAR	0,0173	0,7936

Post-hoc Vergleich (Tukey's)		p-Wert (angepasst)
CAR vs. NT	Apoptose	0,0003
	Nekrose	0,0085
	Mixed	0,9268
	Kontakt ohne Kill	<0,0001
CAR NK	Apoptose vs. Nekrose	0,0229
	Apoptose vs. Mixed	0,7341
	Apoptose vs. Kontakt ohne Kill	0,7887
	Nekrose vs. Mixed	0,4876
	Nekrose vs. Kontakt ohne Kill	0,0076
	Mixed vs. Kontakt ohne Kill	0,3505
NT NK	Apoptose vs. Nekrose	0,5896
	Apoptose vs. Mixed	0,0126
	Apoptose vs. Kontakt ohne Kill	0,2566
	Nekrose vs. Mixed	0,5580
	Nekrose vs. Kontakt ohne Kill	0,0568
	Mixed vs. Kontakt ohne Kill	<0,0001

CAR K562 Δ Peak

Quelle der Variation	% der Gesamtvariation	p-Wert (angepasst)
Interaktion	0,6645	0,5092
Killing-Art	8,319	0,0001
CAR	0,1494	0,4705

Post-hoc Vergleich (Tukey's)		p-Wert (angepasst)
CAR NK	Apoptose vs Nekrose	0,9946
	Apoptose vs Mixed	0,7691
	Apoptose vs Kontakt ohne Kill	0,0859
	Nekrose vs Mixed	0,8290
	Nekrose vs Kontakt ohne Kill	0,0106
	Mixed vs Kontakt ohne Kill	0,0064
NT NK	Apoptose vs Nekrose	0,3188
	Apoptose vs Mixed	0,9885
	Apoptose vs Kontakt ohne Kill	0,0013
	Nekrose vs Mixed	0,6590
	Nekrose vs Kontakt ohne Kill	0,1144
	Mixed vs Kontakt ohne Kill	0,0188

CAR NALM-6 Abklingzeit

Quelle der Variation	% der Gesamtvariation	p-Wert (angepasst)
Interaktion	0,1872	0,8636
Killing-Art	3,363	0,0044
CAR	0,0173	0,7936

Post-hoc Vergleich (Tukey's)		p-Wert (angepasst)
CAR NK vs. NT NK	Apoptose	0,5200
	Nekrose	0,9921
	Mixed	0,6512
	Kontakt ohne Kill	0,4927
CAR NK	Apoptose vs. Nekrose	0,0225
	Apoptose vs. Mixed	0,8586
	Apoptose vs. Kontakt ohne Kill	0,9997
	Nekrose vs. Mixed	0,3546
	Nekrose vs. Kontakt ohne Kill	0,0936
	Mixed vs. Kontakt ohne Kill	0,9318
NT NK	Apoptose vs. Nekrose	0,1576
	Apoptose vs. Mixed	0,4650
	Apoptose vs. Kontakt ohne Kill	>0,9999
	Nekrose vs. Mixed	0,9070
	Nekrose vs. Kontakt ohne Kill	0,1307
	Mixed vs. Kontakt ohne Kill	0,4193

CAR NK K562 Abklingzeit

Quelle der Variation	% der Gesamtvariation	p-Wert (angepasst)
Interaktion	1,750	0,0648
Killing-Art	25,09	<0,0001
CAR	0,8635	0,0585

Post-hoc Vergleich (Tukey's)		p-Wert (angepasst)
CAR NK	Apoptose vs. Nekrose	<0,0001
	Apoptose vs. Mixed	0,0102
	Apoptose vs. Kontakt ohne Kill	0,2901
	Nekrose vs. Mixed	0,2613
	Nekrose vs. Kontakt ohne Kill	<0,0001
	Mixed vs. Kontakt ohne Kill	0,2356
NT NK	Apoptose vs. Nekrose	<0,0001
	Apoptose vs. Mixed	<0,0001
	Apoptose vs. Kontakt ohne Kill	0,8060
	Nekrose vs. Mixed	0,9821
	Nekrose vs. Kontakt ohne Kill	<0,0001
	Mixed vs. Kontakt ohne Kill	<0,0001

CAR NK Nalm-6 basales Ca²⁺-Signal

Quelle der Variation	% der Gesamtvariation	p-Wert (angepasst)
Interaktion	0,06676	0,9293
Killing-Art	0,9773	0,0132
CAR	0,0016	0,8859

Post-hoc Vergleich (Tukey's)		p-Wert (angepasst)
CAR NK	Apoptose vs. Nekrose	0,9926
	Apoptose vs. Mixed	0,9150
	Apoptose vs. Kontakt ohne Kill	0,3653
	Apoptose vs. Inaktive	0,0419
	Nekrose vs. Mixed	0,8010
	Nekrose vs. Kontakt ohne Kill	0,2822
	Nekrose vs. Kein Kontakt	0,0642
	Mixed vs. Kontakt ohne Kill	0,9369
	Mixed vs. Kein Kontakt	0,8773
	Kontakt ohne Kill vs. Inaktive	>0,9999
NT NK	Apoptose vs. Nekrose	0,9800
	Apoptose vs. Mixed	0,9953
	Apoptose vs. Kontakt ohne Kill	0,9829
	Apoptose vs. Kein Kontakt	0,7096
	Nekrose vs. Mixed	0,9329
	Nekrose vs. Kontakt ohne Kill	0,8802
	Nekrose vs. Kein Kontakt	0,6519
	Mixed vs. Kontakt ohne Kill	>0,9999
	Mixed vs. Kein Kontakt	0,9946
	Kontakt ohne Kill vs. Kein Kontakt	0,9412

CAR NK K562 basales Ca^{2+} -Signal

Quelle der Variation	% der Gesamtvariation	p-Wert (angepasst)
Interaktion	0,5846	0,2264
Killing-Art	0,3778	0,4540
CAR	0,003243	0,8593

Publikationen

In Vorbereitung

Kaschek L*, Moter A*, Küchler N*, ..., Schwarz EC, Ullrich E[#], Hoth M[#]. CAR NK (in Vorbereitung) (*shared first authors, [#]shared last authors)

Stopper, G*, Vialle J*, **Kaschek L***, ..., Hoth M. Assay (in Vorbereitung) (*shared first authors)

(beide Arbeiten wurden bereits mehrfach auf Kongressen als Poster vorgestellt: NK & ILC Symposium 2024 (Lyon), NK2025 (21st SNI Meeting -Hobart, Australia), NK & ILC Symposium 2026 (Freiburg), TiM 2025 (Trends in Microscopy, Spring School))

Peer reviewed

Kaschek L*, Vialle J*, Stopper G*, Hoffmann MDA, Zöphel S, Jansky J, Küchler N, Schäfer G, Moter A, Wendel P, Neumann F, Schormann C, Ullrich E, Roma LP, Kummerow C, Thurner L, Schwarz EC, Hoth M. Fura-10, unlike fura-2, is suitable for long-term calcium imaging in natural killer (NK) cells without compromising cytotoxicity and can be combined with target cell death analysis. Cell Calcium. 2026 Jan;133:103091. doi: 10.1016/j.ceca.2025.103091. Epub 2025 Nov 21. PMID: 41314008. (*shared first authors)

Zhou X, Zhang S, Yang W, Gonder S, Sadjadi Z, Piernitzki N, Moter A, Sharma S, Largeot A, Küchler N, **Kaschek L**, Schäfer G, Schwarz EC, Eichler H, Ullrich E, Rieger H, Staufer O, Paggetti J, Moussay E, Hoth M, Qu B. Restoring NK Cell Cytotoxicity Post-Cryopreservation via Synthetic Cells. Adv Sci (Weinh). 2025 Nov;12(42):e05731. doi: 10.1002/adv.202505731. Epub 2025 Sep 18. PMID: 40966444; PMCID: PMC12622558.

Zöphel S, Küchler N, Jansky J, Hoxha C, Schäfer G, Weise JJ, Vialle J, **Kaschek L**, Stopper G, Eichler H, Yildiz D, Moter A, Wendel P, Ullrich E, Schormann C, Rixecker T, Cetin O, Neumann F, Orth P, Bewarder M, Hoth M, Thurner L, Schwarz EC. CD16⁺ as predictive marker for early relapse in aggressive B-NHL/DLBCL patients. Mol Cancer. 2024 Sep 28;23(1):210. doi: 10.1186/s12943-024-02123-7. PMID: 39342291; PMCID: PMC11438071.

Zöphel D, **Kaschek L**, Steiner R, Janku S, Chang HF, Lis A. Heterozygous OT-I mice reveal that antigen-specific CD8⁺ T cells shift from apoptotic to necrotic killers in the elderly. Aging Cell. 2023 Jun;22(6):e13824. doi: 10.1111/ace.13824. Epub 2023 Mar 22. PMID: 36947105; PMCID: PMC10265152.

Zöphel D, Angenendt A, **Kaschek L**, Ravichandran K, Hof C, Janku S, Hoth M, Lis A. Faster cytotoxicity with age: Increased perforin and granzyme levels in cytotoxic CD8⁺ T cells boost cancer cell elimination. Aging Cell. 2022 Aug;21(8):e13668. doi: 10.1111/ace.13668. Epub 2022 Jul 11. PMID: 35818124; PMCID: PMC9381916.

Publikationen

Friedmann KS, **Kaschek L**, Knörck A, Cappello S, Lünsmann N, Kuchler N, Hoxha C, Schäfer G, Iden S, Bogeski I, Kummerow C, Schwarz EC, Hoth M. Interdependence of sequential cytotoxic T lymphocyte and natural killer cell cytotoxicity against melanoma cells. *J Physiol*. 2022 Dec;600(23):5027-5054. doi: 10.1113/JP283667. Epub 2022 Nov 3. PMID: 36226443.

Kaschek L*, Zöphel S*, Knörck A*, Hoth M. A calcium optimum for cytotoxic T lymphocyte and natural killer cell cytotoxicity. *Semin Cell Dev Biol*. 2021 Jul;115:10-18. doi: 10.1016/j.semcdb.2020.12.002. Epub 2021 Jan 6. PMID: 33358089. (shared first authors)

Bewarder M, Kiefer M, Will H, Olesch K, Moelle C, Stilgenbauer S, Christofyllakis K, Kaddu-Mulindwa D, Bittenbring JT, Fadle N, Regitz E, **Kaschek L**, Hoth M, Neumann F, Preuss KD, Pfreundschuh M, Thurner L. The B-cell Receptor Autoantigen LRPAP1 Can Replace Variable Antibody Regions to Target Mantle Cell Lymphoma Cells. *Hemasphere*. 2021 Jul 13;5(8):e620. doi: 10.1097/HS9.0000000000000620. PMID: 34263144; PMCID: PMC8274796.

Danksagung

Mein erster Dank geht an die beiden, deren Namen mehrmals in der Arbeit gefallen sind: Danke Nadja und Alina, dass ich unsere Daten in meine Doktorarbeit aufnehmen konnte. Das Projekt mit euch hat wirklich viel Spaß gemacht und ich denke, wir können stolz auf das sein, was dabei rauskam!

Ein gesondertes Danke geht an die SCC Gruppe. Mit euch macht das Arbeiten einfach Spaß. Gebhard, als du zu uns kamst, hatten wir ja schon die Idee, dass man pCasper-Zellen automatisiert auswerten können sollte. Aber das, was MSparkles jetzt kann, das ist so viel mehr als das, was ich mir erträumt habe - die α - und β -Testphase hat sich auf jeden Fall gelohnt. Danke Markus! Für deine Geduld, deine Wissenskultur, geprägt von möglichst wenig Druck, freier Kommunikation und wenig Eitelkeit. Danke, dass du an meine Langstreckenfähigkeit (nein, das ist nicht das gesuchte Wort) geglaubt hast und für die ein oder andere Cola ;). Joanne, du weißt gar nicht, wie froh ich bin, dich als Freundin und als Labor-Bestie zu haben. Was für ein Glück, sich privat und beruflich so gut zu verstehen. Ich freue mich auf alles, was da noch kommt.

Insgesamt dieses Labor. Es hat einen Grund, warum sich Arbeiten hier oft nach „Zuhause sein“ anfühlt und das ist nicht nur der vielen Zeit geschuldet. Es sind die vielen tollen Kolleg*innen, die einen immer unterstützen, immer ein offenes Ohr haben, für Fachliches, aber oft genug auch für Privates. Danke hier vor allem an das „Eckbüro“ (man bleibt im Herzen Eckbüro, auch wenn man umgezogen ist ;)). Danke Dorina und Anni für die coolen Mausprojekte, die in frustrierenden Zeiten ein toller Lichtblick waren. Danke an Eva für deine Geduld und Hingabe, mit der du Wissenschaft machst, die Montag-Meetings organisierst, uns liebevoll daran erinnerst, doch nochmal Daten zu zeigen, auch wenn noch nicht alles feinpoliert ist. Danke an alle TAs, für die Zellkultur, die Organisation, das Wikipedia-sein. Ohne euch würde das Labor nicht laufen!

Ein riesiger Dank an meine Mama, die Fehler besser findet als jede KI, an meinen Papa, dem rote Fäden schon immer wichtig waren, und an Nora, die mich nicht nur bei Statistik, sondern auch weit darüber hinaus unterstützt hat. Ich hab euch lieb. Danke Sebastian. Etappe 13/12: Jetzt ist nicht mehr viel zu tun. Die Zielgerade ist erreicht. Danke für alle Verpflegungsstationen, den Rückenwind, die Sonne, den Sturzhelm, den Windschatten. What a race <3 !

Danke Carsten. Du hast mein wissenschaftliches Denken geprägt wie kaum jemand. Danke für die vielen Diskussionen, deine Neugier, deine Gründlichkeit. Ich habe unfassbar viel von dir gelernt. Wir haben darüber gewitzelt, wer von uns wohl schneller seine Doktorarbeit haben wird. Dass ich jetzt „gewinne“ und du nicht mehr dabei bist, macht mich unfassbar traurig.

Lebenslauf

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

Tag der Promotion: 10.07.2026

Dekan: Matthias Hannig

Berichterstatter: Prof. Dr. Markus Hoth

Prof. Dr. Matthias Laschke

Prof. Dr. Christine Peinelt