



Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg
Medizinische Fakultät Mannheim
Dissertations-Kurzfassung

**Stoffwechsel und Funktion Natürlicher Killerzellen nach in vitro-
Priming und in der Sepsis**

Autor: Bianca Stefanie Himmelhan
Institut / Klinik: Klinik für Anästhesiologie und Operative Intensivmedizin
Doktorvater: Priv.-Doz. Dr. H. A. Lindner

Der klassischen Definition nach ist die Sepsis eine durch eine Infektion ausgelöste systemische Entzündungsreaktion (systemisches inflammatorisches Response Syndrom, SIRS). In Deutschland sterben jährlich 70.000 Krankenhauspatienten mit oder an einer Sepsis, und die Tendenz ist steigend. Gleichzeitig stellt die frühzeitige und verlässliche Diagnose eine hohe Herausforderung dar. Bisher verfügbare Sepsis-Biomarker, wie CRP oder PCT, weisen keine ausreichende Trennschärfe. Die neue Sepsis-3 Definition setzt die Organdysfunktion an die Stelle des SIRS. Sie steht jedoch wegen des Verdachts, zu einer Verzögerung der Sepsisdiagnose beizutragen, stark in der Kritik, v.a. im Kontext der Intensivversorgung, mit dem sich diese Arbeit u.a. beschäftigt.

Früh im Verlauf eines durch schwere Verletzung (chirurgisch oder durch Unfall) oder durch Infektion bedingten SIRS stellt das Blut - trotz einer früh nachzuweisenden, überschießenden Entzündungsreaktion insgesamt ein immunsuppressives Milieu dar, in dem Immunzellen eine verminderte Aktivierbarkeit zeigen, die jedoch weitgehend reversibel ist. Natürliche Killerzellen (NK-Zellen) sind Teil des angeborenen Immunsystems. Sie erkennen und eliminieren gestresste körpereigene Zellen (z.B. nach maligner Transformation oder bei Infektion). NK-Zellen basierte Marker im Blut könnten helfen, ein SIRS von einer Sepsis auf der Intensivstation zu unterscheiden.

Eine Analyse biochemischer Pfade (Pathway Analysis) in Mikroarraydaten von Patienten-NK-Zellen legt nahe, dass in der Sepsis im Vergleich zum SIRS die Pathways oxidative Phosphorylierung, Zellzyklus und Apoptose aktiviert sind. Bereits publizierte Ergebnisse aus unserem Labor haben eine in vitro Synergie zwischen Priming (für 6 Stunden) mit dem Zytokin Interleukin 15 (IL-15) und Hypoxie (1% Sauerstoff, v/v) bei der Induktion glykolytischer Gene in humanen NK-zellen gezeigt. Aus diesen Vorarbeiten ergibt sich die Hypothese, dass es in der akuten Sepsis sowie in der frühen lokalen Inflammation zu Änderungen der Funktion und des Metabolismus der NK-Zellen kommt.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass humane NK-Zellen in SIRS und Sepsis sowie unter in vitro Priming eine metabolische Flexibilität gegenüber den verfügbaren Kohlenstoffquellen haben, und nicht von der Glykolyse abhängen. In SIRS und Sepsis ist ferner die Zellproliferation und der Zelltod gleichzeitig stärker ausgeprägt als in gesunden NK-Zellen. In der Tat ist der Anteil der NK-Zellen, die positiv für den Proliferationsmarker Ki-67 sind, in der Sepsis mehr als doppelt so hoch (80%) als im SIRS (30%). Dieses könnte zu neuen diagnostischen und therapeutischen Strategien der Sepsisfrüherkennung führen.

Erkenntnisse aus dieser Untersuchung zur Phänotypisierung der NK-Zellen aus dem peripherem Blut von Patienten mit Sepsis im Vergleich zu SIRS mittels bisher nur in der Maus gut charakterisierten Oberflächenmarkern deuten auf eine Verschiebung des NK-Zell-Entwicklungszustands hin. Diese Arbeit weist in einer Entdeckungsgruppe auf eine signifikante Differenzierung zwischen SIRS und Sepsis Patienten anhand der CD16 Expression pro NK-Zelle in Kombination mit CD11b und CD27 hin. Diese Ergebnisse ließen sich in einer Validierungsgruppe jedoch nicht replizieren.

Die im Rahmen dieser Dissertation durchgeführten in vitro Analysen zeigen, dass die Aktivierbarkeit der Produktion von Interferon- γ (IFN γ) durch IL-12/18) nicht wesentlich von einer vorherigen Langzeitinkubation (>18 h) gegenüber eines Primings (6 h) mit IL-15, was eher dem zeitlichen in vivo entspricht, profitiert. Ferner ist sowohl die Produktion von IFN γ als auch die der wichtigen NK-Zellchemokine CCL3/4/5 weder durch Hypoxie (1% O $_2$) noch Glukoseentzug wesentlich reduziert. Die Glykolyse ist auch nach Kontakt mit einer Tumorzelllinie unverändert. Glukose und Sauerstoff sind jedoch gut belegte, wichtige Faktoren für die Langzeitaktivität von NK-Zellen. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass NK-Zellen trotz der Aktivierung glykolytischer Gene nach Priming noch kein an einem

nicht-glykolytischen Metabolismus festhalten und diese nur unter Hypoxie zur Energiegewinnung einsetzen, was aber langfristig ihre Aktivierbarkeit reduziert.

Zusammengefasst leistet diese Arbeit einen Beitrag zur (1) Identifikation von mechanistisch begründeten Biomarkern zur frühen Differenzierung einer Sepsis von einem SIRS. Jedoch ist es erforderlich, die bisher gewonnenen Daten in einem größeren Stichprobenumfang zu validieren. Die Charakterisierung der metabolischen Anforderungen u.a. für die Zytokinantwort von NK-Zellen in der frühen Phase einer Inflammationsreaktion heben die Bedeutung des IL-15 Primings für die Aktivierbarkeit bei metabolischer Flexibilität hervor und können zu neuen Strategien für die ex vivo Konditionierung von NK-Zellen für die Immuntherapie führen.