

Aus der Klinik für Anästhesiologie und operative Intensivmedizin  
der Medizinischen Fakultät Mannheim  
(Direktor Prof. Dr. med. Manfred Thiel)

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

Inauguraldissertation  
zur Erlangung des Doctor scientiarum humanarum (Dr. sc. hum.)  
der  
Medizinischen Fakultät Mannheim  
der Ruprecht-Karls-Universität  
zu  
Heidelberg

vorgelegt von  
Bianca Stefanie Himmelhan

aus  
Mannheim  
2019

Dekan: Prof. Dr. med. Sergij Goerd  
Referent(in): Herr Priv.-Doz. Dr. rer. nat. Holger A. Lindner

# INHALTSVERZEICHNIS

Seite

1	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	1
2	EINLEITUNG.....	5
2.1	Sepsis.....	5
2.1.1	Definitionen.....	5
2.1.2	Epidemiologie .....	6
2.1.3	Früherkennung und Problematik .....	6
2.2	Das Immunsystem.....	8
2.2.1	Angeborenes Immunsystem .....	9
2.2.2	Natürliche Killerzellen .....	9
2.2.3	NK-Zellen unter Hypoxie.....	14
2.3	Metabolismus der NK-Zellen .....	14
2.3.1	Oxidative Phosphorylierung und Stickstoffmonoxid .....	16
2.3.2	Zellzyklus und Zellproliferation .....	18
2.4	NK-Zell assoziierte Zytokine, Effektormoleküle und Chemokine .....	18
2.4.1	Proinflammatorische Zytokine .....	19
2.4.2	Antiinflammatorische Zytokine.....	20
2.4.3	Effektormoleküle.....	21
2.4.4	Endothelwachstumsfaktor - Vascular Endothelial Growth Factor .....	22
2.4.5	Chemokine .....	23
2.5	NK-Zellen in humaner Sepsis.....	24
2.6	Transkriptom- und Pathwayanalysen von NK-Zellen aus Patienten mit SIRS und Sepsis.....	25
2.7	Messprinzipien.....	27
2.7.1	Durchflusszytometrie .....	27
2.7.2	Metabolische Flussanalyse.....	27
3	FRAGESTELLUNG .....	31

<b>4 MATERIAL UND METHODEN.....</b>	<b>32</b>
4.1 Material.....	32
4.1.1 Geräte, Verbrauchsmaterial und Reagenzien .....	32
4.2 Geräte und Material für die Durchflusszytometrie.....	34
4.3 Geräte und Material zur Reinigung der NK-Zellen mittels magnetisch-aktivierter Zellsortierung .....	36
4.4 Geräte und Verbrauchsmaterialien für die Zellkultur .....	38
4.5 Geräte und Verbrauchsmaterialien zur metabolischen Flussanalyse .....	40
4.6 Geräte und Verbrauchsmaterialien für Magnetic Bead Arrays .....	41
4.7 Geräte und Verbrauchsmaterialien für die Genexpressionsanalyse.....	42
4.8 Medien, Puffer und Lösungen .....	43
4.9 Methoden .....	44
4.9.1 Studienteilnehmer.....	44
4.9.2 Diagnosekriterien.....	45
4.10 Vielfarben Durchflusszytometrie.....	47
4.10.1 Durchflusszytometrische Analyse des Vollblutes .....	47
4.10.2 Durchflusszytometrische Analyse von PBMC und NK-Zellen.....	49
4.10.3 Zellzyklus und Zellproliferation .....	51
4.10.4 Zytotoxizitätstest.....	54
4.10.5 Durchflusszytometrische Analyse der metabolischen Aktivität .....	55
4.10.6 Durchflusszytometrische Analyse von NK-Zell Effektormolekülen .	56
4.10.7 Durchflusszytometrische Analysen von Chemokinrezeptoren.....	56
4.10.8 Präparation von peripheren mononukleären Zellen.....	56
4.10.9 Reinigung von Natürlichen Killerzellen .....	58
4.10.10 Zellkultur.....	59
4.10.11 Metabolische Flussanalysen .....	61
4.10.12 Migrationsassay .....	63
4.10.13 Magnetischer Bead-Array-Assay .....	64
4.10.14 Gesamte RNA .....	65
4.10.15 Quantitative Real Time-Polymerase Kettenreaktion.....	65
4.10.16 Statistische Auswertung .....	66
<b>5 ERGEBNISSE .....</b>	<b>67</b>
5.1 Demographische und klinische Charakteristika der Patienten.....	67
5.1.1 Durchflusszytometrische Charakterisierung der Leukozyten .....	68

5.1.2	Durchflusszytometrische Analyse der Verteilung von NK-Zellen .....	70
5.1.3	Genexpressionsanalyse bei Patienten mit SIRS und Sepsis .....	72
5.1.4	Quantifizierung der Plasmakonzentrationen von NK-Zell- und Sepsis-assozierten Proteinen .....	73
5.2	Metabolische Aktivität und Effektorfunktionen von NK-Zellen <i>in vitro</i> .....	76
5.2.1	Rolle der <i>in vitro</i> Hypoxiekonditionierung und sekundären Stimulation auf Phänotyp, Effektorfunktionen und metabolisches Profil .....	77
5.2.2	Gesteigerte Funktionalität und Frequenz der Effektormoleküle durch <i>in vitro</i> sekundäre Stimuli .....	79
5.2.3	Proinflammatorische Zytokine und Konditionierung mit chemisch-induzierter Hypoxie führen zur verstärkten durchflusszytometrischen Glut-1 Expression in IL-15 geprimten NK-Zellen .....	85
5.2.4	Physiologische Hypoxie bewahrt eine durch IL-12 und IL-18 in IL-15 geprimten NK-Zellen hervorgerufene IFN- $\gamma$ Induktion .....	87
5.2.5	Verstärkte Glut-1 Expression durch IL-15 Priming und sekundäre proinflammatorische Zytokine ohne die Glukoseaufnahme zu steigern .....	91
5.2.6	NK-Zell-Zytotoxizität und Zytokinproduktion nach Kontakt mit leukämischen Zielzellen sind unabhängig von der Glykolyse .....	92
5.2.7	Induktion der IFN- $\gamma$ Produktion von NK-Zellen ist ein Glukose-unabhängiger Prozess .....	96
5.2.8	NK-Zellantworten nach IL-15 Priming oder Kontakt mit proinflammatorischen Zytokinen besitzen eine mitochondriale Flexibilität .....	101
5.2.9	NK-Zellen zeigen keine direkte Abhängigkeit von oxidativer Phosphorylierung und Fettsäuremetabolismus .....	103
5.2.10	Zeitabhängigkeit der Chemokinrezeptorexpression nach Migration ... ..	104
5.2.11	NK-Zell-Migration ist unabhängig von der Glykolyse .....	106
5.3	Metabolismus und Funktionen von NK-Zellen aus Patienten mit SIRS und Sepsis .....	107
5.3.1	Metabolismus .....	108
5.3.2	Zellzyklus, Zellproliferation und Apoptose von NK-Zellen bei Patienten .....	110
6	DISKUSSION .....	118
6.1	Inflammatorische Mediatoren, NK-Zell Stadium sowie kontaktabhängige Zytotoxizität unterscheiden Patienten mit SIRS und Sepsis .....	118
6.2	NK-Zellen sind für ihre Effektorfunktionen flexibel gegenüber ihrer Kohlenstoffquelle .....	120
6.3	NK-Zell-Migration, trotz erhöhter Chemokinsekretion, unabhängig von verstärkter CC-Chemokin-Rezeptor Expression .....	125

6.4	Gesteigerte Apoptose und Zellproliferation bei Patienten mit SIRS und Sepsis .....	128
7	ZUSAMMENFASSUNG.....	131
8	LITERATURVERZEICHNIS.....	133
9	TABELLARISCHER ANHANG.....	162
10	LEBENS LAUF .....	177
11	EIGENE VERÖFFENTLICHUNGEN .....	178
12	DANKSAGUNG.....	179

## 1 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

2-DG	2-Deoxy-Glukose
2-NBDG	2-(N-(7-Nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl) Amino)-2-Deoxy-Glukose
4EBP1	4E bindendes Protein
7AAD	7-Aminoactinomycin
µL	Mikroliter
µM	Mikromolar
Acetyl-CoA	Acetyl-Coenzym A
ADP	Adenosindiphosphat
ADCC	Antibody-dependent cellular cytotoxicity; antikörperabhängige zelluläre Zytotoxizität
ADMA	Asymmetrisches Dimethylarginin
AKT	v-Akt Murine Thymoma Viral Oncogene; v-Akt murines virales Thymom Onkogen
ANOVA	Analysis of variance; Varianzanalyse
APC	Antigen-presenting cell; Antigen-präsentierende Zelle
APC	Allophycocyanin (Farbstoff-Konjugat für Antikörper)
APC-Cy7	Allophycocyanin-Cyanine 7 (Farbstoff-Konjugat für Antikörper)
ATP	Adenosintriphosphat
BPTES	Bis-2-(5-phenylacetamido-1,3,4-thiadiazol-2-yl) ethyl sulfide/ Glutaminase
B-Zelle	B Lymphozyt
Ca <sup>2+</sup>	Calcium
CCL	C-C- Chemokinligand
CCR	C-C Chemokinrezeptor
CD	cluster of determination; Differenzierungsantigen
cDNA	Komplementäre DNA
CIML	Cytokine-induced memory-like; zytokininduziertem Memory-ähnlichen Phänotyp
c-Kit	Tyrosinkinase KIT
CLP	Common lymphoid progenitor; gemeinsame lymphoide Vorläuferzelle
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
Ct	threshold cycle; Schwellenwert
CpG	Cytidin-phosphatidyl-Guanosin
CPT1A	Carnitin Palmitoyl-Transferase 1A
Da (kDa)	Dalton (Kilo Dalton)
DAF-2DA	Diaminfluorescein-2 Diacetat
DAF-2T	Diaminfluorescein-2 Triazole Derivat
DC	Dendritische Zelle
DMOG	Dimethyloxalylglycine
DNA	Desoxyribonucleic Acid; Desoxyribonukleinsäure
ECAR	Extracellular Acidification rate; extrazelluläre Ansäuerungsrate
EDTA	Ethyl diamintetraacetat
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay

eNOS	Endothelial nitric oxide synthase; endotheliale Stickstoffsynthase
ESICM	European Society of Intensive Care Medicine
FACS	Fluorescence activated cell scanning; Durchflusszytometrie
FADH <sub>2</sub>	Flavin-Adenin-Dinukleotid
Fas	Apoptose Antigen
FCS	Fetal calf serum; Fetales Kälberserum
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat (Farbstoff-Konjugat für Antikörper)
FSC	Forward scatter; Vorwärtsstreulicht
xg	Geradlinige Beschleunigung; g-Kraft
g	Gramm
GFP	Green fluorescent protein; grün fluoreszierendes Protein
GLS1	Glutaminase 1
Glut	Glukosetransporter
GM-CSF	Granulozyten-Monozyten-Kolonie-stimulierende Faktor
GPCR	G protein-coupled receptor; G Protein-gekoppelter Rezeptor
H <sup>+</sup>	Wasserstoffproton
H <sub>2</sub> O	Wasser
HCl	Salzsäure
HIF-1 $\alpha$	Hypoxie-induzierter Faktor 1 $\alpha$
HIF-1 $\beta$	Hypoxie-induzierter Faktor 1 $\beta$
HLA-DR	Humanes Leukozyten Antigen – DR Isotype
HLA-Klasse-I-Moleküle	Humanes Leukozyten Antigen-Klasse-I-Molekül
HSPC	Hematopoetic stem/progenitor cells; hämatopoetische Stamm-/Vorläufer Zellen
ICU	Intensive Care Unit; Intensivstation
ID	Identifikation
IFN- $\gamma$	Interferon-gamma
IgG	Immunglobulin G
IL	Interleukin
iNOS	inducible nitric oxide synthase; induzierbare Stickstoffsynthase
ITAM	Immunreceptor Tyrosin-based activation motif; Immunrezeptor Tyrosin-basierte Aktivierungsmotiv
ITIM	Immunreceptor Tyrosin-based inhibition motif; Immunrezeptor Tyrosin-basierte Inhibierungsmotiv
Jak	Janus Kinase
JNJ	1-(5-Chloro-6-(trifluoromethoxy) -1H-benzoimidazol-2-yl) -1H-pyrazole-4-carboxylic acid; - (5-Chlor-6-(Trifluoromethoxy) -1H-Benzoimidazol-2-yl) -1H-Pyrazol-4-Carboxylische Säure
Ki-67	Proliferationsmarker, 67. Antikörperklon einer Kieler Versuchsreihe
KIR	Killer cell immunoglobuline like receptor; Killerzellen-Immunglobulin-ähnlicher Rezeptor
LGL	large granular lymphocyte; große granuläre Lymphozyten
LILRB1	Leucocyte immunoglobuline receptor 1; Leukozyten Immunglobulin Rezeptor 1
LPS	Lipopolysaccharide
MACS	Magnetic-activated cell sorting; Magnetisches Trennverfahren



MFI	Mittlere Fluoreszenzintensität
MeFI	Mediane Fluoreszenzintensität
MHC-Moleküle	Major histocompatibility complex; Haupthistonkompatibilitätskomplex
mL	Milliliter
min	Minuten
MIP-1 $\alpha$	Macrophage inflammatory protein 1 $\alpha$ ; Makrophagen- Entzündungsprotein 1 $\alpha$
MIP-1 $\beta$	Macrophage inflammatory protein 1 $\beta$ ; Makrophagen- Entzündungsprotein 1 $\beta$
mM	Millimolar
MPC	Mitochondrial pyruvat carrier; mitochondrialer Pyruvat Carrier
mRNA	messenger RNA
mTOR	Mammalian target of rapamycin; Ziel des Rapamycin im Säugetier
mTORC1	Mammalian target of rapamycin complex 1; Ziel des Rapamycin im Säugetier Komplex 1
n	Stichprobenumfang
NADH	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid
NADPH	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
N-CAM	Neural-cell adhesion molecule; neuronales Zelladhäsionsmolekül
ng	Nanogramm
NK-Zelle	Natürliche Killerzelle
nNOS	neuronal nitric oxide synthase; neuronale Stickstoffsynthase
NO	Nitric oxide; Stickstoffmonoxid
NOS	nitric oxide synthase; Stickstoffsynthase
O <sub>2</sub>	Sauerstoff
OCR	oxygen consumption rate; Sauerstoffverbrauchsrate
OXPHOS	Oxidative Phosphorylierung
PAMPs	pathogen associated molecular patterns; Pathogen-assoziierte molekulare Muster
PCR	Polymerase chain reaction; Polymerase Kettenreaktion
PRPs	Pattern recognition receptor, Mustererkennungsrezeptor
PBMC	peripheral blood mononuclear cell; Mononukleäre Zellen des peripheren Blutes
PBS	Phosphate buffered saline; Phosphatgepufferte Salzlösung
PDK1	3-Phosphoinositide-dependent protein kinase-1; 3-Phosphoinositid abhängige Proteinkinase-1
PE	Phycoerythrin
PerCP	Peridin-Chlorophyll-Protein
PHD	Prolyl Hydroxylase
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinasen
QGP	QuantiGene Plex
qSOFA	Quick SOFA
RAG	Recombinant activation gene; rekombinantes Aktivierungsgen
RANTES	Regulated on activation, normal T cell expressed and secreted
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	Reactive oxygen species; reaktive Sauerstoffspezies

RPMI-Medium	Medium, entwickelt am Roswell Park Memorial Institute
S6K1	Ribosomale Protein S6 Kinase
SCF	Stem cell factor; Stammzellefaktor
SCMM	Society of Critical Care Medicine
SD	Standardabweichung
SDMA	Symmetrisches Dimethylarginin
SIRS	Systemisches Inflammatorisches Response Syndrom
SOFA	sequential organ failure assessment; sequentielle Organversagen Bestimmung
STAT	Signal transducer and activator; Signaltransduktoren und Aktivatoren der Transkription
SSC	Side scatter; Seitwärtsstreulicht
TCA	tricarboxylic acid cycle; Tricarbonsäurezyklus
TGF- $\beta$	Transforming growth factor- $\beta$ ; transformierter Wachstumsfaktor- $\beta$
Th1	Typ1 T Helferzelle
Th2	Typ2 T Helferzelle
TIM-3	T cell immunoglobulin mucin 3; T-Zell Immunglobulin Mucin 3
TLR	Toll-like receptor; Toll-artige Rezeptoren
TNF- Rezeptoren	Tumornekrosefaktor-Rezeptoren
TNF- $\alpha$	Tumornekrosefaktor $\alpha$
T-Zelle	T Lymphozyten
VEGF	Vascular endothelial growth factor; Endothelwachstumsfaktor

## 2 EINLEITUNG

### 2.1 Sepsis

#### 2.1.1 Definitionen

Die Sepsis ist ein komplexes, klinisches Syndrom, beschrieben von Bone 1989 als eine „Invasion von Mikroorganismen und/oder ihrer Toxine in den Blutstrom zusammen mit der Reaktion des Organismus auf diese Invasion“ (Bullwinkel et al., 2006). Seit der 1. Konsensuskonferenz des American College of Chest Physicians und der Society of Critical Care Medicine 1991 ist die Sepsis als systemisches inflammatorisches Response-Syndrom (SIRS) auf dem Boden einer Infektion definiert (Bone et al., 1992b). Im Jahr 2003 wurde im Rahmen der 2. Konsensuskonferenz diese Definition der Sepsis (Sepsis-1/2) modifiziert und erstmals als internationale Leitlinie zur Diagnose und Therapie der Sepsis formuliert. Seither findet sie weltweit in vielen Kliniken, als auch in klinischen Studien, Verwendung. Die Definition einer Sepsis, wurde gemäß Sepsis-1/2, mit mindestens zwei SIRS Kriterien aufgrund einer Infektion definiert. Eine schwere Sepsis lässt sich durch eine manifestierte Organdysfunktion abgrenzen und ein septischer Schock unterscheidet sich von den beiden vorherigen durch eine schwere Sepsis mit akutem Kreislaufversagen einschließlich Vasopressorenbedarf (Ferlazzo et al., 2004; Levy et al., 2003).

Gemäß dieser Definition ist nach einem auf den Körper wirkenden Ereignisses von einem nicht-infektiösen SIRS zu sprechen, sobald mindestens zwei Vitalparameter verändert sind. Hierzu zählen eine abfallende ( $\leq 36^{\circ}\text{C}$ ) oder steigende Körpertemperatur ( $\geq 38^{\circ}\text{C}$ ), eine Herzfrequenz über 90/min, eine Atemfrequenz von  $\geq 20/\text{min}$  oder einem arteriellen Kohlendioxidpartialdruck von  $\leq 32 \text{ mmHg}$ , ein Leukozyten Anstieg auf  $\geq 12000/\text{mm}^3$  beziehungsweise ein Leukozyten Abfall auf  $\leq 4000/\text{mm}^3$ , sowie ein Anstieg im Blut der unreifen Neutrophilen auf  $\geq 10\%$  (Bastian et al., 2008).

In 2015 definierte die 3. Konsensuskonferenz eine Sepsis als eine lebensbedrohliche Erkrankung bei der die Reaktion des Körpers auf eine Infektion zu einer Schädigung der eigenen Gewebe und Organe führt (Singer et al., 2016). Als Infektion wird die nachgewiesene oder vermutete Infektion, inklusive mindestens zwei der oben genannten SIRS Kriterien beschrieben. Demnach ist die Sepsis als Infektion mit mindestens einer Organdysfunktion definiert. Zur Bestimmung der Organdysfunktion kann der „sequential organ failure assessment“ (SOFA) Score herangezogen werden. Eine akute Verschlechterung der Organdysfunktion wird als SOFA Score  $\geq 2$  Punkte aufgrund einer Infektion klassifiziert (Seymour et al., 2016). Die SIRS Kriterien sollen weiterhin zur allgemeinen Diagnose herangezogen werden. Zu den bestehenden Kriterien aus Sepsis 1/2 kommt eine volumenfraktionäre Hypotension mit Laktatanstieg  $> 2$ , sodass die Letalität des Patienten signifikant erhöht ist (Singer, 2016; Singer et al., 2016).

### 2.1.2 Epidemiologie

Die Kombination aus anhaltender Inflammation, Organdysfunktion und Immunsuppression von kritisch kranken Patienten, inklusive denen mit Sepsis, wird als chronisch kritische Erkrankung bezeichnet (Scholzen und Gerdes, 2000). Sie resultieren in einer stark verlängerten intensivmedizinischen oder palliativen Behandlung. Charakteristisch ist eine verlängerte Ventilationsabhängigkeit, Delirium und Funktionsstörungen des Gehirns, neuromuskuläre Schwäche, Mangelernährung, Schädigungen der Haut sowie eine stark verminderte Fähigkeit Basisvitalfunktionen aufrecht zu erhalten (Schwartz, 1993). Aufgrund des geschwächten Immunsystems bei Intensivpatienten kann sich eine lokale, meist bakterielle Infektion leicht zu einer lebensbedrohlichen Allgemeininfektion (Sepsis) ausweiten (Bone et al., 1992a; Herdegen und Böhm, 2014). Diese Veränderungen können zu einer verzögerten Mortalität führen, die auch als 1-Jahres-Sterblichkeits Rate von > 50% betitelt wird. Obwohl mehr Patienten die klassische 28-Tage-Sterblichkeitsperiode überleben, verstirbt ein Großteil innerhalb des ersten Jahres nach Entlassung aus dem Krankenhaus. Viele nach einer Sepsis entlassenen Patienten sind nicht in der Lage in ihr altes Leben zurückzukehren (Bullwinkel et al., 2006).

Die weltweite Inzidenz der Sepsis wird auf circa 19 Millionen Fälle pro Jahr geschätzt (Adhikari et al., 2010; Fleischmann et al., 2016a). Die Ätiologie auf der nicht-kardiologischen Intensivstation sind Atemwegsinfektionen mit 62,9% gefolgt von intraabdominellen Infektionen mit 25,3%, Weichteil- und Knocheninfektionen mit 8,7% und Infektionen des Urogenitaltrakts mit 6,5% (Brunkhorst, 2006). In Deutschland ist zwischen 2007 und 2013 die Anzahl der Patienten, die an oder mit einer Sepsis im Krankenhaus verstorben sind, von 54 000 auf fast 68 000 gestiegen. Dieses Krankheitsbild ist mittlerweile hierzulande die dritthäufigste Todesursache (Fleischmann et al., 2016b). Die Behandlungskosten binden circa 30% des intensivmedizinischen Budgets (Brunkhorst, 2006). Dennoch beträgt die Letalität in Industrieländern immer noch 20-30% (Fleischmann et al., 2016b; Stevenson et al., 2014). Die Wirksamkeit der dringend indizierten Antibiotika ist jedoch durch die zunehmende Resistenzentwicklung bedroht (Herdegen und Böhm, 2014; Karow, 2015; S2-Leitlinie-Sepsis, 2010; Singer et al., 2016). Konträr hierzu steht die rückläufige Entwicklung neuer Antibiotika im Verlauf der vergangenen 30 Jahren, weshalb resistente Bakterien eine ernstzunehmende Bedrohung für Krankenhauspatienten, insbesondere auf den Intensivstation, darstellen (Karow, 2015).

### 2.1.3 Früherkennung und Problematik

Eine frühzeitige Antibiotikatherapie verbessert die Überlebenschancen der septischen Patienten deutlich (Kumar et al., 2007; Peltan et al., 2019; Peltan et al., 2017; Whiles et al., 2017). Die klinische Herausforderung liegt in der frühen Diagnose der Sepsis von Patienten, welche häufig in einem generell intensivmedizinischen Kontext zu betrachten sind (S2-Leitlinie-Sepsis, 2010). Mikrobiologische Testergebnisse aus Blutkulturen können von mehreren Stunden bis zu mehreren Tage andauern. Sie zeigen dabei in lediglich 30-40% aller klinisch definierten Sepsis Fälle ein positives Resultat (Sinha et al., 2018; van Engelen et al., 2018).

Dabei kann SIRS ein Anzeichen einer Sepsis sein, mit welchem nach großen Operationen oder schweren Verletzungen zu rechnen ist. Bislang spielen bei der Sepsis Diagnose bereits Zeichen einer Organdysfunktion, aufgrund von Sauerstoffmangel im Gewebe eine wichtige Rolle (Angus und van der Poll, 2013; Chan et al., 2012). Der großen Bedrohung der bakteriellen Resistenzentwicklung geschuldet, kann nicht jeder SIRS-Patient vorsorglich und ungezielt mit Antibiosen behandelt werden. Durch die hohe SIRS Inzidenz von zwischen 40% und 50% auf nicht-kardiologischen Intensivstationen, ist deshalb eine Diagnosestellung erschwert und erfolgt häufig erst dann, wenn eine Organdysfunktion oder Anzeichen eines infektiösen Fokus vorliegen. Biomarker zur Unterstützung einer frühzeitigen und verlässlichen Diagnose der Sepsis werden daher dringend benötigt.

Früh im Verlauf eines SIRS stellt das Blut - trotz einer früh nachzuweisenden, überschießenden Entzündungsreaktion - insgesamt ein immunsuppressives Milieu dar, in dem Immunzellen eine verminderte Aktivierbarkeit zeigen. Dieses ist jedoch weitgehend reversibel (Adib-Conquy und Cavillon, 2009). Die Anteile der Immunzellsubpopulationen (Leukozyten, Monozyten, natürliche Killerzellen und weitere) weichen im Blut von Patienten deutlich von den Gesunden ab (Cabrera et al., 2017; Tak et al., 2017). Veränderte Gensignaturen und Phänotypen im Vollblut werden sowohl durch Änderungen in der Leukozytengenexpression, als auch durch die große Anzahl an unterschiedlichen Leukozytensubtypen im Blut hervorgerufen (O'Connell et al., 2019; O'Connell et al., 2017). Diese Varianz erschwert die Interpretation der Genexpressionssignaturen und verdeutlicht den enormen Bedarf einer verbesserten Früherkennung (Sciicluna et al., 2015; Sweeney et al., 2015). Vorarbeiten dieser Gruppe (Experimentelle Anästhesiologie an der Klinik für Anästhesiologie und operative Intensivmedizin an der hiesigen Klinik) basieren auf der Annahme, dass die Analyse spezifischer, präparativ gewonnener Immunzellsubpopulationen statt der Gesamtleukozyten ein höher aufgelöstes Bild der Veränderungen bei SIRS und Sepsis und damit detaillierte Einsichten in pathozelluläre Veränderungen des Blutes bieten (Coulibaly et al., 2019). Besonders deutlich sind diese Unterschiede auf natürliche Killerzellen (Kapitel 2.2.2). Sie sind wichtige Zytokin-Produzenten und tragen wesentlich zur systemischen Inflammation bei. Darüber hinaus spielen Sie eine wichtige Rolle sowohl beim Übergang der angeborenen zur erworbenen Immunantwort, als auch beim Abklingen von Inflammationen (Vivier et al., 2011). Für NK-Zellen wurde kürzlich im Vergleich der Sepsis zu dem SIRS eine reduzierte Fähigkeit zur Produktion von IFN- $\gamma$  (Interferon- $\gamma$ ) nachgewiesen (Forel et al., 2012). Murine NK-Zellen verschärfen die schädliche Hyperinflammation während der experimentellen Sepsis durch Inhibition der Interleukin 15 (IL-15) – induzierten IFN- $\gamma$  Produktion. Dies fördert das Überleben der Tiere (Guo et al., 2018). Es wird daher diskutiert, ob sie möglicherweise differentialdiagnostische Information tragen (Chiche et al., 2011; Souza-Fonseca-Guimaraes et al., 2013).

Genomweite Genexpressionsanalysen (Transkriptomanalysen) peripherer Immunzellen sind ein vielbeschrittener Weg das Phänomen der parallel ablaufenden zellulären Immunüberaktivierung und Immunsuppression zu verstehen. Bisher wurden allerdings fast ausschließlich Studien mit Gesamtleukozyten, von SIRS und Sepsis betroffenen Patienten, bei Aufnahme auf die Intensivstation durchgeführt. Hierbei konnten verschiedene differenzielle Genexpressionssignaturen identifiziert werden. Keine dieser Querschnittsstudien von Intensivpatienten bei Aufnahme konnte jedoch

eine dieser Signaturen in einer Verlaufsstudie als Sepsis-Marker validieren (Davenport et al., 2016; Maslove und Wong, 2014; McHugh et al., 2015; van Vught et al., 2016a).

## 2.2 Das Immunsystem

Das Immunsystem repräsentiert ein komplexes Netzwerk aus Molekülen, Zellen und Organen zur Protektion gegen Infektionen und Tumoren. Die Abwehrmechanismen des Immunsystems basieren auf der Detektion der strukturellen Eigenschaften eindringender Pathogene. Es erkennt, attackiert und eliminiert sie. In Vertebraten werden zwei Arten von Abwehrmechanismen, die angeborene von der adaptiven Immunabwehr, unterschieden (Alberts et al., 2017; Fearon und Locksley, 1996; Medzhitov und Janeway, 1997).

Entscheidend für die zellulären Abwehrmechanismen des innaten Immunsystems sind Makrophagen. Diese können gemeinsam mit B-Zellen, Monozyten und Dendritische Zellen (DC) als Antigen-präsentierende Zellen (APC) klassifiziert werden (Murphy und Weaver, 2018). Aufgrund ihrer Oberflächenrezeptoren erkennen sie Erreger, phagozytieren diese und sekretieren immunmodulatorische Zytokine, wie unter anderem anti- und proinflammatorische Zytokine (Chaplin, 2010; Moretta, 2002).

Im Gegensatz zum angeborenen besteht der erworbene Teil des Immunsystems aus nur wenigen Zelltypen, den sogenannten B- und T-Lymphozyten (B- und T-Zellen). Konträr zu den Zellen des innaten Immunsystems weisen sie eine um Stunden bis Tage verzögerte Aktivierung auf und lösen eine spezifische Immunantwort aus. Die adaptive Immunabwehr zeichnet sich durch ein kontinuierliches, lebenslanges Memorieren von spezifischen Mustern der Pathogenen aus. Dieses Memorieren wird dem immunbiologischen Gedächtnis zugeschrieben (Alberts et al., 2017; Delves et al., 2017). Lymphozyten stammen, wie auch NK-Zellen, aus dem Knochenmark und nutzen, im Gegensatz zum unspezifischen Immunsystem spezielle Rezeptoren (B- und T-Zell-Rezeptoren) für eine spezifische Antigenerkennung von Pathogenen, um eine gezielte Immunantwort auszulösen. Ihre Rezeptoren sind zufällige Produkte einer somatischen Gen-Rearrangement während der Reifung. Dabei entwickeln B-Zellen rund  $5 \times 10^{13}$  unterschiedliche Rezeptoren und T-Zellen rund  $10^{18}$ . T-Zellen können andere Immunzellen bei der Elimination von Pathogenen, als T-Helferzellen, unterstützen, aber auch zusätzlich direkt infizierte und entartete Zellen neutralisieren. B-Zellen dagegen sezernieren lösliche Antikörper, welche Pathogene abtöten oder das angeborene Immunsystem bei der Elimination von Erregern unterstützen. Bei wiederkehrenden Infektionen können sie schneller reagieren, da sie ein Gedächtnis formen können. Plasmazellen leben nur wenige Tage, in denen sie große Mengen an Antikörpern sekretieren, weshalb sie auch als Effektormoleküle der humoralen Immunantwort gelten (Murphy und Weaver, 2018; Nicholson, 2016; Zhao et al., 2012).

## 2.2.1 Angeborenes Immunsystem

Das angeborene Immunsystem dient als erste Verteidigungslinie gegen Pathogene und Tumore. Dieser Teil des Immunsystems bedarf keiner Sensibilisierung gegen Antigene. Es besteht aus einer epithelialen und einer endotheliale Barriere, Granulozyten, Makrophagen, DC, natürlichen Killer (NK)- Zellen sowie Plasmaproteinen, die das Komplementsystem bilden (Alberts et al., 2017).

Die Erkennung von infektiösen Agenzien basiert auf Keimbahn-kodierten Rezeptoren. Diese Immunzellen erkennen durch ihre Pattern-Recognition-Rezeptoren (PRPs) typische Pathogenstrukturen, sogenannte pathogen associated molecular patterns (PAMPs) auf den Erregern. Zu den PAMPs gehören beispielsweise Lipopolysaccharide (LPS) von gramnegativen Bakterien, die über toll-like Rezeptoren (TLR) erkennbar sind (Hof und Dörries, 2017; Murphy und Weaver, 2018). Damit ist eine rapide Aktivierung des angeborenen Immunsystems möglich.

## 2.2.2 Natürliche Killerzellen

Natürliche Killerzellen wurden erst Mitte der 70er Jahre von R. Kiessling und R. Herberman beschrieben und gehören zum zellulären Schenkel der innaten Immunabwehr (O'Neill et al., 2016; Walzer et al., 2005). Ihre Hauptaufgabe ist die Elimination von transformierten, entarteten und infizierten Zellen, weshalb sie auch zytotoxische Zellen genannt werden. Sie entsprechen etwa 5-10% der Lymphozyten im peripheren Blut (Cheent und Khakoo, 2009).

Die Entstehung der NK-Zellen findet im Knochenmark als ein mehrstufiger Prozess durch die Hämatopoese statt. Sie entwickeln sich aus einer multipotenten hämatopoetischen Stammzelle (CD34<sup>+</sup>) analog zu den spezifischen Zellen des Blutes (Erythrozyten, Thrombozyten, Granulozyten, Monozyten, B-, T- und NK-Zellen) (Colucci et al., 2003; Freud et al., 2006). Beeinflusst wird die Maturierung durch Zytokine. NK-Zellen entstehen aus den sogenannten common lymphoid progenitor (CLP) ohne jedoch den Prozess des Gen-Rearrangements zu durchlaufen. Stattdessen exprimieren einige Zellen die RAG (recombinant activation gene) Rekombinase als Endonuklease. Sie ist wichtig für die Funktion und Fitness der reifen peripheren NK-Zellen (Held et al., 2018; Karo et al., 2014). Die Reifung und Homöostase von NK-Zellen werden hauptsächlich von Interleukin (IL)-2 und IL-15, die aktivierende Signale initiieren, durch die Janus Kinase (Jak) (Felices et al., 2018) 1 und 3 sowie der Signaltransduktoren und Aktivatoren der Transkription (STATs)-3, STAT-5, und STAT-6 Nuklearfaktoren propagiert (Cooper et al., 2001; Felices et al., 2018; Leong et al., 2013; Medzhitov, 2001). Dies fördert sowohl das Wachstum der NK-Zellen, als auch ihre Fähigkeit auf aktivierende Signale zu reagieren. Aktivierte NK-Zellen infiltrieren ihrerseits Gewebe mit Pathogen-infizierten oder malignen Zellen, um dort diese zu erkennen und direkt zu eliminieren (Beresford et al., 1999; Glas et al., 2000; Mandal und Viswanathan, 2015).

NK-Zellen stellen eine lymphatische Subpopulation dar. Durch Stimulation mit bestimmten Faktoren, wie IL-15, IL-2, IL-3, IL-7, IL-12, IL-18 oder SCF (Stammzellfaktor), lassen sie sich *in vitro* aus CD34<sup>+</sup> hämatopoetischen

Vorläuferzellen differenzieren (Felices et al., 2018; Leong et al., 2013; Raulet, 2004; Romee et al., 2016). Die Differenzierung zu anderen Lymphozytenpopulationen erfolgt anhand der Expression des CD56 (N-CAM, neuronales Zelladhäsionsmolekül) Oberflächenmoleküls bei zeitgleicher Abwesenheit des T-Zell-Rezeptors CD3 (Delves et al., 2017). Die NK-Zellpopulation lässt sich zugleich anhand des Expressionslevels der Moleküle CD56 und CD16 nochmals in eine CD56<sup>bright</sup> CD16<sup>-</sup> – und eine CD56<sup>dim</sup> CD16<sup>+</sup>-Population unterteilen (Cooper et al., 2001; Poli et al., 2009).

Eine Unterscheidung der beiden Subpopulationen wird nicht nur hinsichtlich ihrer Oberflächenexpression durchgeführt, sondern auch aufgrund ihrer physiologischen Funktionalität. Die CD56<sup>bright</sup> CD16<sup>-</sup> NK-Zellen sind aufgrund ihrer Fähigkeit zur Zytokinproduktion (Tumor Nekrose Faktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), Granulozyten-Monozyten-Kolonie-stimulierende Faktor (GM-CSF), CC-Chemokin-Liganden (CCL) 3, CCL4 und CCL5) fundamental an immunregulatorischen Prozessen beteiligt und essentiell für die Schnittstelle zwischen innatem und adaptivem Immunsystem verantwortlich (Bluman et al., 1996; Fauriat et al., 2010; Hof und Dörries, 2017; Pearce und Pearce, 2013; Poli et al., 2009; Vivier et al., 2011). Dabei haben diverse Zytokine aktivierende und inhibierende Eigenschaften (Amakata et al., 2001; Carlsten und Childs, 2015; Gerdes et al., 1984; Moretta, 2002; Zwirner und Zibat, 2017).

NK-Zellen binden unter Mitwirkung zahlreicher Adhäsionsmoleküle an Tumor- oder virusinfizierte Zellen. Die CD56<sup>dim</sup> CD16<sup>+</sup> Subpopulation entspricht 90% der im peripheren Blut befindlichen NK-Zellen. Sie vermitteln die Fähigkeit Zielzellen mittels kontaktabhängiger Zytotoxizität durch Moleküle wie Perforin oder Granzyme B sowie, bedingt durch den Todesrezeptor, Apoptose auszulösen (De Maria et al., 2011; Moretta, 2002; Vivier et al., 2011; Yokoyama et al., 2004). Die Initiation der Apoptose erfolgt über zwei Wege. Zum einen mit gerichteter Exozytose zytotoxischer Granula. Zum anderen fördert die Bildung einer immunologischen Synapse zwischen NK- und Zielzelle die Umstrukturierung von Mikrotubuli in Richtung der Bindestelle, sodass die Granula polarisiert werden. Bei Ausschüttung der Perforine bildet sich in Anwesenheit von Ca<sup>2+</sup> ein ringförmiges Polymer in der Membran der Zielzelle aus. Folglich kommt es zu einer Porenbildung in der Zellmembran und ermöglicht das Eindringen der Apoptose auslösenden Granzyme (Smyth et al., 2001). Zum anderen können NK-Zellen die Apoptose auch direkt auslösen. Durch den Kontakt des Todesrezeptor-Liganden (z.B. Fas-Ligand) auf der NK-Zelle und dem Todesrezeptor (z.B. Fas) auf der entarteten Zelle wird die endogene proteolytische Enzymkaskade aktiviert und somit die Apoptose induziert (De Maria et al., 2011; Enari et al., 1996; Smyth et al., 2005). Zusätzlich zur natürlichen Zytotoxizität können NK-Zellen eine antikörperabhängige, zellvermittelte Zytotoxizität (ADCC) durch eine geringe Affinität gegen den Fc Rezeptor für Immunglobulin G (IgG), explizit gegen Fc $\gamma$ -Rezeptor III (CD16), auslösen. Durch Bindung opsonisierender IgG-Antikörper an die CD16a Moleküle wird eine Rezeptor-Ligand-Interaktion der Zielzellyse mittels Degranulierung vermittelt (Colucci et al., 2002; Lanier, 2003; Leibson, 1997; Trinchieri, 1989).

Zusätzlich produzieren NK-Zellen eine Vielfalt an immunregulatorischen Chemokinen und Zytokinen. Im Speziellen sind dies IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$  sowie CCL-3, CCL4 und CCL5 und wirken auf unterschiedliche Immunzellen, wie beispielsweise Eosinophile, Makrophagen, Neutrophile und T-Zellen (Cooper et al., 2001; Velasquez et al., 2016; Vivier et al., 2011; Vivier et al., 2008). Zusätzlich zu ihrer zytotoxischen Funktion



können sie durch die Produktion von IFN- $\gamma$ , Makrophagen aktivieren. Der Großteil der NK-Zell Antworten beruhen auf zytotoxischen und Zytokin-bedingten Antworten. Einige wenige basieren auf der Interaktion mit anderen Immunzellen (wie etwa dendritische Zellen, Makrophagen oder T-Zellen), sowie des Zytokin-Milieus der Mikroumgebung (Raulet, 2004; Romee et al., 2016; Walzer et al., 2005).

In Mäusen wurde bereits gezeigt, dass eine Exposition mit proinflammatorischen IL-12, IL-15 und IL-18 eine Differenzierung der NK-Zellen zu einem Zytokin-induziertem Memory-ähnlichen (CIML) Phänotyp induziert. Diese produzieren nach Stimulation signifikant mehr IFN- $\gamma$  (Felices et al., 2018; Medzhitov, 2001). Humane NK-Zellen, die präaktiviert und mittels IL-12 und IL-15, oder IL-12 und IL-18 behandelt wurden und im direkten Kontakt zu K-652 leukämischen Zellen standen, bilden ebenfalls einen Memory-ähnlichen Phänotyp aus und präsentieren eine verstärkte IFN- $\gamma$  Produktion (Pahl et al., 2018; Romee et al., 2012).

IL-15 wird als Kandidat für NK-Zell-basierte Immuntherapien bei malignen Tumoren in Betracht gezogen. Die IL-15/IL-15 Rezeptor Achse stimuliert *in vivo* das NK-Zell Überleben und Reifung oder *in vitro* die NK-Zell Expansion und Aktivierung (Felices et al., 2018; Hof und Dörries, 2017; Medzhitov, 2001). Der Effekt von IL-15 auf NK-Zellen scheint vom Grad der Bioverfügbarkeit abzuhängen. *In vitro* Behandlung von NK-Zellen mit hohen Mengen IL-15 (zwischen 30 und 60 ng/mL) für eine kurze Zeitspanne (ungefähr sechs Stunden) stimuliert bereits die Expression von Perforin und Granzyme B mRNA. Ihrerseits fördert dies das NK-Zell „Priming“ und die Initiation der frühen Aktivierung (Chaplin, 2010). Eine verlängerte Behandlung mit IL-15 (~24h) mit konstant hoher Dosis reguliert lediglich die Perforin und Granzyme B Protein Expression hoch, jedoch nicht die der mRNA (O'Connell et al., 2017). Des Weiteren zeigt eine längere Exposition (über 5 Tage) mit sehr hoch dosiertem IL-15 (100 ng/mL) einen substanziellen Anstieg der basalen oxidativen Phosphorylierung sowie der aeroben Glykolyse (Marcais et al., 2014). Hinzukommt, dass jüngste Literatur von einer Erschöpfung der humanen NK-Zellen nach längerer Behandlung mit IL-15 berichtet. Entkräftete NK-Zellen zeigen eine reduzierte zytolytische Aktivität und reduzierte Produktion von Effektormolekülen. Dazu zählen die IFN- $\gamma$  Sekretion, der Zellzyklusarrest, die reduzierter Zellviabilität ebenso wie metabolische Defekte (Felices et al., 2018).

#### 2.2.2.1 Entwicklung und Differenzierung von NK-Zellen

Eine essentielle Funktion wird dem Stammzellefaktor von Stromazellen des Knochenmarks zuteil. Aus NK-Vorläufer-Zellen entstehen, in der Anwesenheit von IL-2 und IL-15, NK-Zellen (Freud et al., 2006; Mrozek et al., 1996). Die Reifung ist von der Präsenz der Gamma Kette des IL-2 Rezeptor Komplexes abhängig (Sun, 2016). In Abwesenheit der Gamma Kette kommt es jedoch zu einem kompletten Verlust der NK-Zelle (Di Santo, 2006; Ma et al., 2006; Zinman et al., 2015).

Die CD56 Expressionslevel gliedern humane NK-Zellen in zwei Subpopulationen. Zum einen in die CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen, hauptsächlich in lymphatischen Organen vorkommend, zum anderen in die CD56<sup>dim</sup> NK-Zellen, welche den Großteil der im

peripheren Blut befindlichen NK-Zellen formen. CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen üben durch ihre potente Zytokinsekretion verstärkt immunregulatorische Funktionen aus. Währenddessen haben CD56<sup>dim</sup> NK-Zellen ihre mehrheitliche Aufgabe in der zytotoxischen Aktivität. (Fehniger et al., 2007; Fehniger et al., 2003). Neben dem bisherigen gut etablierten System zur Unterteilung von NK-Zellen, lag der Untersuchungsfokus in den letzten Jahren verstärkt im Nachweis von funktionellen distinkten NK-Zell Subpopulationen.

Auf der Basis von globalen Genprofilen und adaptivem Transfer von NK-Zellen wurde zunächst ein vierstufiger Prozess zur NK-Zell-Reifung in murinen NK-Zellen beschrieben (Chiossone et al., 2009; Hayakawa et al., 2006). Die spezifische Mikroumgebung sowie die komplexen, zellulären Interaktionen liefern entscheidende Signale zur Modifikation von NK-Zellen (Mavilio et al., 2005; Zhang et al., 2016). Das Integrin CD11b (Mac-1) hat sich bereits als Marker reifer humaner als auch muriner NK-Zellen erwiesen (Freud et al., 2006; Kim et al., 2002). CD27, ein Mitglied der Tumornekrosefaktor-Familie, ist ein entscheidender zusätzlicher Faktor zur Differenzierung von NK-Zellen (Hayakawa et al., 2006; Vossen et al., 2008). CD27 defizitäre NK-Zellen aus Mäusen zeigen eine normale Differenzierung, jedoch mit einer beeinträchtigten Funktion (De Colvenaer et al., 2011). Durch die ebenfalls festgestellte Expression von CD27 auf humanen NK-Zellen wird die vergleichende Interpretation von Eigenschaften und Funktionen zwischen Maus und Mensch weiter erhärtet (Hayakawa et al., 2006; Vossen et al., 2008). Analog zu murinen NK-Zellen konnten auch die humanen NK-Zellen, aufgrund ihrer Oberflächenexpression von CD11b und CD27, in vier, funktionell distinkte Gruppen differenziert werden (Abbildung 1). Diese sind entsprechend ihrer zunehmenden Funktionalität CD11b<sup>-</sup>CD27<sup>-</sup> (I), CD11b<sup>-</sup>CD27<sup>+</sup> (II), CD11b<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup> (III) sowie CD11b<sup>+</sup>CD27<sup>-</sup> (IV) (Fu et al., 2014; Fu et al., 2011). Mehr als 90% der peripheren NK-Zellen sind CD11b<sup>+</sup>CD27<sup>-</sup>. Wohingegen im Nabelschnurblut nur rund 80% CD11b<sup>+</sup>CD27<sup>-</sup> und 20% CD11b<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup> vorzufinden sind. Vergleicht man diese mit NK-Zellen der Dezidua sind die dort befindlichen natürlichen Killerzellen weniger entwickelt und bestehen zu fast 60% aus CD11<sup>-</sup>CD27<sup>-</sup> NK-Zellen (Fu et al., 2014; Fu et al., 2011).

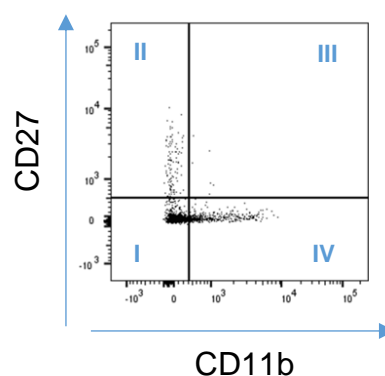


Abbildung 1: Repräsentatives Beispiel der NK-Zellen gemäß ihrer Differenzierungsstadium mit CD11b und CD27 am Beispiel eines Probanden (Kapitel 4.10).

### 2.2.2.2 Selbsttoleranz der NK-Zellen

Die Differenzierung von pathogenen und gesunden Zellen ist eine essentielle Aufgabe der NK-Zellen. Heute ist bekannt, dass dies ein durch inhibierende und aktivierende Rezeptoren bedingter Prozess ist (Lanier, 2008; Raulet, 2006). Als wichtiger Mechanismus wird die verminderte Dichte der HLA-Klasse-I-Moleküle auf veränderten Zellen diskutiert und als „missing self“ Theorie bezeichnet (Delves et al., 2017; Garrido und Algarra, 2001; Ljunggren und Kärre, 1990). Kärre und Ljunggren postulierten, dass NK-Zellen am besten solche Zellen lysieren, die keine HLA-Klasse-I-Moleküle auf ihrer Oberfläche exprimieren (Kärre et al., 1986). Das kann zu einem Überwiegen von Aktivierungssignalen in NK-Zellen führen und die Effektor-Maschinerie in Gang setzen (Vivier et al., 2011). Alle kernhaltigen, gesunden Körperzellen exprimieren dieses HLA-Klasse-I-Molekül zur Aufrechterhaltung der Selbsttoleranz (Kärre et al., 1986). Das zweite Kriterium wird als „altered self“ bezeichnet und beschreibt die Fähigkeit der NK-Zellen, sowohl die Expression von MHC-ähnlichen Molekülen sowie anderen Proteinen, die normalerweise nicht auf der Zelloberfläche vorhanden sind, zu erfassen. Zellen, die für NK-Zellen fremde Proteine exprimieren, werden von den NK-Zellen schnell vernichtet. (Raulet, 2006)

### 2.2.2.3 Inhibierende und aktivierende Rezeptoren auf NK-Zellen

Das Gleichgewicht zwischen inhibierenden und aktivierenden Rezeptoren auf NK-Zellen stellt die Selbsttoleranz sicher und erlaubt eine effiziente Immunreaktion im Falle einer Infektion oder bei Tumorwachstum (Furukawa et al., 1999; Raulet, 2006; Vivier et al., 2011). Es hängt von der Summe der über die immunologische Synapse empfangenen Signale ab, ob eine NK-Zelle eine von ihr gebundene Zielzelle eliminiert. Sofern die aktivierenden Signale überwiegen, kommt es zu einer zytotoxischen Reaktion. Dominieren die inhibierenden Signale, wird der Kontakt gelöst und die Zielzelle bleibt unverändert (Cerwenka und Lanier, 2001; Endt et al., 2007; González et al., 2006; Lanier, 1998; Moretta et al., 1996; Moretta et al., 2007; Watzl, 2003). Gleichzeitig muss von ständigen Adaptionen an die Umgebung und von Veränderungen der NK-Zell-Antwort ausgegangen werden (Gerdes et al., 1983; Scholzen und Gerdes, 2000).

Durch die Formierung der Immunologischen Synapse und die Bindung des NKG2D-Rezeptors an seinen Liganden (NKG2DL) wirkt es als allgemeines Alarmsignal und folglich kommt es zur Freisetzung von Zytokinen und Chemokinen sowie der Initiation der zytotoxischen Aktivität (Moretta, 2002; Raulet, 2003). Als Folge der Stimulation der aktivierenden Rezeptoren oder fehlender Stimulation der inhibierenden Rezeptoren schütten NK-Zellen IFN- $\gamma$  aus. Zeitgleich werden Granzyme und Perforin freigesetzt. Folglich wird die Zielzelle abgetötet. Benachbarte gesunde Zellen bleiben davon unberührt (Bossi et al., 2002; Trambas und Griffiths, 2003).

Der Fc $\gamma$ -Rezeptor (CD16) ist für die Antikörper-abhängige zellvermittelte Zytotoxizität (ADCC) von entscheidender Bedeutung. Eine spezifische Antikörper-Antigen Bindung an den CD16 Rezeptor löst eine zytotoxische NK-Zell-Antwort aus. (Smyth et al., 2002).

Der Transferrin Rezeptor CD71 ist auf einigen Immunzellen, inklusive Monozyten und NK-Zellen, exprimiert und wird generell als früher Aktivierungsmarker betrachtet (Domagała-Kulawik et al., 2003; Strohmeyer et al., 2003). Der Rezeptor wird für die Lieferung von Eisen aus Transferrin in die Zelle benötigt. Die CD71 Rezeptorexpression ist in metabolisch aktiven Zellen erhöht und dient als Cofaktor für fundamentale, biochemische Prozesse, wie den Sauerstofftransport, den Energiemetabolismus und die DNA Synthese (Marcais et al., 2014; Wang und Pantopoulos, 2011). Insbesondere auf CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen wird die CD71 Expression als Antwort auf die Zytokinstimulation hochreguliert (Keating et al., 2016). Neben CD71 ist in metabolisch aktiven Zellen, vor allem auch bei Malignitäten, der Proliferationsmarker Ki-67 aktiv (Krzywinska et al., 2015).

### 2.2.3 NK-Zellen unter Hypoxie

An Inflammationsherden oder Bereichen des Tumormikromilieus herrschen häufig Bedingungen mit vermindertem Sauerstoffpartialdruck. Bei Infiltration in hypoxische, inflammatorische Areale müssen sich Immunzellen, zur Erbringung einer effektiven Immunantwort, metabolisch und funktionell an die vorliegenden Bedingungen adaptieren. Als Effektorlymphozyten mit direkter Zytotoxizität gegen infizierte oder entartete Zellen passen sich NK-Zellen kurzfristig an die geänderten Bedingungen, inklusive Sauerstoffentzug, an (Balsamo et al., 2013; Parodi et al., 2018). Als Konsequenz des sinkenden Sauerstoffpartialdrucks kommt es zu einer Induktion der Hypoxie-induzierten Faktor Familie (HIF) an Transkriptionsfaktoren. Diese spielen bei der Regulation der Inflammation und des Immunsystems eine wichtige Rolle (D'Ignazio et al., 2016; Fábíán et al., 2016; Palazon et al., 2014). Eine Verminderung des zellulären Sauerstoffpartialdrucks stabilisiert HIF-1 $\alpha$  und ermöglicht die Einwanderung in den Nukleus. Dort kann es mit HIF-1 $\beta$  dimerisieren und an das sogenannte Hypoxia-Response Element binden. Diese Bindung an das adaptive Gen fördert die Initiation der Expression. Eine schnelle Verfügbarkeit von HIF-1 $\alpha$  ist ein wichtiger Mechanismus zur Gewährleistung der zellulären Homöostase bei vermindertem Sauerstoffpartialdruck (Semenza, 2011). Zusätzlich reguliert er die metabolische Rückprogrammierung zur Glykolyse. An Foci mit Gewebeschäden und Infektionen führen sowohl die eigentliche Entzündung, als auch der reduzierte Sauerstoffpartialdruck zur Stabilisierung von HIF-1 $\alpha$  (Semenza, 2014). Infektionen, Tumore und zusätzliche post-transkriptionelle Mechanismen können zur HIF-1 $\alpha$  Aktivierung beitragen (Krzywinska et al., 2017; Ni et al., 2012; Palazon et al., 2014; Parodi et al., 2018). Die Kontrolle der Glykolyse mittels mTOR (mammalian Target of Rapamycin) Komplex 1 (mTORC1) fördert neben der Expression von HIF-1 $\alpha$  und c-MYC auch die Hochregulation der Expression von Nährstofftransportern (Bruhn et al., 2008).

## 2.3 Metabolismus der NK-Zellen

Adaptionen im Immunmetabolismus sind für das humane Immunsystem entscheidend. Insbesondere zählen hierzu Veränderungen der intrazellulären Signalwege in

Immunzellen. Die wichtigsten Energiestoffwechselwege sind die Glykolyse, der Tricarbonsäurezyklus (TCA Zyklus), der Pentosephosphatweg, der Fettsäurestoffwechsel, sowie der Aminosäuremetabolismus. Immunantworten können durch die Metaboliten dieser Stoffwechselwege geformt und verändert werden (O'Neill et al., 2016). Intrinsische und extrinsische Signale regulieren die Aktivität des Metabolismus, um die Bedürfnisse von Wachstum und Überleben mit der Stoffwechsel-Maschinerie zu verbinden. Spezifische Veränderungen in metabolischen Signalwegen resultieren in Effektorfunktionen, besonders in der Produktion von Zytokinen. Immunzellen mit diversen Funktionen nutzen unterschiedliche Stoffwechselwege zur Erzeugung von Energiespeichern, um das Überleben und die Produktion zahlreicher biosynthetischer Intermediate für Zellwachstum und Proliferation zu generieren (Buck et al., 2017; O'Neill et al., 2016; Walzer et al., 2005).

Glykolyse und oxidative Phosphorylierung sind die wichtigsten energieproduzierende Stoffwechselwege in Zellen. Einige Zellen, unter anderem NK-Zellen, gewinnen den Großteil Ihres Energiebedarfs (etwa 70%, des ATP Bedarfs) durch die oxidative Phosphorylierung (OXPHOS) (Vander Heiden et al., 2009). Dabei variiert das Verhältnis zwischen aerober Glykolyse und OXPHOS in Abhängigkeit von Zellart, Wachstumsstadium und Mikromilieu (Jang et al., 2013). (Loftus und Finlay, 2016; Schütt und Bröker, 2011).

NK-Zellen scheinen unter bestimmten Bedingungen auch in Anwesenheit von Sauerstoff Glykolyse zu betreiben (Donnelly et al., 2014; Viel et al., 2016). Otto Warburg beschrieb diesen Effekt im veränderten Energiestoffwechsel bereits in den 1920er Jahren bei Tumorzellen (Viel et al., 2016; Warburg et al., 1927). Warburg bezeichnete diese Form des Metabolismus als „aerobe Glykolyse“, die bis heute auch als „Warburg-Effekt“ bezeichnet wird. Die meisten Zellen besitzen die Fähigkeit zwischen den beiden Energiemetabolismen zu wechseln und sich an ihre Umgebung anzupassen (Berg et al., 2018). In Arealen mit transformierten oder entarteten Zellen, Inflammationen und Infektionen herrscht ein hypoxisches Mikromilieu. NK-Zellen sind in diesen Bereichen besonders aktiv, da sie als Schnittstelle zwischen innatem und adaptivem Immunsystem agieren. Die Energiebilanz der OXPHOS liegt bei 32 ATP Äquivalenten aus einem Molekül Glukose, während die der Glykolyse nur 2 ATP Äquivalente liefert. Aufgrund der hohen ATP-Synthese Geschwindigkeit wird dies jedoch kompensiert. Bei Substratüberfluss stehen so der Zelle mittels aerober Glykolyse größere Mengen an ATP in kürzerer Zeit zur Verfügung (Nelson und Cox, 2009; Pfeiffer et al., 2001). Aerobe Glykolyse wird meist von aktivierten Lymphozyten für ein robustes Wachstum und der Proliferation verwendet, da es mit einer hohen Versorgung an essentiellen, biosynthetischen Vorläufern für die Synthese von Nukleotiden, Aminosäuren und Lipiden assoziiert ist (Hume et al., 1978; Wang et al., 1976). Zur Deckung des erhöhten Energiebedarfs nehmen Lymphozyten Glukose aus der Umgebung auf (Nakajima und Van Houten, 2013).

Die Glukoseaufnahme erfolgt über einen energieunabhängigen Glukosetransporter entlang des Konzentrationsgradienten in die Zelle (Szablewski, 2013). Sie wird in Lymphozyten durch Glut-1 (Glukosetransporter 1) kontrolliert. Dabei ist er ein kritischer Faktor für die schnelle Proliferation und Zytokin Produktion (Macintyre et al., 2014; Michalek et al., 2011). Des Weiteren ist er für die basale Glukoseversorgung, für Pentosen und Hexosen sowie Vitamin C verantwortlich und regelt in den meisten Zellen Insulin-unabhängig die Glukoseaufnahme. Der Transport über die Blut-Hirn-

Schranke ist hierdurch ebenso möglich (Pardridge et al., 1990). Da eine hohe Affinität für Glukose besteht, ist Glut-1 unter physiologischen Bedingungen nahezu gesättigt. Unter diesen Bedingungen findet 80% der Glukoseaufnahme über die Glut-1, Glut-2 und Glut-3 Transporter statt. Die Evaluation der Glukose Aufnahme kann durch 2-Deoxy-D-Glukose (2-NBDG) in Echtzeit analysiert werden (Zou et al., 2005). Aktuelle Studien zeigen, dass eine Zytokin Stimulation von murinen aus Nieren (Donnelly et al., 2014; Salzberger et al., 2018) sowie humanen aus peripherem Blut stammenden NK-Zellen (Keating et al., 2016) eine hochregulierte Expression von Glut-1 sowie eine verstärkte Rate an Glykolyse, OXPHOS und IFN- $\gamma$  Produktion aufweisen. Indessen üben NK-Zellen die meisten Effektorfunktionen im Gewebe aus. Studien über NK-Zellen in Geweben werden dringend benötigt, um in der Zukunft die Funktion und Regulation dieser metabolischen Stoffwechselwege der NK-Zellen zu verstehen.

Metabolische Analysen humaner NK-Zellen deuten darauf hin, dass die Hochregulation sowohl der Glykolyse, als auch der OXPHOS als Antwort auf eine Zytokinstimulation mit einer IL-2 oder durch die Kombination IL-12/IL-15 (24 Stunden) erfolgt. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen, welche die Hauptproduzenten von IFN- $\gamma$  sind, metabolisch aktiver als die CD56<sup>dim</sup> NK-Zellen sind (Keating et al., 2016). Vor kurzem konnten Velásquez et al. zeigen, dass eine hypoxische Präinkubation der NK-Zellen und anschließender Stimulation mit IL-15 (sechs Stunden Priming) zu einer synergistisch vergrößerten Expression von glykolytischen Genen führt. Zusätzlich gilt, dass kurzfristiges Priming (sechs Stunden) mit IL-15 unter Hypoxie (1% O<sub>2</sub>) zur Hochregulation der Transkription von glykolytischen Genen (Kapitel 2.6, Abbildung 2 und Abbildung 3) führt und eine leichte Steigerung im glykolytischen Flux einhergehend mit einer erhöhten Sekretion der Chemokine CCL3/4/5 fördert (Velasquez et al., 2016). Jedoch wurden alle bisherigen Studien unter atmosphärischen Sauerstoffkonzentrationen (20% O<sub>2</sub>) durchgeführt und diese reflektieren nicht die physiologische Situation. Sowohl *in vivo* als auch *in vitro* aktivierte NK-Zellen und die damit verbundene Freisetzung von IFN- $\gamma$  sowie Granzyme B und Perforin Expression werden durch mTORC1 – abhängigen metabolischen Switch in Richtung Glykolyse reguliert (Donnelly et al., 2014). Ein Glukosemangel führt durch die verminderte Glukoseaufnahme zu einem niedrigeren Adenosintriphosphat (ATP)-Level. Dieser geringe ATP-Spiegel inhibiert mTOR1 (Sengupta et al., 2010). Die Produktion von proinflammatorischen Mediatoren während einer Sepsis kann eine Hyperglykämie auslösen. Diese ist hauptsächlich durch eine hepatozelluläre Insulintoleranz bedingt. Dabei modifiziert die Hyperglykämie inflammatorische und immunzelluläre Reaktionen und verstärkt die Produktion von reaktiven Sauerstoff-Spezies (Orban et al., 2006; Spolarics, 1996; Stevens et al., 2017; Vary et al., 1995). Die Überexpression von Glut-1 und ein erhöhter Glukosemetabolismus sind jedoch mit einer schlechten Prognose für onkologische Patienten assoziiert (Kunkel et al., 2003).

### 2.3.1 Oxidative Phosphorylierung und Stickstoffmonoxid

In einem infizierten, humanen Organismus treffen Pathogene auf einen variablen Sauerstoffpartialdruck. Inflammation ihrerseits erhöhen den Sauerstoffverbrauch in den betroffenen Geweben und fördern dadurch die Entstehung von Hypoxie. Als

Konsequenz müssen sich das Immunsystem und Pathogene an die rapiden Veränderungen in der Sauerstoffverfügbarkeit anpassen (Dietz et al., 2012).

Oxidative Phosphorylierung ist ein metabolischer Prozess in den Zellen, über den Adenosintriphosphat (ATP) unter Verbrauch von Sauerstoff generiert wird und dieser findet im Inneren der Mitochondrien-Membran statt. Während der OXPHOS fließen die Elektronen in Kaskaden durch eine Reihe in Membrankomplexen (I-V) gegliederte Redoxsysteme. Die hierdurch erzeugte protonenmotorische Kraft wird von der ATP-Synthase in Komplex V zur oxidativen Phosphorylierung genutzt (Horn, 2018). Ein Laborparameter zur Bestimmung der OXPHOS ist die reaktive Sauerstoffspezies ROS. Es entsteht als toxisches Nebenprodukt bei oxidativem Stress. Die mitochondriale Funktion kann über die Sauerstoff Verbrauchsrate (OCR) bestimmt werden. Eine leicht verstärkte ATP Konzentration und mitochondriale Aktivität wurde bereits in etlichen Studien gezeigt (Ferlazzo et al., 2004; Keating et al., 2016).

Stickstoffmonoxid (NO) kann die reguläre Funktion des Komplex V inhibieren. Generell beeinflusst NO eine große Bandbreite an regulatorischen Mechanismen und besitzt physiologische Bedeutung für das Kardiovaskuläre-, Immun- und Nervensystem (Moncada und Higgs, 1993; Moncada et al., 1991). NO ist durch seine Funktion als Signalmolekül, antimikrobielles Agenz und durch seine Effektorfunktionen für das angeborene Immunsystem in die Wirt-Pathogen-Interaktion involviert (Fang, 1997; Fortin et al., 2010). Darüber hinaus ist NO als lokal wirkendes Second Messenger Protein bekannt. NO erreicht durch Diffusion umliegende Zellen, und aktiviert dort durch Bindung unter anderem zytosolische Guanylylcyclasen (Ignarro, 1990). NO wird von der Stickstoffsynthase konvertiert. Drei Isoformen von NOS (nitric oxide synthase) werden unterschieden: endotheliales NOS (eNOS), neurales NOS (nNOS) und induzierbares NOS (iNOS). Die beiden Isoformen eNOS und nNOS sind  $Ca^{2+}$ -abhängig und werden kontinuierlich exprimiert, während iNOS  $Ca^{2+}$ -unabhängig ist und die Expression abhängig von Zytokinen und inflammatorischen Mediatoren ist. Es kann vasodilatatorisch auf das kardiovaskuläre System wirken (Leone et al., 1992). Deshalb wird es unter anderem für die Vorhersage von kardiovaskulären Erkrankungen und chronischen Nierenleiden herangezogen (Bode-Böger et al., 2006).

NO ist darüber hinaus der wichtigste Faktor zur Regulierung der mikrovaskulären Homöostase unter normalen Konditionen. Inflammatorische Stimuli wie Lipopolysaccharide, IL-1 $\beta$ , Makrophagen Migrations-inhibierenden Faktor (MIF) und IL-6 sind dafür bekannt, die mikrovaskuläre Homöostase durch iNOS-produziertes NO zu verändern (Su et al., 2007; Tymi et al., 2001; Wu et al., 2008). Veränderungen der Homöostase können zu einer verminderten Gewebe Perfusion führen, wie sie vor allem während einer Sepsis zu beobachten ist (Farquhar et al., 1996; Lam et al., 1994). Diese Reduktionen resultieren in einem veränderten Blutfluss mit Hypoxie im Gewebe und tragen damit wohl zusätzlich zu einem Multiorganversagen bei (Fortin et al., 2010). Die aktuelle Datenlage deutet daraufhin, dass eine Inhibition der NO Synthese im Kontext einer Sepsis zu einem verbesserten, klinischen Ausgang führt (Kilbourn et al., 1990; Meyer et al., 1992; Vasques-Nóvoa et al., 2018; Winkler et al., 2017). Jedoch ist auch zu beachten, dass eine NO Produktion vor allem in frühen Phasen der Sepsis zu einer effizienten mikrobiellen Elimination, aufgrund der Arginase-1 vermitteln Arginin Depletion, durch Phagozyten beitragen kann (Bode-Böger et al., 1996; Linares et al., 2001). Da es zu verheerenden Effekten bei absoluter Blockade von NO kommen kann,

sollte deshalb immer beide Wirkmechanismen berücksichtigt werden (López et al., 2004).

### 2.3.2 Zellzyklus und Zellproliferation

Viele Mediatoren, die im Rahmen einer Inflammation ausgeschüttet werden, haben auch Einfluss auf die Proliferation, Differenzierung und Repopulation von Zellen (Ferlazzo et al., 2003). Eine NK-Zell-Aktivierung kann nicht nur durch die Zytokine IL-12 (Ferlazzo et al., 2003; Strowig et al., 2008) und IL-15 (Ferlazzo et al., 2004) erfolgen, sondern auch durch IL-2, die zum Beispiel durch T-Lymphozyten freigesetzt wird. Diese fördern die Proliferation und erhöht die Zytotoxizität, vor allem von CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen (Carson et al., 1997; Yu et al., 2006). Im Allgemeinen kann die Proliferation der NK-Zellen auch unabhängig von Zytokinen durch direkten Zell-Zell-Kontakt mit dendritischen Zellen ausgelöst werden (Amakata et al., 2001). Bastian et al. konnten dahingehend zeigen, dass NK-Zellen direkt von bakteriellen Antigenen, wie *Mycobacterium tuberculosis*, aktiviert werden und verstärkt proliferieren (Bastian et al., 2008).

Im Jahr 1983 wurde auf der Suche nach einem Marker für die Proliferation und Zellaktivität der Antikörper Ki-67 gegen das Antigen Ki-67 entdeckt. Die Namensgebung geht dabei auf den 67. Antikörperklon einer in Kiel angesiedelten Versuchsreihe zurück (Gerdes et al., 1983). Gerdes et al. konnten zeigen, dass Ki-67 eine unterschiedliche Expression in den einzelnen, aktiven Phasen des Zellzyklus besitzt (Gerdes et al., 1984). Direkt nach der Mitose fällt die Ki-67 Proteinkonzentration von dem höchsten auf den niedrigsten Wert ab. Es ist daher wahrscheinlich, dass Zellen beim Übertritt aus der G<sub>0</sub> Phase in den Zellzyklus Ki-67 über eine *de novo* Synthese neu synthetisieren. Ein starkes Indiz für diese *de novo* Synthese ist der direkte Nachweis des Ki-67 Antigens während der G<sub>1</sub>-Phase im Zellkern (Scholzen und Gerdes, 2000; Trapani und Smyth, 2002). Der Antigennachweis in allen Phasen des Zellzyklus, abgesehen von ruhenden Zellen, ermöglicht eine Aussage über die Wachstumsfraktion, ohne jedoch eine genaue Aussage über die Wachstumsgeschwindigkeit zu treffen (Scholzen und Gerdes, 2000). 2006 wurde von Bullwinkel et al. ein Zusammenhang zwischen der Promotor- und Transkriptionsregion der rRNA beschrieben. Dieser lässt eine Funktion von Ki-67 für die rRNA-Synthese vermuten. Chromatin Immunpräzipitation (ChIP) Assays zeigen ebenfalls eine Assoziation von *pKi-67* mit dem Chromatin der Promotorregion und die transkribierte Region des rRNA Gencluster (Bullwinkel et al., 2006).

### 2.4 NK-Zell assoziierte Zytokine, Effektormoleküle und Chemokine

NK-Zellen reagieren durch eine Vielzahl an Keimbahn-kodierenden Rezeptoren direkt auf die Liganden infizierter oder neoplastischer Zellen (Burns et al., 2003). Die Integration der Signale, welche die NK-Zelle durch inhibierenden und aktivierenden Zellmembran-Rezeptoren erhält kontrollieren ihr Verhalten, wie beispielsweise ihre Fähigkeit Zielzellen zu eliminieren und weitere Zytokine freizusetzen. Diese Zytokine



und Chemokine schützen phänotypisch und funktionell unterschiedliche Subpopulationen der NK-Zellen gegen Infektionen oder Tumore und unterstützen dabei das adaptive Immunsystem dahingehend zu formen (Adam et al., 2004; Vivier et al., 2008).

Als Zytokine werden im Allgemeinen alle Proteine bezeichnet, die durch Zellen sezerniert werden und durch ihre Bindung an einen entsprechenden Zelloberflächen-Rezeptor eine Änderung innerhalb der Zelle, mit Verstärkung oder Blockade eines Effektormechanismus auslösen können (Berg et al., 2018). Diese Wirkung kann durch ein einzelnes Zytokin oder durch eine Kombination aus mehreren Zytokinen bestehen und sowohl inhibierend als auch aktivierend sein. Eine Interaktion zwischen Immunzellen des Wirtes und inflammatorischen oder entarteten Zellen sorgen für die Produktion diverser Mediatoren (Cavaillon, 2001). In Folge der Aktivierung der Produktion kommt es innerhalb weniger Stunden zu einem Anstieg von pro- und antiinflammatorischen Zytokinen (Degli-Esposti und Smyth, 2005; Mortier et al., 2008). Interleukine formen eine Unterklasse der Zytokine, die als Kommunikationssignale zwischen den verschiedenen Leukozytenpopulationen dienen. Die Interleukine werden zur Differenzierung mit Nummern versehen (Adam et al., 2004).

#### 2.4.1 Proinflammatorische Zytokine

Interleukin-2 ist für die Förderung der Differenzierung und Proliferation von T-Helferzellen, B-Zellen und NK-Zellen bekannt, weshalb es auch als Wachstumsfaktor bezeichnet wird (Reinhard et al., 2016). Darüber hinaus konnte für IL-2 bereits gezeigt werden, dass es die NK-Zell vermittelte Apoptose *in vitro* verstärken kann (Rosenberg et al., 1987). Der Einsatz von *ex vivo* expandierten autologen NK-Zellen gemeinsam mit IL-2 zur Therapie von Patienten mit hämatologischen Malignitäten und soliden Tumoren zeigte bisher nur eine eingeschränkte Wirkung (Burns et al., 2003). Darüber hinaus konnte jedoch nachgewiesen werden, dass der Transfer von zuvor mit IL-2 oder IL-15 alleine oder in Kombination expandierten allogenen NK-Zellen auf experimenteller Ebene ein effektiver Fortschritt in der Behandlung einiger Karzinome darstellt (Barkholt et al., 2009; Iliopoulou et al., 2010; Miller et al., 2005).

Interleukin-12 ist ein Peptidhormon und wird von Makrophagen, Monozyten und DCs sezerniert. Die wichtigste Funktion ist die Initiation und Prolongation der zellulären zytotoxischen Immunantwort, die meist durch ein Pathogen ausgelöst wird. Es handelt sich hierbei um ein proinflammatorisches Zytokin, da es die Proliferation von B-, NK- und T-Zellen fördert sowie die Produktion von IFN- $\gamma$  initiiert (Amakata et al., 2001; Bastian et al., 2008; Trinchieri, 2003; Watford et al., 2003). IL-12 konditionierte NK-Zellen induzieren eine starke zytolytische Aktivität gegen Tumorzellen oder fördern die Reifung von unreifen DCs. Der therapeutische Einsatz von IL-12 gilt experimentell als empfehlenswert, da es sich günstig auf den Verlauf von malignen Tumoren auswirkt (Marcenaro et al., 2005; Sivori et al., 2004).

Interleukin-15 ist ein multifunktionales immunregulatorisches Zytokin, welches mit verschiedenen Zellen interagieren kann und von diversen Zellen produziert wird (Strowig et al., 2008). Es wird vorwiegend von myeloiden Zellen freigesetzt. Dabei ist die Expression aufgrund der proinflammatorischen Eigenschaften engmaschig

reguliert. Es ist ein entscheidender Modulator zur Wirtsabwehr gegen intrazelluläre Pathogene, inklusive deren T-Zell Antworten, der Regulation der Gewebereparatur und der B-Zell Homöostase. Ebenfalls eine wichtige Rolle spielt IL-15 in der Entwicklung, Reifung, Homöostase, sowie bei Funktion von T-, B-, NK-, und NK-T-Zellen. Zusätzlich wird es mit zahlreichen Funktionen der B-Zellen, DCs, Mastzellen und Makrophagen in Verbindung gebracht (Trapani und Smyth, 2002). Die kurze Halbwertszeit sowie schlechte Bioverfügbarkeit limitieren jedoch den Einsatz als Therapeutikum. Eine zielgerichtete Therapie bei Inflammationen gegen den IL-15 Signalweg gerichtet könnte dennoch vorteilhaft sein (Patidar et al., 2016). IL-15 hat auf NK-Zellen hinsichtlich der Aktivierung, dem Überleben, sowie der Differenzierung einen kritischen Einfluss. Der wichtigste Aspekt ist dabei die Aufrechterhaltung der antiviralen Immunantwort durch die Regulation der IFN- $\gamma$  Produktion und NK-Zell Proliferation (Cooper et al., 2002; Huntington et al., 2009; Metkar et al., 2002).

Interleukin-18 wird von dendritischen Zellen, Makrophagen, Monozyten, T- und B-Lymphozyten, Neutrophilen und NK-Zellen exprimiert. IL-18 regt T-Helferzellen zur IFN- $\gamma$  Produktion und Lymphozyten zur Proliferation an. Sind IL-12 oder IL-15 in Kombination mit IL-18 vorhanden, so gilt IL-18 als potenter Induktor von IFN- $\gamma$  in NK-Zellen (Lusty et al., 2017). Interleukin-18 wird auch bei chronischen Entzündungen, Autoimmunkrankheiten und bei einer Vielzahl verschiedener Malignitäten sezerniert (Wawrocki et al., 2016). Durch das Priming mit IL-18 entwickeln NK-Zellen die Fähigkeit zur Migration in sekundäre lymphoide Organe (Fabbi et al., 2015; Mailliard et al., 2005)

#### 2.4.2 Antiinflammatorische Zytokine

Interleukin-4 ist ein Botenstoff mit antiinflammatorischen Eigenschaften. Die Hauptaufgabe liegt in der T-Zell-Kommunikation und führt zu Proliferations- und Differenzierungsreizen. Paganin et al. konnten beweisen, dass IL-4 zu einer Inhibition der NK-Zell-Adhäsion mit Zielzellen führt und es dadurch auch Einfluss auf Typ-2-T-Helferzelle Antworten ausübt (Paganin et al., 1994). Ebenso widerspricht IL-4 der Erwartung, murine NK-Zellen zu hemmen, sondern zeigt entgegen der Erwartung in Antwort auf IL-4 eine höhere IFN- $\gamma$  Produktion als nach Stimulation mit IL-10 oder GM-CSF (Kiniwa et al., 2016).

Interleukin-10 gehört ebenfalls zu den antiinflammatorischen Zytokinen, da es die Entzündungsreaktion hemmt (Grütz, 2005). Konträr kann es dadurch zur Immundefizienz mit erhöhtem Infektionsrisiko und gesteigerter Mortalität kommen (Moore et al., 2001). Zusätzlich hemmt es die proinflammatorischen Faktoren wie IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-12 und TNF- $\alpha$  (Mauri und Bosma, 2012). Nahezu alle Immunzellen inklusive Dendritischen Zellen, Makrophagen, Mastzellen, NK-Zellen, Eosinophilen, Neutrophilen, B-Zellen sowie Typ-1 und Typ-2-Helferzellen können IL-10 exprimieren (Maloy und Powrie, 2001). Dabei konnte jedoch gezeigt werden, dass IL-10 keinen Effekt auf die NK-Zell Proliferation hat (Mocellin et al., 2004).

Interleukin-13 ist sowohl funktionell als auch strukturell eng mit IL-4 verwandt. Weiter ist es ein Mediator der erworbenen Immunantwort, da es die Differenzierung von B-Zellen stimuliert. Diese Effekte sind wesentlich milder, als jene von IL-4. Darüber

hinaus inhibiert es die Aktivierung von Makrophagen (Gerdes et al., 1983; Scholzen und Gerdes, 2000; Schwarting, 1993). Die klinische Signifikanz liegt in der Änderung des infizierten oder inflammatorischen Mikromilieus und ermöglicht die gute Pathogenausbreitung (Bullwinkel et al., 2006). Eine Behandlung mit IL-13 führt zu einer komplexen Modellierung von NK-Zellen, inklusive einer sensitiven Aktivierbarkeit durch proinflammatorische Zytokine sowie zu einer dosisabhängigen Steigerung der IFN- $\gamma$  Produktion (Gerdes et al., 1984).

Tumor Growth Factor- $\beta$  ist ein wichtiges antiinflammatorisches Zytokin. Diese Funktion im Rahmen der Gewebereparatur und bei Fibrose (Sporn und Roberts, 1989) konnte ebenso, wie zur Sepsis-induzierten Immunsuppression gezeigt werden (Blobe et al., 2000). TGF- $\beta$  kann die Funktion von T-Zellen inhibieren, indem es die Sekretion von IL-2 und die T-Zell-Proliferation unterbricht, und simultan die Entwicklung von regulatorischen T-Zellen fördert (Gilbert et al., 1997; Wan und Flavell, 2008). Parrella et al. konnten zeigen, dass eine Behandlung mit TGF- $\beta$  die Endotoxin-induzierte Hypotonie blockiert, da es die hypotonen Effekte von NO unterbindet und damit das Überleben fördert (Perrella et al., 1996). Des Weiteren, konnte gezeigt werden, dass Patienten während einer Sepsis signifikant erhöhte TGF- $\beta$  Werte aufweisen (Marie et al., 1996). Der TGF- $\beta$  Spiegel scheint früh in der Progression der Sepsis ihren Peak zu erreichen und korreliert deshalb auch nicht mit der schwere oder der Verlaufsprognose (Zanotti et al., 2002). Jüngste Daten deuten darauf hin, dass TGF- $\beta$  zusätzlich einen kardioprotektiven Effekt während der Sepsis ausübt, da es die kardiale Myozytenkontraktion umkehrt (Kumar et al., 2007).

### 2.4.3 Effektormoleküle

Interferon- $\gamma$  wird primär von Lymphozyten und antigenpräsentierenden Makrophagen gebildet. Es zeichnet sich vor allem durch die immunstimulierende, antivirale sowie antitumorale Wirkung aus. Eine Bindung an den IFN- $\gamma$  Rezeptor leitet das Signal nach Aktivierung über den JAK-STAT-Signalweg weiter (Metkar et al., 2002). Die IFN- $\gamma$  Produktion dient dabei als Bindeglied zwischen Infektion und angeborener Immunantwort (Akira, 2000; Munder et al., 2001). Darüber hinaus spielt IFN- $\gamma$  eine zentrale Rolle in der NK-Zell vermittelten Aktivierung der myeloiden Zellen während einer Infektion oder einer Entzündung. Als Antwort auf proinflammatorische Zytokine sowie durch die direkte Aktivierung durch Tumorzellen, Virus-infizierte Zellen und mikrobielle Produkte sekretieren NK-Zellen große Mengen an IFN- $\gamma$  (Trapani und Smyth, 2002). Hierdurch verstärkt IFN- $\gamma$  antimikrobielle Funktionen und fördert die weitere Sekretion von IFN- $\gamma$ -induzierenden Zytokinen. Es unterstützt folglich einen positiven Feedback Loop, wodurch es noch umfassender die zytolytische Aktivität von NK-Zellen propagiert (Romero et al., 2010; Yagita et al., 2000).

Perforin ist ein zellabbauendes Protein und befindet sich in den zytotoxischen Granula von NK-Zellen und T-Zellen. Dabei kann Perforin schnell, effektiv und facettenreich den Zelltod von infizierten oder entarteten Zellen induzieren. Weiter kann es auch als Serglycin assoziiertes Effektormolekül an der Oberfläche der Zielzelle, als Bestandteil eines makromolekularen Komplexes, binden (Metkar et al., 2002). Bei Ausschüttung der Perforine bildet es in Anwesenheit von  $\text{Ca}^{2+}$  ein ringförmiges Polymer in der Membran der Zielzelle. Folglich kommt es zu einer Porenbildung in der Zellmembran

und ermöglicht das Eindringen der Apoptose auslösenden Granzyme (Smyth et al., 2001). Darüber hinaus, spielt Perforin eine entscheidende Rolle in der NK-Zell-vermittelten Suppression der Tumor Initiation und Metastasierung (Smyth et al., 2005; Trapani und Smyth, 2002).

Granzyme B ist, wie alle Granzyme, eine spezifische Serinprotease und ein kritischer Bestandteil der aus NK-Zellen stammenden lytischen Granula. Es agiert als potenter Initiator der Apoptose zur Aktivierung von Effektor Caspasen (Strowig et al., 2008). Der Eintritt erfolgt durch Rezeptor-vermittelte Endozytose über Poren, die zuvor durch Perforin gebildet wurden (Trapani et al., 1996). Aktiviertes Granzyme B initiiert in entarteten, transformierten oder infizierten Zellen einen indirekten DNA Abbau und leitet folglich die Apoptose ein. Granzyme B aktiviert die Caspase-abhängige Apoptose an multiplen Stellen im Apoptose Signalweg durch direkte Spaltung von Apoptose Initiator Caspase-8 und Caspase-3. Durch diese Aktivierung der Caspase-aktivierenden Desoxyribonuclease kann dann die DNA in der Zelle abgebaut und die Apoptose initiiert werden (Trapani et al., 1996; Trapani et al., 2000).

Das Trypsin Granzyme A spaltet vornehmlich Arginine und Lysine (Baker et al., 1994). Ebenso wie Granzyme B triggert Granzyme A in Gegenwart von Perforin einen nuklearen Schaden. Gemeinsam können sie auch synergieren und einen besonders drastischen Zelltod vermitteln (Shi et al., 1992). Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass Granzyme A auch Caspase-unabhängigen Zelltod auslöst. Durch die Spaltung von Laminen, der Generierung einzelsträngiger DNA Abschnitte und durch nicht oligonukleosomale DNA Fragmente wird dies propagiert (Beresford et al., 1999; Fan et al., 2003).

#### 2.4.4 Endothelwachstumsfaktor - Vascular Endothelial Growth Factor

Hinter der Bezeichnung VEGF verbirgt sich eine Gruppe von Signalmolekülen. Sie kommen in allen vaskulären Geweben des Menschen vor. Insgesamt existieren in dieser Gruppe sieben Heparin-bindende Glykoproteine und besitzen eine Größe zwischen 34–42 kD mit angiogenen und mitogenen Eigenschaften. (Bulut et al., 2004; Dvorak, 2002; Hicklin und Ellis, 2005). VEGF ist ein wichtiger Bestandteil für die Angiogenese, da es die Bildung von neuem Endothel fördert (Kowanetz und Ferrara, 2006). Darüber hinaus stimuliert es Makrophagen und Monozyten im Blutssystem. Im Rahmen des Stickstoffmonoxidkreislauf kann VEGF eine Vasodilatation begünstigen und somit eine Absenkung des Blutdrucks hervorrufen (Bates, 2010; Ku et al., 1993). In Phasen eines Heilungsprozesses, wie nach einer Kolitis oder Wundheilung, kommt es zu einer Hochregulation dieser Signalmoleküle (Bulut et al., 2004). In der Niere wird VEGF aufgrund der Hypoxie exprimiert und vermittelt dort in Kombination mit HIF-1 $\alpha$  eine Angiogenese (Ellis und Hicklin, 2008; Rafii et al., 2002).

### 2.4.5 Chemokine

Chemokine sind kleine, chemotaktische Zytokine, die Leukozyten durch Interaktion mit spezifischen Transmembran, G Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCR) zum Ort der Inflammation navigieren (Palomino und Marti, 2015). Die endokrine Aktivität von NK-Zellen bleibt auch in einer Vielzahl von Infektionen, Inflammationen und Autoimmunerkrankungen vital, da sie diese von freigesetzten Chemokinen erhalten werden.

CC-Chemokin Ligand 3 (CCL3, Macrophage inflammatory preotein-1  $\alpha$ , MIP-1 $\alpha$ ) kann von einer breiten Anzahl an aktivierten Zelltypen inklusive Makrophagen, dendritischen Zellen (DC), Lymphozyten und Endothelzellen produziert werden (Maurer und von Stebut, 2004). Deshalb kann es auch als inflammatorisches Chemokin sowie als Mediator für entzündungsfördernden und Zell-inhibierenden Funktionen bezeichnet werden (Cook, 1996). Die chemotaktische Funktion richtet sich vor allem gegen Immunzellen, inklusive NK-Zellen, unreife DC, aktivierte T-Zellen, Monozyten, Makrophagen und Granulozyten (Neutrophile, Eosinophile und Basophile) (Fisher et al., 1999). Die Zellen werden durch die Bindung von CCL3 aktiviert, die aus einer lokalen, inflammatorischen Antwort resultiert (Maurer und von Stebut, 2004). CCL3 unterstützt bei der Antigen-spezifischen Aktivierung von zytotoxischen T-Helferzellen und NK-Zellen (Menten et al., 2002; Trifilo et al., 2003). Darüber hinaus kann es die Synthese und Freisetzung anderer proinflammatorischer Zytokine wie IL-1, IL-6 und TNF- $\alpha$  durch Fibroblasten und Makrophagen induzieren. Vor allem bei NK-Zellen fördert es die Sezernierung von IL-12, IL-1 $\beta$ , IL-10 oder TNF- $\alpha$ , sowie geringe Mengen an CCL3. Die alleinige Stimulation mit IL-15, resultiert in einer mäßigen Produktion von CCL3 (Velasquez et al., 2016). Dadurch trägt die Produktion von CCL3 durch NK-Zellen entscheidend zur innaten Immunantwort während einer Infektion bei (Bluman et al., 1996). Die Synthese von CCL3 wird unter anderem durch bakterielle Toxine stimuliert (Sherry et al., 1988). Darüber hinaus kann CCL3 jedoch auch die Proliferation von hämatopoetischen Vorläuferzellen im Knochenmark negativ regulieren und im Gegensatz parallel die Homöostase fördern (Cook, 1996; Staversky et al., 2018). CCL3 ist wichtig für die Chemotaxis und die Immunantworten bei Infektionen und Entzündungen (Sherry et al., 1988). Humanes CCL3 bindet an den CC-Chemokin Rezeptor (CCR) 1 und CCR5. Zusätzlich ist CCL3 im Tumorgeschehen dafür bekannt, dass es die Tumor Progression stimuliert und die CCL3/CCR5 Achse kanzerogene Effekte fördert (Berahovich et al., 2006; da Silva et al., 2017; Sivina et al., 2011).

CCL4 (MIP-1 $\beta$ ) ist ein Chemokin der CC Familie und kann durch eine Vielzahl hämatopoetischer Zellen unterschiedliche Funktionen im Immunsystem ausüben (Makrophagen, DC sowie B- und T-Zellen) (Robertson, 2002). Weiter kann CCL4 ausschließlich an CCR5 binden (Berahovich et al., 2006). Es fördert darüber hinaus die chemotaktische Migration von Monozyten und Lymphozyten (Schall et al., 1993).

CCL5 (RANTES, regulated upon activation, normal T cell expressed, and secreted) fördert die Infiltration der NK-Zellen während einer akuten oder chronischen Inflammation mittels CCR1 in der Leber. CCR1 wird direkt von NK Zellen exprimiert (Loux et al., 2010). CCL5 kann sowohl von Stromazellen, als auch von entarteten Zellen sekretiert werden (Borsig et al., 2014). Zusätzlich ist CCL5, neben Eotaxin (CCL11), eine der wichtigsten Mediatoren für verschiedene immunologische Störungen, da sie potente Chemoattrakte für inflammatorische Zellen wie Eosinophile,

Basophile, NK-Zellen, T-Helferzellen und Monozyten sind (Alam, 1997; Alam et al., 1993; Lloyd et al., 2000). Das entzündungsfördernde Chemokin wurde primär durch seine Fähigkeit zur Induktion von Leukozytenbewegungen entdeckt (Schall et al., 1990). Zusätzlich ist eine verstärkte CCL5 Sekretion mit chronischen Entzündungen, wie Rheumatoider Arthritis und Malignitäten assoziiert. CCR1, CCR3, CCR4 und CCR5 sind funktionelle Rezeptoren mit der Affinität zur Migration entlang eines CCL5 Gradienten (Berahovich et al., 2006; Juremalm et al., 2002).

CCR5 (C-C Chemokin Rezeptor 5) dient in dieser Dissertation als Beispiel für alle verwendeten G-Protein-gekoppelten Transmembranrezeptoren. Der CCR5-Rezeptor gehört zur Unterfamilie der G-Protein-gekoppelten Chemokinrezeptoren und wird auf Makrophagen, Antigenpräsentierenden Zellen, aktivierten T-Zellen und NK-Zellen exprimiert. Als natürliche Liganden des CCR5-Rezeptors gelten die Chemokine CCL3, CCL4, CCL5 und CCL8. Kommt es zu einer Entzündungsreaktion, so werden die CCR5 Liganden freigesetzt. Diese Sekretion führt zu einer Aktivierung der Effektorzellen. Makrophagen, Monozyten und T-Zellen antworten mit der Ausschüttung weiterer Chemokine und resultieren konsequenterweise in einer Signalverstärkung (Lederman et al., 2006; Scurci et al., 2018). Der CCR5-Rezeptor spielt eine wichtige Rolle in der Chemotaxis der Leukozyten hin zum Ort der Entzündung (Spagnolo et al., 2005).

## 2.5 NK-Zellen in humaner Sepsis

Die Erkenntnisse über NK-Zellen während einer Sepsis beruhen vornehmlich auf Daten aus peripherem Blut. Humane natürliche Killerzellen repräsentieren 5-15% der Gesamtymphozyten Population im peripheren Blut, wobei sie in zwei distinkte Populationen, CD56<sup>bright</sup> und CD56<sup>dim</sup>, unterteilt werden können (Cooper et al., 2001). Während der Sepsis kommt es zu zahlreichen Veränderungen in der Anzahl, dem Phänotyp und der Funktion von NK-Zellen (Forel et al., 2012). Dabei fokussierten sich die Mehrzahl der bisherigen Studien auf die frühe, initiale Phase der Sepsis. Analysen haben gezeigt, dass periphere NK-Zellen zum Zeitpunkt oder kurz nach der Diagnose der Sepsis sowie bei Aufnahme auf die Intensivstation in der Anzahl sowie der Aktivität der humanen NK-Zellen, mit einer hohen Expression an TLR-2/4/9 sowie CD69 im Vergleich zu Probanden assoziiert sind (Souza-Fonseca-Guimaraes et al., 2012). Zeitgleich war ein Anstieg der Konzentrationen, der unter anderem von NK-Zellen gebildeten Zytokine und Effektormoleküle, von Granzyme A und B, INF- $\gamma$ , und IL-12p40 im Vergleich zu gesunden Probanden zu vermerken (Chiche et al., 2011; Ferlazzo et al., 2003; Giamarellos-Bourboulis et al., 2006; Strowig et al., 2008). Die zugrundeliegenden Mechanismen sind bis heute noch nicht vollständig geklärt. Jedoch deuten einige Daten darauf hin, dass ein Zusammenhang zu einer gesteigerten Homöostase, verstärkten Rekrutierung aus sekundären lymphatischen Organen sowie eine Proliferation als Antwort auf Zytokine und mikrobielle Stimulation bestehen könnte (Guo et al., 2018).

Die Funktion von NK-Zellen zeigt konträre Auswirkungen. Zum einen können sie sehr schnell Infektionen eliminieren und somit die Entzündung auflösen und zum anderen aber auch exzessive systemische Entzündungen fördern. Somit bleibt weiterhin unklar, welche Effekte zirkulierende NK-Zellen in unterschiedlichen Studien der Pathogenese

der akuten Sepsis wiederfahren. Bislang wurden die Effektorfunktionen noch nicht voll umfänglich analysiert. Einige Studien zeigten während der frühen Phase der Sepsis eine Reduktion der NK-Zellzahl sowie der IFN- $\gamma$  Produktion in Kombination mit einer Dysfunktion anderer Immunzellen (Gerdes et al., 1983). Dies deutet daraufhin, dass sich seitens des Wirts eine Immunsuppression entwickelt (Chiche et al., 2011; Forel et al., 2012). Gleichzeitig konnte dokumentiert werden, dass es zu einem anhaltenden Abfall der NK-Zellzahlen binnen der ersten vierzehn Tage einer Hospitalisierung, vor allem bei Gram-negativen im Vergleich zu Gram-positiven Infektionen, während einer Sepsis kommt (Holub et al., 2003). Der zugrundeliegende Mechanismus konnte bisher nicht abschließend geklärt werden. Es ist jedoch davon auszugehen, dass eine gesteigerte Apoptose zu diesem Phänomen beiträgt. Zudem konnten gezeigt werden, dass bereits vier bis sechs Stunden für eine schnelle Migration hin zu dem Infektionsherd ausreichen (Gismondi et al., 2003; Li et al., 2015).

## 2.6 Transkriptom- und Pathwayanalysen von NK-Zellen aus Patienten mit SIRS und Sepsis

Im Rahmen einer Studie zur Differenzierung von SIRS und Sepsis bei Intensivaufnahme wurde in unserer Arbeitsgruppe zwischen 2012 und 2015 das globale Transkriptom von NK-Zellen aus diesen Daten verglichen (Holger Lindner, Doreen Killian und Carsten Sticht, unveröffentlichte Daten). Der Ablauf zur Probenvorbereitung für die Mikroarray Analysen ist in Abbildung 2 beschrieben.

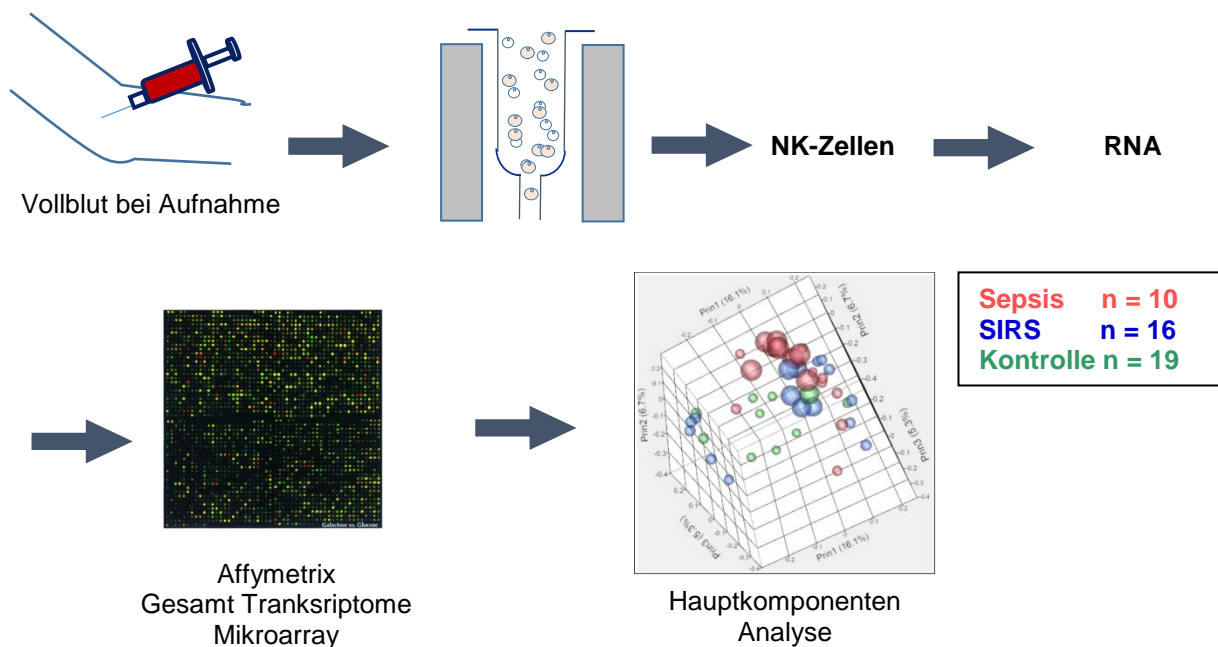


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Transkriptomanalyse.

NK-Zellen wurden aus Patienten mit SIRS und Sepsis sowie präoperativen Kontrollen aus peripherem Blut isoliert für das globale Transkriptomprofiling verwendet. Der Fokus liegt auf signifikant regulierten Pathways, welche den NK-Zellen zugeschrieben werden können. Die weitere Analyse basiert auf Hauptkomponenten Analysen. In rot dargestellt sind Patienten mit einer Sepsis (n=10), in blau die Patienten mit SIRS (n=16) und in grün die präoperativen Kontrollen (n=19). Die False Discovery Rate (FDR)  $q$  Value  $\leq 0.05$ .

Die Ergebnisse zeigen in einigen Signalwegen einen starken Kontrast zwischen SIRS und Sepsis Patienten. Sie waren konsistent und positiv mit der Expression von Genen, die mit der zellulären Atmung, den DNA Reparaturwegen, sowie dem Zellzyklus assoziiert. Zusätzliche Auswertungen und Untersuchungen aus Vorarbeiten, mittels der Kyoto Encyclopedia of Genes, tendierten hauptsächlich zu fünf veränderten Signalwegen bei Sepsis gegenüber SIRS. Diese sind Zellzyklus, oxidative Phosphorylierung, Fanconi Anemia Pathway, Pyrimidine Metabolismus und DNA Replikation. Eine besondere Häufung der Signalwege kommt im Bereich der DNA Reparatur und beim Überleben der NK-Zellen vor (Abbildung 3). Roh- und normalisierte Microarray Daten wurden in der NCBI Gen Expression Omnibus hinterlegt und sind durch die GEO Serien Zugangsnummer GSE123731<sup>1</sup> verfügbar.

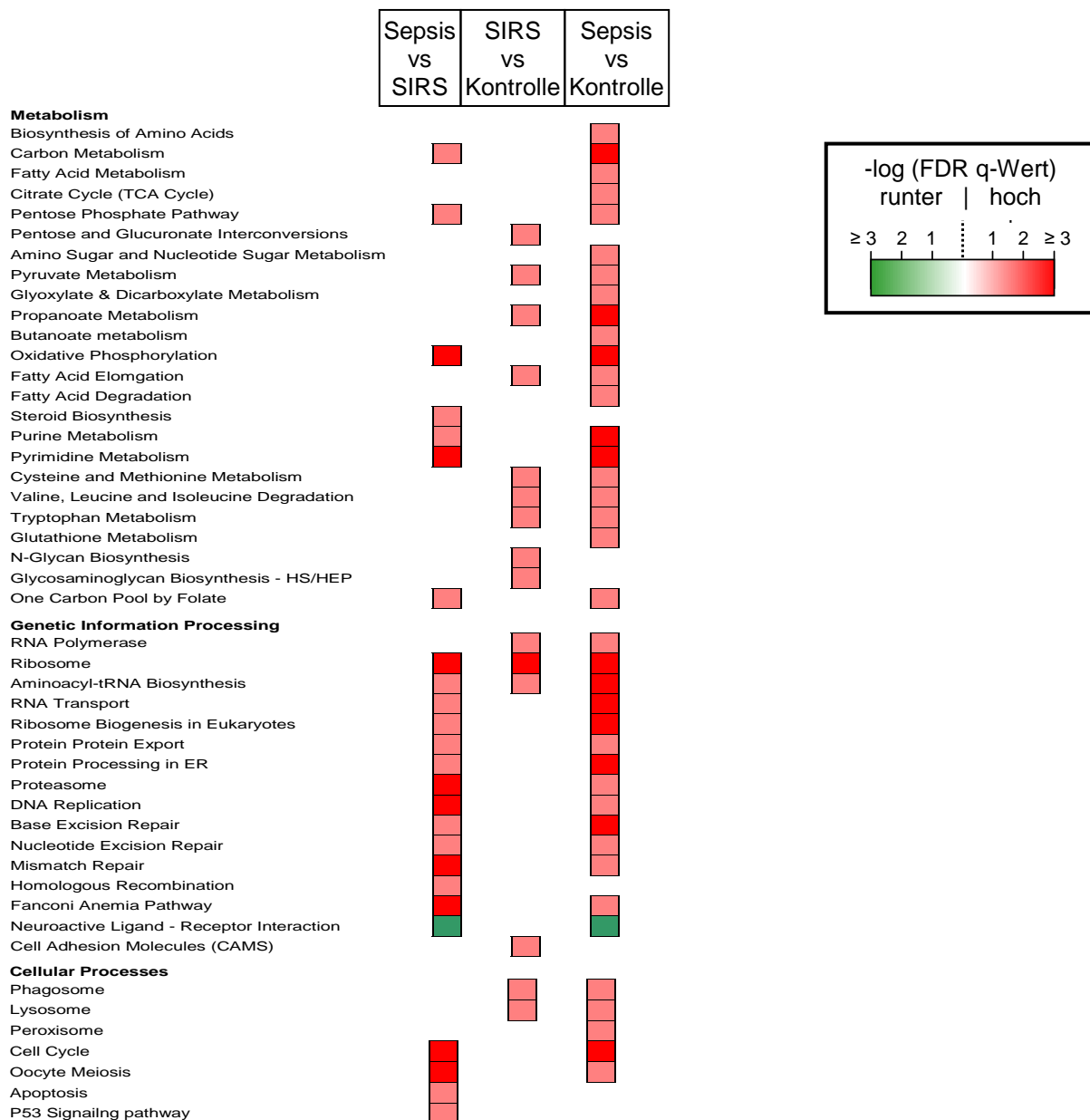


Abbildung 3: Die Gen Set Enrichment Analysen mittels kanonischen KEGG Signalwege-Analysen der Mikroarraydaten aus Vorarbeiten vergleichen Patienten mit SIRS und Sepsis bei Intensivaufnahme sowie präoperativen Kontrollen.

<sup>1</sup> <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE123731>



GSEA wurde für die KEGG<sup>2</sup> Pathways angewendet. Der  $-\log_{10}$  der FDR-adjustierten Wahrscheinlichkeiten (FDR q-Werte) der angereicherten Signalwege unter einem 0,05 Schwellenwert für mindestens einer der drei beschriebenen Vergleichsgruppen ist auf einer Farbskala mit grün für die negativen und mit blau für die positiven assoziiert.

## 2.7 Messprinzipien

### 2.7.1 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie (FACS, fluorescence activated cell sorting) ist eine lasergestützte Methode zur Bestimmung der Lichtstreuungs- und Fluoreszenzeigenschaften von Partikeln (Zellen, Kunststoffpartikeln, etc.) in einem Flüssigkeitsstrom. Unterschiedliche Zelltypen und Populationen können durch Anfärbung mit spezifisch gegen Antigene gerichtete und fluoreszenzmarkierte Antikörper Oberflächenantigene, intrazellulärer Antigene und Rezeptoren differenzieren und nach definierten Kriterien aus der Gesamtpopulation unterschieden werden. Die Zellen passieren verschiedene Laser mit unterschiedlichen Anregungswellenlängen. Die Emissionswellenlängen können ihrerseits die Antikörper-gekoppelten Fluorophore anregen. (Bruhn et al., 2008; Luttmann et al., 2014; Sack, 2016). Im Kontext dieser Arbeit wurde die Durchflusszytometrie für die Analyse des Metabolismus sowie für Effektorfunktionen verwendet.

### 2.7.2 Metabolische Flussanalyse

#### 2.7.2.1 Messprinzip

Seahorse Extracellular Flux Analyzer XF (Seahorse Bioscience) ermöglicht eine Bestimmung der Sauerstoffverbrauchsrate (Oxygen Consumption Rate; OCR) und der Azidifizierungsrate (Extracellular Acidification Rate; ECAR) im Medienüberstand wachsender, lebender Zellen über die Zeit. Durch die Injektion verschiedener Substrate und Inhibitoren kann auf die Aktivität verschiedener Stoffwechselwege hin rückgeschlossen werden. Die Zellen können Glukose und O<sub>2</sub> aus dem Kulturüberstand aufnehmen, um ihren Energiestoffwechsel zu betreiben und ATP zu generieren. Der O<sub>2</sub>-Verbrauch, der pH-Wert, der Laktatgehalt und der CO<sub>2</sub>-Gehalt werden konstant gemessen, woraus sich der ECAR berechnen lässt. Er dient als Indikator der glykolytischen Aktivität über die gemessene Zeit. Der OCR hingegen dient als Indikator für die mitochondrialen Atmung (AgilentTechnologies, 2018; Kramer und Darley-Usmar, 2015). Die Vorteile einer extrazellulären Flussanalyse liegen in der reduzierten Probengröße und der verbesserten kinetischen Auflösung (Ferrick et al., 2008).

---

<sup>2</sup> <https://www.genome.jp/kegg/>

### 2.7.2.2 Glykolyse Stress Test

Der Glykolyse Stress Test (Agilent Seahorse XFp Glycolysis Stress Test Kit) ist eine Standard Untersuchung für die Messung der glykolytischen Funktion in Zellen (siehe Kapitel 4.10.11.1). Durch die direkte Messung der ECAR bietet der Glykolyse Stress eine Möglichkeit zur Bestimmung der wichtigsten Parameter des glykolytischen Flusses: Glykolyse, glykolytische Kapazität und glykolytischer Reserve, ebenso wie die nicht-glykolytische Azidifizierung bestimmt. In einheitlichen Zeitabständen werden (A) Glukose, (B) Oligomycin und (C) 2-Deoxy-Glukose (2-DG) gemessen. Die Zugabe einer sättigenden Konzentration an Glukose bewirkt eine Aufnahme und Verstoffwechselung der Glukose zu Pyruvat und damit einhergehend eine ATP Produktion sowie ein Anstieg des pH-Wertes, wodurch ein Anstieg des ECAR erfolgt. In einer zweiten Injektion wird Oligomycin, ein Inhibitor der ATP-Synthase, hinzugegeben. Dadurch wird die mitochondriale Atmung gehemmt und es kommt zu einer kompletten Verschiebung der Energieproduktion hin zur Glykolyse. Der Anstieg des ECAR lässt auf die maximale glykolytische Kapazität schließen. In der finalen Injektion wird 2-DG, ein kompetitiver Inhibitor der Glukose-Hexokinase, injiziert. Dadurch wird die Glykolyse beendet. Der Abfall der ECAR lässt die glykolytische Reserve der Zellen berechnen und bestätigt, dass die produzierte ECAR auf der Glykolyse beruht (Agilent, 2017a).

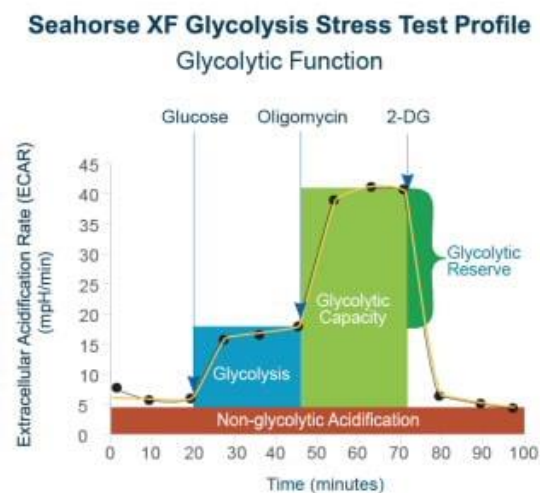


Abbildung 4: Agilent Seahorse XFp Messprinzip Glycolysis Stress Test.

Messung der basalen Glykolyse und glykolytischen Kapazität nach Blockade der mitochondrialen ATP Produktion unter respiratorischen Modulatoren. Nicht-glykolytische Ansäuerungsrate wurde durch das Hungern von Glukose errechnet (Agilent, 2017a). Mit freundlicher Genehmigung von Agilent.

### 2.7.2.3 Mito Fuel Flex – Analyse der Kohlenstoffquelle

Mito Fuel Flex Test ist eine Methode zur Messung des mitochondrialen Kohlenstoffquelle in lebenden Zellen (siehe Kapitel 4.10.11.2). Dieses Kit misst die Abhängigkeit, Kapazität und Flexibilität des Verbrauchs von einem der drei mitochondrialen Energiequellen: Glukose (Pyruvat), Glutamin (Glutamat) und langkettigen Fettsäuren in lebenden Zellen. Der Mito Fuel Flex Test bestimmt die Rate

der Oxidation für jede Energiequelle durch die Messung der mitochondrialen Atmung (OCR; Sauerstoffverbrauchsrate) in Anwesenheit und Abwesenheit verschiedener Inhibitoren, welche die Stoffwechselwege blockieren, gemessen. Bei den Inhibitoren handelt es sich um UK5099, Etomoxir und BPTES (Bis-2-(5-phenylacetamido-1,3,4-thiadiazol-2-yl) ethyl sulfide). Abbildung 5 zeigt die Injektionszugaben zur Inhibitoren innerhalb des Stoffwechsel der Zellen. Durch die Inhibitoren wird der Transport der Metabolite in die Mitochondrien inhibiert. Bei UK5099 handelt es sich um einen Inhibitor des mitochondrialen Pyruvat Carriers (Halestrap, 1975; Wang et al., 2018). Dieser Test nutzt Etomoxir als Inhibitor der langkettigen Fettsäureoxidation, indem es den Transport von Palmitat ins Innere der Mitochondrien inhibiert (O'Connor et al., 2018). Als Inhibitor des Glutamine Oxidation Pathways wird BPTES eingesetzt. BPTES hemmt die Verstoffwechslung von Glutamin zu Glutamat (DeLaBarre et al., 2011; Thangavelu et al., 2012; Thomas et al., 2013).

Der Mito Fuel Flex Test ermöglicht durch die sequentielle Injektion der Inhibitoren die Messung verschiedener Faktoren. Die Abfolge der Injektionen der Inhibitoren ermöglicht eine Aussage, wie stark die Zellen von jenem Stoffwechselweg abhängig sind.

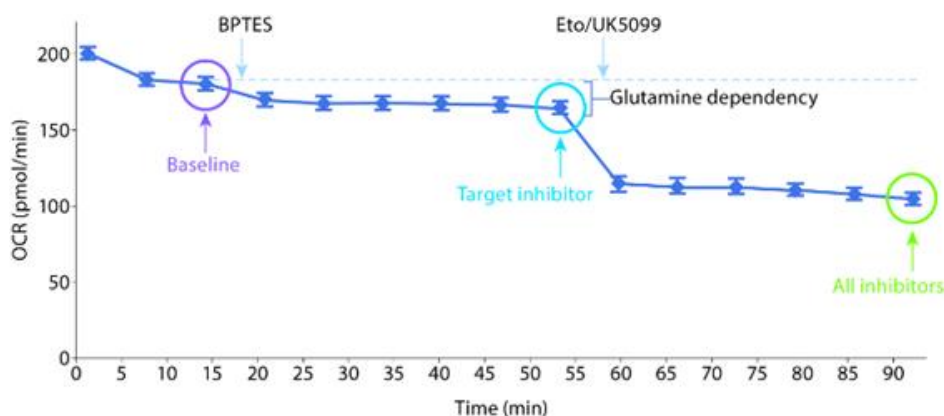


Abbildung 5: Agilent Seahorse XFP Messprinzip des Mito Fuel Flex Test.

Die erste Injektion zeigt die Einbringung des BPTES Inhibitors gefolgt von der konsekutiven Injektion von Etomoxir und UK5099 zur Bestimmung der Abhängigkeit von Glutamin (Agilent, 2017c). Mit freundlicher Genehmigung von Agilent.

Die Energie Abhängigkeit wird durch die erste Injektion des Inhibitors für den zu analysierten Zielsignalweg getestet. Folgend von zwei Inhibitionen von zwei alternativen Signalwegen. Die Abhängigkeit ist durch die oben gezeigte Gleichung kalkuliert. Im Zuge dieser Arbeit wurde die Glukose-Abhängigkeit der NK-Zellen analysiert. Hierfür wurde zunächst die Glukose-Verstoffwechslung mit UK5099 gehemmt und im Anschluss die beiden anderen Stoffwechselwege.

Energie Kapazität ist durch Injektion des ersten Inhibitors der alternativen Signalwege analysiert, gefolgt durch die Inhibition des zu analysierenden Signalwegs. Die Bestimmung der Flexibilität verlangt zwei Gruppen: eine Abhängigkeitsgruppe und eine Kapazitätsgruppe. Energie Flexibilität ist kalkuliert als Differenz zwischen Kapazität und Abhängigkeit.

### 2.7.2.4 Mito Stress Test

Mito Stress Test Kit ist ein mitochondrieller Stress Test zur Messung der mitochondrialen Respiration mittels des Seahorse XF Analyzer. Der Test evaluiert die mitochondriale Atmung bei zeitgleicher Bestimmung der Schlüsselparameter der mitochondrialen Funktion (siehe Kapitel 4.10.11.3). Dabei wird die OCR der Zellen direkt durch Modulation der Atmung und der Komponenten der Elektronentransportkette bestimmt. Während des Tests wird die OCR zu konsekutiven Zeitpunkten (A) Oligomycin, (B) FCCP (carbonyl cyanide p-trifluoromethoxyphenylhydrazine) und (C) ein Mix aus Rotenon und Antimycin A in die Kultur injiziert. In einer ersten Injektion wird Oligomycin, ein Inhibitor der ATP-Synthase, hinzugegeben. Dadurch wird die mitochondriale Atmung gehemmt und es kommt zu einer kompletten Verschiebung der Energieproduktion hin zur Glykolyse. Dies ermöglicht die Bestimmung des Sauerstoffverbrauchs der ATP-Synthase respektive der ATP-Produktion unabhängig des natürlichen Protonenverbrauchs über die mitochondriale Membran.

In einem zweiten Schritt wird der ionophore FCCP injiziert, welcher einen Protonengradient über eine innere mitochondriale Membran durch die Atmungskette losgelöst. Die resultierende Depolarisation der inneren Membran erzeugt einen Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials, das einen rapiden Energie- und Sauerstoffverbrauch ohne ATP-Bildung verursacht. Der Anstieg der OCR erlaubt eine OCR Messung, welche die maximale Respirationsrate repräsentiert (Agilent, 2017c). Final wird ein Atmungsketteninhibitor (Antimycin A) und Rotenone injiziert. Dies resultiert in einer kompletten Hemmung der mitochondrialen Atmung sowie der ATP-Produktion, wodurch sich die respiratorische Kapazität, zur Fähigkeit der Anpassung von oxidativer Phosphorylierung bestimmen lässt (Cardenes et al., 2014; Fern, 2003).

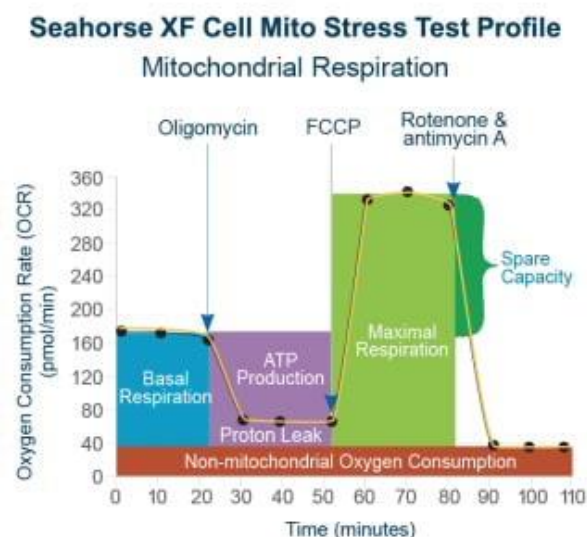


Abbildung 6: Agilent Seahorse XFp Zell Mito Stress Test Profile der wichtigsten Parameter der mitochondrialen Atmung.

Sequentielle Komponenten Injektion maß die basale Respiration, ATP Produktion, Protonenleck, maximale Respiration, respiratorische Kapazität und nicht-mitochondriale Atmung (Agilent, 2017b). Mit freundlicher Genehmigung zur Nutzung von Agilent.

### 3 FRAGESTELLUNG

Diese Dissertation dient zur Identifizierung von Sepsis-Biomarkern zur zuverlässigen Früherkennung einer Sepsis in Abgrenzung von einem SIRS. Die Bedeutung der frühen Phase der Immunzellaktivierung (Priming) ist bisher nur wenig verstanden.

Im Rahmen dieser Arbeit soll eine prospektive, vergleichende, nicht-interventionelle Analyse von NK-Zellen durchgeführt werden. Dies soll **(1) das Verständnis der pathologischen Prozesse im Übergang** zwischen steriler hin zu infektiöser systemischer Inflammation, i.e. SIRS versus Sepsis, verbessern und **(2) den Immunmetabolismus von gesunden NK-Zellen nach Priming** weiter aufklären.

Zu (1): Verständnis der pathologischen Prozesse im Übergang zwischen SIRS und Sepsis

Die zuvor ausgeführten Vorarbeiten an NK-Zellen aus dem peripheren Blut der Intensivpatienten mit SIRS und Sepsis legen nahe, dass diese Immunzellpopulation transkriptionell auf Proliferation und oxidativen Stoffwechsel eingestellt ist. Normalerweise besitzen die NK-Zellen im Blut keine ausgeprägte Fähigkeit zur Proliferation. Die Resultate der Vorarbeiten deuten auf funktionell und metabolisch veränderte NK-Zellen im Blut hin. Periphere NK-Zellen von Patienten mit SIRS und Sepsis sollen mittels etablierter molekularer Marker durchflusszytometrisch auf ihren Differenzierungszustand hin getestet werden. *In vitro* sollen ihre funktionellen und metabolischen Eigenschaften sowie deren Abhängigkeit vom Sauerstoffpartialdruck mittels Flussanalysen getestet werden. Weiter soll geprüft werden, ob funktionelle (Migration, Zytotoxizität und Zytokinproduktion) und metabolische Unterschiede vom Sauerstoffpartialdruck abhängen.

Zu (2): Immunmetabolismus von gesunden NK-Zellen nach Priming

Da inflammatorische Zustände ein lokales, hypoxisches Mikromillieu fördern, sollen isolierte NK-Zellen aus peripherem Blut der Probanden hinsichtlich ihres Metabolismus unter Priming Bedingungen analysiert werden. Ein besonderer Schwerpunkt liegt auf der Aktivität der Glykolyse unter IL-15 Priming. Vorarbeiten zeigen zwischen SIRS und Sepsis sowie unter Hypoxie und Priming, eine im Immunmetabolismus differenzielle Genexpressionssignatur. Dabei besteht für die Glykolyse eine Tendenz zur Steigerung. Diese Tendenz zur Steigerung soll mittels etablierter, molekularer Marker zum einen durchflusszytometrisch und zum anderen anhand von metabolischen Flussanalysen auf ihre Kohlenstoffquellen hin untersucht und analysiert werden.

## 4 MATERIAL UND METHODEN

### 4.1 Material

#### 4.1.1 Geräte, Verbrauchsmaterial und Reagenzien

Zur Erstellung dieser Dissertation verwendeten Geräte, Verbrauchsmaterialien und Reagenzien sind in den nachstehenden Tabellen zusammengefasst. Die Tabellen enthalten neben der Beschreibung zusätzlich den Herstellernamen sowie die Katalognummer.

Tabelle 1: Geräte Grundausstattung

<b>Geräte</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Katalognummer</b>
Absaugpumpe Vacusafe	INTEGRA Biosciences	158 320
CO <sub>2</sub> Inkubator Galaxy® 48 R, 0,1 – 19 % O <sub>2</sub> -Regelung	New Brunswick	CO48310041
Eppendorf ThermoMixer® C	Eppendorf	5382000015
Lichtmikroskop	Leica	090-135-001
Mikroplatten Leser Tecan Infinite® M200	Nano Quant	Infinite M200 NanoQuant
Multipipette M4	Eppendorf	4982000012
pH-Meter FiveEasy Plus FP20	Mettler Toledo	30266628
Pipettierhilfe Pipetus	Hirschmann	9907200
Pipette Research Plus Einkanal 2,5 µL; 10 µL, 100 µL, 1000 µL; 20 µL; 200 µL	Eppendorf	3123000012 3123000900 3124000040 3124000083
Ultraschallbad	Elma	S40
Vortex Genie 2	Scientific Industries	SI-0236
Wasserbad	Memmert	WNB22
Wärmeschrank	Benchmark Scientific	H2300-HC2*
Zentrifuge 5804R, 5810R	Eppendorf	5804R, 5810R

Tabelle 2: Allgemeine Verbrauchsmaterialien

<b>Verbrauchsmaterialien</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Katalognummer</b>
Alkopharm 80	BrüggemannAlcohol Heilbronn GmbH	6088000
Einweg Glas Pasteur Pipette	VWR	612-1702
Einweg Zell Schaber Falcon®	Corning	353085
Mikropipetten-Tipps (10, 20, 200 und 1250 µL)	Biozym	VT0200 VT0220 VT0230 VT0240 VT0270
Milliplex Filter 0,22 µm und 0,45 µm	Merck	SLHA033SS SLGP033RS
Monovetten mit EDTA (Ethylendiamintetraacetat) 1,2 mL, 3,4 mL, 4,9 mL und 9 mL	Sarstedt	06.1664.001 04.1914.001 04.1931.001 02.1006.001
Multiwell-Platten Suspension, flacher Grund, 6, 12, 24, 48, 96 Wells	Sarstedt	83.3920.500 83.3921.500 83.3922.500 83.3923.500 83.3925.500
Nitril ecoSHIELD Einweghandschuhe	Semperguard	743121
Parafilm Verschlussfolie	Parafilm M	PM-996
Perfusionsbesteck Vascuflow	Dispomed	46019
Perfusor Spritze 50 mL	Braun	8728810F
Pipettenspitze Combitip advanced 1, 2,5, 5 und 10 mL	Eppendorf	00300089.790 00300089.863 00300089.871 00300089.464
Reagenz Reservoir	Gilson	F267660
Reaktionsgefäß 0,5 mL, 1,5 mL und 2 mL	Eppendorf	0030123.301 0030120.086 00300120.094
Reaktionsgefäß Safe Lock 1,5 mL steril	Eppendorf	0030121.589
Safety Multifly® Kanüle	Sarstedt	85.1638.235
Serologische Polystyrol Pipetten (5 - 25 mL)	Sarstedt	86.1253.001 86.1254.001 86.1685.001
T-Zellkulturflaschen T25, T75	Sarstedt	83.3910.502 83.39141.002
Zentrifugen-Röhrchen Falcon® 15 und 50 mL	Corning	352196 352070

Tabelle 3: Allgemein verwendete Reagenzien

<b>Reagenzien</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Katalognummer</b>
-------------------	-------------------	----------------------

Antifekt N Liquid Desinfektionslösung	Schülke	23100-A
Dulbecco`s PBS (Phosphate buffered saline) (1x) ohne Ca & Mg	GIBCO Life Technologie	14190-094
Dulbecco`s PBS (Phosphate buffered saline) 10x	Sigma	RNBF6338
EDTA 0,5 M	Sigma	E7889-100mL
Ficoll-Paque™ PREMIUM	GE Healthcare	14004040-AF
Lysis Mixture Quantikine Sample	Invitrogen Thermo Fisher	14604
Nuclease freies Wasser	Ambion	AM9937
Trypanblau (0,4%)	Life Technologies	T10282
Xf Kalibrant	Agilent Technologies	10359-000
XF RPMI Basismedium pH 7,4	Agilent Technologies	103576-100
Wasser	Sigma	RNBF6963

Tabelle 4: Software zur Datenvisualisierung und Auswertung

Software	Hersteller
GraphPad Prism 8	GraphPad Software
SigmaPlot 14	Systat Software

#### 4.2 Geräte und Material für die Durchflusszytometrie

Im Verlauf dieser Dissertation, wurden die Durchflusszytometrie- (FACS) Proben zunächst mit einem FACS Canto II gemessen und ab Mai 2018 auf den FACS Lyric umgestellt. Die Qualität blieb durch tägliche Kalibrationen und Qualitätskontrollen konstant, sodass durch den Gerätewechsel keine Veränderungen entstanden. Dabei konnte die Software des Durchflusszytometers automatisch die Beads charakterisieren, nachverfolgen und die vorgenommenen Messungen dokumentieren (Wang und Hoffman, 2017).

Tabelle 5: Geräte für die Durchflusszytometrie

Geräte	Hersteller	Katalognummer
FACS Canto II	BD Bioscience	Canto II
FACS Lyric	BD Bioscience	Lyric



Tabelle 6: Verbrauchsmaterialien und Reagenzien zur Durchflusszytometrie

<b>Verbrauchsmaterialien und Reagenzien</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Katalognummer</b>
Ammoniumchlorid (NH <sub>4</sub> Cl)	Sigma-Aldrich	12125-02-9
Annexin V Binding Buffer, 10x	BD Biosciences	556454
BD Cytometer Setup & Tracking Beads	BD Biosciences	656504
BD Stainbuffer	BD Biosciences	554656
BD Trucount™ Tubes	BD Biosciences	340334
Cell FIX	BD Biosciences	340181
Cell Wash	BD Biosciences	349524
FACS Clean	BD Biosciences	340345
FACS Flow	BD Biosciences	342003
FACS Lysing Lösung	BD Biosciences	349202
FACS Shutdown Solution	BD Biosciences	334224
Falcon® 5 mL rund Boden Polypropylene Test Röhrchen	Corning	352008
Kaliumbicarbonat (KHCO <sub>3</sub> )	Sigma Aldrich	237205

Tabelle 7: Kits für die Durchflusszytometrie

<b>Kits</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Katalognummer</b>
BD Cytotfix/Cytoperm – Fixation/Permeabilization Kit	BD Biosciences	554714
BD GolgiPlug	BD Biosciences	51-2301KZ

Tabelle 8: Antikörperkonjugate sowie Reagenzien für die Analyse des Metabolismus und Proliferation

<b>Antikörperkonjugate</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Klon</b>	<b>Katalognummer</b>
CCR1 Alexa Fluor® 647	BD Biosciences	53504	557914
CCR3 PerCp Cy5.5	BD Biosciences	5E8	564189
CCR4 Alexa Fluor® 647	BD Biosciences	1G1	557863
CCR5 BV421	BD Biosciences	2D7/CCR5	562576
CD3 PerCP	BD Biosciences	SK7	345766
CD11b APC-Cy7	BD Biosciences	ICRF44	557754
CD11b FITC	BD Biosciences	ICRF44	562793
CD13 PE	BD Biosciences	L138	347406
CD14 BV421	BD Biosciences	MφP9	563743
CD14 BV510	BD Biosciences	MφP9	563079
CD15 APC	BD Biosciences	HI98	551376
CD16 APC-Cy7	BD Biosciences	3G8	557758
CD16 BV421	BD Biosciences	3G8	562874
CD16 PE-Cy7	BD Biosciences	B73.1	335823
CD19 APC-Cy7	BD Biosciences	SJ25C1	557791
CD27 APC	BD Biosciences	L128	337169

CD33 BV421	BD Biosciences	WM53	562854
CD33 PE	BD Biosciences	P67.6	345799
CD34 PE-Cy7	BD Biosciences	8G12	348811
CD45 V500	BD Biosciences	HI30	560777
CD45 PerCP	BD Biosciences	2D1	345809
CD49d PE	BD Biosciences	L25	340296
CD56 PE	BD Biosciences	NCAM16.2	345812
CD62L	BD Biosciences	SK11	347443
CD66 V450	BD Biosciences	G10F5	561649
CD71 BV510	BD Biosciences	M-A712	743305
CD117 APC-Cy7	biolegend	104D2	313228
HLA-DR V500	BD Biosciences	G46-6	561224
Ki-67 PerCP-Cy5.5	BD Biosciences	B56	561284
Lineage Cocktail FITC	BD Biosciences	L27 MφP9	643397
<b>Analyse Zellviabilität</b>	<b>Hersteller</b>		<b>Katalognummer</b>
7-AAD	BD Biosciences		559925
Annexin V APC	BD Biosciences		550475
<b>Reagenzien</b>	<b>Hersteller</b>		<b>Katalognummer</b>
2-NBDG	Life Technology		N13195
BODIPY FL C <sub>16</sub>	Life Technology		D3821
Cell ROX Deep Red Flow Cytometry Assay Kit	Life Technology		C10491
CytoTell™ Green Proliferationsfarbstoff	AAT Bioquest		2253
NOS Detection Kit	Cell Technologies		NOS-200-1
Violet Proliferation Dye	BD Biosciences		562158

Tabelle 9: Software zur Auswertung von Durchflusszytometriedaten

<b>Software</b>	<b>Hersteller</b>
FlowJo v10	FlowJo, LLC

#### 4.3 Geräte und Material zur Reinigung der NK-Zellen mittels magnetisch-aktivierter Zellsortierung

Die folgenden Tabellen beschreiben alle zur magnetisch-aktivierten Zellsortierung (MACS) benötigten Geräte und Reagenzien. Das Ursprungsmaterial bestanden aus humanem Vollblut oder Buffy Coats vom Deutschen Roten Kreuz-Blutspendedienst Baden-Württemberg, Institut für Transfusionsmedizin und Immunologie Mannheim.

Buffy Coats enthielten hauptsächlich Thrombozyten und Leukozyten sowie geringen Mengen restlichen Plasmas und Erythrozyten (Hoppe et al., 2014). Aus den PBMCs konnten mittels magnetisch-aktivierter Zellsortierung NK-Zellen gewonnen werden.

Tabelle 10: Geräte zur magnetisch-aktivierten Zellsortierung

<b>Geräte</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Katalognummer</b>
MACS Multi Stand	Miltenyi Biotec	130-042-303
Midi MACS Separator	Miltenyi Biotec	130-042-302
Mini MACS Separator	Miltenyi Biotec	130-042-102
Zellzähler Countness™ II	Thermo Fisher Scientific	AMQAX1000

Tabelle 11: Verbrauchsmaterialien und Reagenzien zur MACS

<b>Verbrauchsmaterialien und Reagenzien</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Katalognummer</b>
Dulbecco`s PBS (Phosphate buffered saline) (1x) ohne Calcium und Magnesium	GIBCO Life Technologie	14190-094
EDTA 0,5 M	Sigma	E7889-100mL
LD MACS Säulen	Miltenyi Biotec	130-042-901
LS MACS Säulen	Miltenyi Biotec	130-042-041
MACS BSA Rinderserumalbumin	Miltenyi Biotec	130-091-376
Monovetten mit EDTA 1,2 mL, 3,4 mL, 4,9 mL und 9 mL	Sarstedt	06.1664.001 04.1914.001 04.1931.001 02.1006.001
MS MACS Säulen	Miltenyi Biotec	130-042-201
Perfusionsbesteck Vasculflow	Dispomed	46019
Safety Multifly® Kanüle	Sarstedt	85.1638.235
Trypanblau (0,4%)	Life technologies	T10282
Zentrifugen-Röhrchen Falcon® 15 und 50 mL	Corning	352196 352070

Tabelle 12: Kits zur MACS

<b>Kit</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Katalognummer</b>
CD 3 MicroBeads	Miltenyi Biotec	130-050-101
CD14 MicroBeads	Miltenyi Biotec	130-050-201
CD15 MicroBeads	Miltenyi Biotec	130-046-601
CD19 MicroBeads	Miltenyi Biotec	130-050-301
CD56 MicroBeads	Miltenyi Biotec	130-050-401
MACS NK Cell Isolation Kit human	Miltenyi Biotec	130-092657

#### 4.4 Geräte und Verbrauchsmaterialien für die Zellkultur

Nach Reinigung der NK-Zellen wurden diese, sowie die leukämische Zelllinie K-652 als Zellkultur weitergeführt und für die metabolischen Analysen vorbereitet.

Tabelle 13: Geräte für die Zellkultur

<b>Geräte</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Katalognummer</b>
Absaugpumpe Vacusafe	INTEGRA Biosciences	158 320
CO <sub>2</sub> Inkubator Galaxy® 48 R, 0,1 – 19 % O <sub>2</sub> -Regelung	New Brunswick	CO48310041
Heracell 150 CO <sub>2</sub> Inkubator	Hearus	51026282
Sicherheitswerkbank Hera Save	Heraeus Instruments	51022790
Zellzähler Countness™ II	Thermo Fisher Scientific	AMQAX1000

Tabelle 14: Verbrauchsmaterialien für die Zellkultur

<b>Verbrauchsmaterialien</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Katalognummer</b>
Corning™ BioCoat™ Matrigel® Inversionskammer 8 µm	Corning	354480
Countess II Einweg-Zählkammern	Thermo Fisher Scientific	C10283
Einfrierhilfe CoolCell®	Corning	479-1842
Einweg Glas Pasteur Pipette	VWR	612-1702
Einweg Zell Schaber Falcon®	Corning	353085
Multiwell-Platten Suspension, flacher Grund, 6, 12, 24, 48, 96 Wells	Sarstedt	83.3920.500
		83.3921.500
		83.3922.500
		83.3923.500
		83.3925.500
Reaktionsgefäß 0,5, 1,5 und 2 mL	Eppendorf	0030123.301
		0030120.086
		00300120.094
T-Zellkulturflaschen T25 und T75	Sarstedt	83.3910.502
		83.39141.002

Tabelle 15: Reagenzien zur Zellkultur

<b>Reagenzien</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Katalognummer</b>
Dulbecco`s PBS (Phosphate buffered saline) 10x	Sigma	RNBF6338
Fetales Kälberserum (FBS)	Life Technologies	A3160402
L-Glutamin	Sigma	G7513-20ML
Nuclease freies Wasser	Ambion	AM9937
Nunc Cryotube Reaktionsgefäße	Thermo Fisher	377267
RPMI 1640 Medium (R8758-1L)	Sigma	R8758
RPMI 1640 Medium ohne Glucose	GIBCO Life Technologie	11879-020
Trypanblau (0,4%)	Life Technologies	T10282
Wasser	Sigma	RNBF6963

Tabelle 16: Zelllinien

<b>Zelllinie</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Katalognummer</b>
K-652 Zellen	Leibniz-Institut DSMZ	ACC 10

Tabelle 17: Rekombinante Proteine

<b>Humane Rekombinante Proteine</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Katalognummer</b>
humanes TGF- $\beta$	R&D Systems	240-B
Interleukin 10	Peprotech	200-04
Interleukin 10	Peprotech	200-10
Interleukin 12	Peprotech	200-12
Interleukin 13	Peprotech	200-13
Interleukin 15	Peprotech	200-15
Interleukin 18	Selekchem	SEL-S7483-10mm
MIP-1 $\alpha$ / (CCL3)	Peprotech	300-08
MIP-1 $\beta$ / (CCL4)	Peprotech	300-09
RANTES / (CCL5)	Peprotech	300-06
<b>Humane Monoklonale Antikörper</b>		
Neutralisationsantikörper anti - MIP-1 $\alpha$ (CCL3)	Life Technologies	PA54700
Neutralisationsantikörper anti - MIP-1 $\beta$ (CCL4)	Life Technologies	MA523713
Neutralisationsantikörper anti - RANTES (CCL5)	Life Technologies	MA523709

Tabelle 18: Agenzien zur Induktion chemischer Hypoxie

<b>Agenzien zur chemischen Hypoxie</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Katalognummer</b>
Dimethyloxaloylglycine (DMOG)	Calbiochem	CAS 89464-63-1
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma	D2438-10mL
HIF- Prolyl Hydroxylase Inhibitor II (1-(5-Chloro-6-(trifluoromethoxy)-1H-benzoimidazol-2-yl)-1H-pyrazole-4-carboxylic Acid; JNJ)	Calbiochem	CAS 1193383-09-3

#### 4.5 Geräte und Verbrauchsmaterialien zur metabolischen Flussanalyse

Die metabolischen Flussanalysen wurden im Rahmen dieser Arbeit aus primären NK-Zellen zur Analyse der verwendeten Kohlenstoffquelle durchgeführt. Nach der erforderlichen Vorbehandlung (Abbildung 13) wurden die Zellen im Seahorse Analyzer XFp untersucht.

Tabelle 19: Geräte zur metabolischen Flussanalyse

<b>Geräte</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Katalognummer</b>
Hypoxiekammer	Zentralbereich Neuenheimer Feld / Elektronik, Universität Heidelberg	
Seahorse XFp Analyzer	Agilent Technologies	XFp
Zellzähler Countness™ II	Thermo Fisher Scientific	AMQAX1000

Tabelle 20: Verbrauchsmaterialien zur metabolischen Flussanalyse

<b>Verbrauchsmaterialien</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Katalognummer</b>
Einweg Zell Schaber Falcon®	Corning	353085
Seahorse Sensorkartusche	Agilent Technologies	103-022-100
Seahorse Mini-Platte	Agilent Technologies	103-022-100

Tabelle 21: Reagenzien zur metabolischen Flussanalyse

<b>Reagenzien</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Katalognummer</b>
Trypanblau (0,4%)	Life technologies	T10282
Wasser	Sigma	RNBF6963
Xf 100mM Pyruvat	Agilent Technologies	103578-100
Xf 200mM L-Glutamine	Agilent Technologies	103579-100
Xf 1M Glukose	Agilent Technologies	103577-100
Xf Kalibrant	Agilent Technologies	10359-000
XF RPMI Basismedium pH 7,4	Agilent Technologies	103576-100

Tabelle 22: Kits zur metabolischen Flussanalyse

<b>Kit</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Katalognummer</b>
------------	-------------------	----------------------

XF Glycolysis Stress Test Kit	Agilent Technologies	103-017-100
XF Mito Fuel Flex Test Kit	Agilent Technologies	103-270-100
XF Mito Stress Test Kit	Agilent Technologies	103-010-100

Tabelle 23: Software zur metabolischen Flussanalyse

Software	Hersteller
Seahorse XFp Analyzer Software	Agilent
Seahorse Wave	Agilent

#### 4.6 Geräte und Verbrauchsmaterialien für Magnetic Bead Arrays

In den folgenden Abschnitten werden die benötigten Geräte und Materialien für die Magnetic Bead Arrays beschrieben. Hierunter fällt sowohl der Multiplex Genexpressionstest als auch der Multiplex Proteinanalyse Test.

Tabelle 24: Geräte zur Multiplex Analytik von Genen und Proteinen

Geräte	Hersteller	Katalognummer
MAGPIX® System	Luminex Corporation	MAGPIX

Tabelle 25: Reagenzien zur Multiplex Analytik von Genen und Proteinen

Reagenzien	Hersteller	Katalognummer
Nuclease-freies Wasser	Ambion	AM9937

Tabelle 26: Kits zur Multiplex Analytik von Genen und Proteinen

Kits	Hersteller	Katalognummer
Custom Premix Cyto/Chemokine MAG13	Merck Millipore	HCYTOMAG-60K-13C
Custom Premix Hu High Sen T Cell MAG15	Merck Millipore	HSTCMAG-28SK-15C
Multiplex Catalog Hu. Sep. Mag panel1	Merck Millipore	HSP1MAG-63K-04
Human Cyto MAG IV	Merck Millipore	HCYP4MAG-64K-03
Human CD8+T cell MAGNETIC	Merck Millipore	HCD8MAG-15K-03
TGF-beta 1,2,3 MAGNETIC Bead panel	Merck Millipore	TGFBMAG-64K-03
Human Angiogenesis MAG 2	Merck Millipore	HANG2MAG-12K-01
MAGPix Calibration Kit	Merck Millipore	MPX-CAL-K25
MAGPix Verification Kit	Merck Millipore	MPX-PVER-K25

#### 4.7 Geräte und Verbrauchsmaterialien für die Genexpressionsanalyse

Für die Genexpressionsanalyse wurden primäre NK-Zellen der Entdeckungsgruppe in RNAlater® gesammelt, mittels qRT-PCR amplifiziert und auf ihre patientenspezifischen Genexpressionssignaturen untersucht. In den folgenden Abschnitten wurden alle zur quantitativen Polymerase Kettenreaktion (qRT-PCR) benötigten Materialien gelistet.

Tabelle 27: Geräte für die Genexpressionsanalyse

Geräte	Hersteller	Katalognummer
2100 Bioanalyzer Instrument	Agilent	G2939BA
Thermocycler peqSTAR 2X Universal Gradient	Peqlab Biotechnologie	732-2889

Tabelle 28: Reagenzien für die Genexpressionsanalyse

Reagenzien	Hersteller	Katalognummer
Nuclease-freies Wasser	Ambion	AM9937
RNAlater®	Ambion	AM7020
TaqMan™ Fast Advanced Master Mix	Applied Biosystems	4444554

Tabelle 29: Kits für die Genexpressionsanalyse

Kits	Hersteller	Katalognummer
DNA-free™ DNA Removal Kit	Applied Biosystems	AM1906
High Capacity cDNA Reverse Transkriptase Kit mit RNase Inhibitor	Applied Biosystems	4374966
mirVana™ miRNA Isolation Kit	Thermo Fisher Scientific	AM1561
PureLink™ PCR Micro Kit	Invitrogen	K310250
TaqMan™ Gene Expression Assay	Applied Biosystems	4331182



#### 4.8 Medien, Puffer und Lösungen

Alle Prozentangaben beziehen sich auf das entsprechende Volumenprozent.

##### Medium für primäre NK-Zellen

R8758-1L RPMI-1640 Medium Sigma (#RNBF4123) angereichert mit 10 % FCS (Life Technologies; # A3160402)

##### Medium für K-652 Tumorzellen

R8758-1L RPMI-1640 Medium Sigma (#RNBF4123) angereichert mit 20 % FCS (Life Technologies; A3160402)

##### Medium für Extrazelluläre Glycolyse Stress Test Assays

XF RPMI-1640 pH 7,4 Medium Agilent Seahorse (#103676-100), pH7,4.

##### Medium für Extrazelluläre MitoFuel Flex und Mito Stress Flux Assays

XF RPMI-1640 Medium Agilent Seahorse (#103676-100) ohne Glucose und ohne Natriumbicarbonat, pH 7,4. Angereichert mit 2 mM Xf L-Glutamin (#10359-000), Xf 1M Glukose (#103577-100). Xf 100mM Natrium Pyruviat (#103578-100).

Tabelle 30: Lösungen

<b>Bestandteil</b>	<b>PBS+</b>	<b>PBS++</b>	<b>Erythrozyten-Lyse-Lösung (10 x)</b>
Dulbecco`s PBS (Phosphate buffered saline), pH 7,2	x	x	
Ammoniumchlorid NH <sub>4</sub> Cl			155 mM
Bidestilliertes Wasser			x
EDTA	2 mM	2 mM	0,1 mM
Kaliumbicarbonat KHCO <sub>3</sub>			10 mM
MACS BSA Stock Solution 10 %		25 mL	

Erythrozyten-Lyse-Lösung wurde in einer 1x Konzentration verwendet.

## 4.9 Methoden

### 4.9.1 Studienteilnehmer

Diese Studien wurden in der Klinik für Anästhesiologie und operative Intensivmedizin an der Universitätsmedizin Mannheim durchgeführt. Die Patienten befanden sich zum Zeitpunkt der Studienaufnahme auf den interdisziplinären Intensivstationen oder dem Aufwachraum der Klinik für Anästhesiologie und operative Intensivstation sowie auf der Intermediate Care-Wachstation der Chirurgischen Klinik. Die Studien wurden durch die Medizinische Ethikkommission II der Medizinischen Fakultät Mannheim, der Universität Heidelberg begutachtet und unter Einhaltung der Deklaration von Helsinki der Generalversammlung des Weltärzteverbandes (World Medical Association, WMA) genehmigt. Alle Studienteilnehmer, beziehungsweise ihre rechtlichen Betreuer, wurden konsequent über diese Studien aufgeklärt und gaben ihre informierte Zustimmung. Das Mindestalter lag bei 18 Jahren. Freiwilligen, gesunden Probanden wurde mittels Venenpunktion EDTA-antikoaguliertes Blut entnommen, jedoch wurden zur Kontrolle auch Buffy Coats vom Deutschen Roten Kreuz, DRK-Blutspendedienst, Baden-Württemberg, Institut für Transfusionsmedizin und Immunologie Mannheim käuflich erworben.

Ausschlusskriterien für beide Studien waren Schwangerschaft, Kardiopulmonale Reanimation, vorbestehende Glukokortikoid Therapie, terminale Niereninsuffizienz, Leberversagen, vorbestehende Organtransplantation oder maligne Erkrankung mit laufender oder weniger als sechs Monate zurückliegender Chemotherapie oder eine Strahlentherapie.

### Querschnittsstudie

Im Rahmen einer Querschnittsstudie wurden gemäß der Ethikvoten 2016-521N-MA unter dem Studienarzt Dr. med. Thomas Kirschning, D.E.S.A. MHBA (Entdeckungsgruppe) und 2018-607N-MA unter dem Studienarzt Dr. med. Franz-Simon Centner (Validierungsgruppe) durchgeführt. Bei Vorliegen eines ( $\leq 24$ h) post-traumatischen SIRS (Tabelle 31) oder Sepsis (Tabelle 32), gemäß der internationalen Sepsis Definition von 2001 (Levy et al., 2003) wurde venöses Blut abgenommen. Der SOFA Score (Spanne 0-24) (Vincent et al., 1996) wurde bei Aufnahme bestimmt. Patienten mit geplanten Eingriffen wurde im Rahmen der präoperativen Untersuchung eingeschlossen. Zwischen September 2016 und April 2017 konnte durch die Entdeckergruppe 22 SIRS und 23 septische Patienten rekrutiert werden. Während der Validierungsgruppe von Oktober 2018 bis Mai 2019 wurden 12 SIRS und 8 septische Patienten zu Validierungszwecken eingeschlossen.

### Längsschnittstudie

Gemäß dem Ethikvotum 2016-643N-MA unter Studienarzt Prof. Dr. med. Manfred Thiel lag bei den Patienten nach ärztlicher Diagnose bei Studienaufnahme ein vorstehendes SIRS für mindestens zwei Tage oder eine Sepsis vor. Über einen Zeitraum von 72h erfolgten im Zyklus von 8h in Summe bis zu 15 Blutabnahmen. Das EDTA-antikoagulierte Blut wurde zum Teil sofort analysiert. Das EDTA Plasma wurde

für spätere Analysen vorbereitet und nach Sammeln der gesamten Proben ausgewertet.

Eine Entblindung für die statistische Auswertung erfolgte erst nach abgeschlossener Experimentanalyse.

#### 4.9.2 Diagnosekriterien

Die Diagnose SIRS erfolgte bei Patienten auf der Basis von mindestens zwei der nachfolgenden vier Kriterien (Tabelle 31) (Levy et al., 2003).

Tabelle 31: Diagnosekriterien Systemisches Inflammatorisches Response Syndrom

<b>Kriterium</b>	<b>Parameter für Kriteriom Validität</b>
Herzfrequenz	> 90 Schläge / min oder ein Katecholaminbedarf >4h (dosisunabhängig)
Körpertemperatur	> 38,5°C oder < 35,5°C
Atemfrequenz	> 20/min oder PaCO <sub>2</sub> < 32mmHg oder Beatmung/Nicht-invasive Beatmungs - Therapie
Leukozyten	Leukozytose > 12000/μL oder Leukopenie < 4000/μL oder > 10% unreife Neutrophile im Differentialblutbild

Die Diagnose Sepsis erfolgte innerhalb dieser Arbeit, wenn zu dem diagnostizierten SIRS zusätzlich eine Infektion vorlag. Diese wurde entweder mikrobiologisch nachgewiesen, war klinisch gesichert oder es bestand zusätzlich zum SIRS die dringende Verdachtsdiagnose auf eine Infektion (Tabelle 32).

Sobald ein Patient mit Sepsis zusätzlich mindestens zwei der nachfolgenden Kriterien einer Organdysfunktion aufwies wurde dieser als eine schwere Sepsis diagnostiziert). Die Diagnose septischer Schock wurde gestellt, sobald eine schwere Sepsis mit einer Sepsis-induzierten Hypotension und einem Noradrenalin- oder Adrenalinbedarf  $\geq 0,1 \mu\text{g/kg/min}$  unter adäquater Volumentherapie<sup>4</sup> vorlag.

Tabelle 32: Diagnosekriterien der Organdysfunktion für die Sepsis

Kriterium	Parameter für Kriterium Validität
Sepsis-induzierte Hypotension	SBP <sup>3</sup> < 90mmHg oder MAP <sup>4</sup> <70mmHg oder Abfall des SBP $\geq 40\text{mmHg}$ Baseline <sup>5</sup>
Laktat	$\geq 2 \text{ mmol/L}$ <sup>3</sup>
Kreatininanstieg	1,5-1,9x von der Baseline (=KDIGO Stadium I) <sup>3,6</sup>
Urinausscheidung	< 0,5 mL/kg/h für 6-12h (=KDIGO Stadium I)
Akutes Lungenversagen	paO <sub>2</sub> /FiO <sub>2</sub> <sup>7</sup> < 250 in Abwesenheit einer Pneumonie, paO <sub>2</sub> /FiO <sub>2</sub> <sup>6</sup> < 200 bei Nachweis einer Pneumonie
Bilirubin	> 2mg/dL
Thrombozyten	< 100.000 $\mu\text{L}$ (Thrombozytopenie) oder Thrombozytentransfusion
Koagulation	INR <sup>8</sup> >1,5
Metabolische Azidose	pH < 7,35 und BE <sup>9</sup> < - 4mmol/L
Septische Kardiomyopathie	Herzindex (HI) < 3,0 L/min/m <sup>2</sup> oder Dobutamin-/Levosimendan-/Milrinontherapie (dosisunabhängig)

<sup>3</sup> SBP (systolic blood pressure) ist der systolischer Blutdruck

<sup>4</sup> MAP (mean arterial pressure) entspricht dem mittleren arteriellen Blutdruck

<sup>5</sup> unter adäquater Volumentherapie ( $\geq 30\text{mL/kg KG/h}$  oder negativer PLR (Körperpositionsmanöver))

<sup>6</sup> KDIGO (Kidney Diseases - Improving Global Outcomes) eine Definition und Klassifikation chronischer Nierenerkrankung

<sup>7</sup> paO<sub>2</sub> (arterieller Sauerstoff Partialdruck) /FiO<sub>2</sub> (inspiratorische Sauerstofffraktion)

<sup>8</sup> INR (International Normalized Ratio)

<sup>9</sup> BE (Base Excess; Basenabweichung)

#### 4.10 Vielfarben Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie ist eine lasergestützte Methode zur Bestimmung der Lichtstreuungs- und Fluoreszenzeigenschaften von Partikeln. Für die Messung wurden die Zellen mit Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelten Antikörperkonjugate versetzt. Diese Antikörperkonjugate banden an zelluläre Strukturen. Passierten die Zellen den Laserstrahl mit ihrer spezifischen Anregungswellenlänge wurde das emittierte Licht langwelliger und somit energieärmer. Die emittierte Photonenmenge war proportional zur Zahl der gebundenen Fluoreszenz-gekoppelten Antikörper und somit den Antigenen auf der Zelle. Die Durchführung einer FACS-Messung mit mehreren Fluoreszenzfarbstoffen wurde möglich, da die Anregungswellenlängen je Laser zwar identisch waren, aber jeder Farbstoff ein charakteristisches Emissionsspektrum zeigte. Bei Mehrfachfärbung musste auf spektrale Überlappungen der Emissionsspektren der verschiedenen Fluorochrome geachtet werden (Bruhn et al., 2008; Hallbach, 2011; Sack, 2016).

##### 4.10.1 Durchflusszytometrische Analyse des Vollblutes

Vollblut (100 µL) wurde in der Entdeckergruppe direkt entsprechend der gewünschten Oberflächen Phänotypisierung (Tabelle 33) mit den Antikörpern für 15 min im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde mit 2 mL 1× FACS Lysing für 10 min bei 25°C im Wärmeschrank lysiert. Final wurden die Proben zweimal mit 2 mL Cellwash bei 500 xg für 5 min gewaschen und in 300 µL Cellfix aufgenommen.

Für die quantitative Analyse wurden synthetisch fluoreszierende Mikrokügelchen (Beads) eingesetzt. Die Anzahl der Beads pro Volumeneinheit war bekannt und konnte vom Durchflusszytometer parallel registriert werden. Immunmarkierte Zellen ließen sich somit quantifizieren. Hierfür wurden 100 µL Vollblut mit 5 µL fluoreszenzmarkiertem Antikörperkonjugat in TruCount™ Tubes für 15 min bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Anschließend fand eine Zelllyse mit 900 µL 1× FACS Lysing für 10 min bei 25°C im Wärmeschrank statt. Die Zellen wurden nicht weiter gewaschen und waren direkt für die Messung geeignet. Zur Berechnung der absoluten Zellzahlen wurde die nachstehende Formel aus der Packungsbeilage der BD TruCount™ Tubes genutzt. Die Anzahl der Beads pro TruCount™-Röhrchen ist auf der Verpackung angegeben. Die Anzahl der gemessenen CD45<sup>+</sup> Zellen wurde durch die Menge der angegebenen Bead Events geteilt und mit der Anzahl der Beads pro Test je Testvolumen multipliziert.

Formel 1: Formel zur Berechnung der absoluten Zellzahl mittels TruCount™ Tubes

$$\begin{aligned} & \text{absolute Zellzahl} \\ & = \frac{\text{Anzahl i. d. Probe CD45}^{\text{positive}} \text{ Zellen}}{\text{Anzahl Bead Events}} \times \frac{\text{Anzahl der Beads pro Test}}{\text{Testvolumen}} \end{aligned}$$

Tabelle 33: Färbungen für Vollblut der Entdeckergruppe und der gesunden Kontrollgruppe

Kanal	TruCount™ Tubes	Vollblut Panel 7X			NK-Zell Differenzierung Vollblut		
		CD45 Kontrolle	CD45 Kontrolle	7x	WB 6x	FMO – CD34 (PE-Cy7)	FMO – CD45 (V500)
FITC				CD3 10 µL	CD11b 5 µL	CD11b 5 µL	CD11b 5 µL
PE				CD56 15 µL	CD56 15 µL	CD56 5 µL	CD56 5 µL
PerCP	CD45 5 µL	CD45 15 µL		CD45 15 µL	CD3 10 µL	CD3 10 µL	CD3 10 µL
APC				CD15 15 µL	CD27 5 µL	CD27 5 µL	CD27 5 µL
PE-Cy7				CD16 2,5 µL	CD34 5 µL		CD34 5 µL
APC-Cy7				CD19 5 µL			
Pacific Blue (BV421)				CD14 5 µL	CD16 1,25 µL	CD16 1,25 µL	CD16 1,25 µL
AmCyan (V500)			CD45 5 µL		CD45 5 µL	CD45 5 µL	

Für die Vollblutfärbungen von Glut-1 in die Validierungsgruppe erfolgte eines von der zuvor beschriebenen Oberflächen Vollblutfärbung folgendermaßen abweichendes Protokoll. Hierfür wurden zunächst 100 µL Vollblut mit 2 mL 1x FACS Lysing Lösung vermischt und für 10 min bei 25°C im Wärmeschrank lysiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Zellen für 5 min bei 500 xg und 4°C pelletiert und der Überstand verworfen. Nach zweimaligem Waschen mit 2 mL Cellwash für 5 min bei 500 xg und 4°C waren die Zellen bereit für die Färbung mit monoklonalen Fluoreszenz-konjugierten Antikörpern. Hierfür wurden die Zellen in 100 µL Cellwash aufgenommen und das geeignete Volumen der monoklonalen Antikörper inklusive 5 µL Glut-1-GFP, gemäß

Tabelle 34, hinzu pipettiert, kurz gevortext und folgend für 20 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde zweimal mit eiskaltem PBS bei 300 xg 4°C für 5 min gewaschen. Die Zellen wurden in 0,3 mL CellWash aufgenommen und bis zur Analyse bei 4°C aufbewahrt. Nach Zugabe von 0,3 mL Cellfix wurde es vermischt und bis zur Analyse bei 4 °C aufbewahrt. Die regulären Oberflächen Färbungen der CD45 Kontrollgruppe erfolgte analog des zuvor beschriebenen Protokolls für die Oberflächenfärbung von Vollblut sowie des Protokolls für die Färbung von TruCount™ Tubes, analog der Vorgehensweise der Entdeckergruppe.

Tabelle 34: Färbungen für Vollblut der Validierungsgruppe

Kanal	TruCount™ Tube	Vollblut Panel CD45 – V500 Panels		
		CD45 Kontrolle	8X Glut-1	NK Diff Glut-1
FITC	-	-	Glut-1 5 µL	Glut-1 5 µL
PE	-	-	CD56 15 µL	CD56 15 µL
PerCP	CD45 5 µL	-	CD3 10 µL	CD3 10 µL
APC	-	-	CD15 15 µL	CD27 5 µL
PE-Cy7	-	-	CD16 2,5 µL	CD34 5 µL
APC-Cy7 APC-H7	-	-	CD19 APC-Cy7 5 µL	CD11b APC-Cy7 5 µL
Pac Blue BV421 V450	-	-	CD14 BV421 5 µL	CD16 BV421 1,25 µL
AmCyan V500 BV510	-	CD45 V500 5 µL	CD45 V500 5 µL	CD45 V500 5 µL

#### 4.10.2 Durchflusszytometrische Analyse von PBMC und NK-Zellen

Gereinigte PBMCs und NK-Zellen wurden für die Durchflusszytometrie in den jeweiligen Einzelzellsuspensionen (ca.  $0,5\text{--}1 \times 10^6$  Zellen) zu 100 µL PBS transferiert und entsprechend der gewünschten Phänotypisierung mit den Antikörpern (Tabelle 35) für 15 min im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert sowie anschließend einmal mit 2 mL Cellwash bei 300 xg für 5 min gewaschen und in 200–300 µL Cellfix aufgenommen.

Tabelle 35: Färbungen für PBMC und NK-Zellen der Entdeckungsgruppe

Kanal	Reinheit Kontrolle 7X		NK- Zell Differenzierung Kontrolle	
	PBMCs NK-Zellen		6x Differenzierung	FMO – CD34 (PE-Cy7)
FITC	ungefärbte PBMCs	CD11b – 5 µL	CD11b – 5 µL	CD11b – 5 µL
PE		CD56 – 15 µL	CD56 – 15 µL	CD56 – 5 µL
PerCP		CD3 – 10 µL	CD3 – 10 µL	CD3 – 10 µL
APC		CD27 – 5 µL	CD27 – 5 µL	CD27 – 5 µL
PE-Cy7	ungefärbte NK-Zellen	CD34 – 5 µL	CD34 – 5 µL	
APC-Cy7				
Pacific Blue (BV421)		CD16 – 1,25 µL	CD16 – 1,25 µL	CD16 – 1,25 µL
AmCyan (V500)		CD45 - 5 µL	CD45 - 5 µL	CD45 - 5 µL

Für die Färbungen der PBMCs im Rahmen der Validierungsgruppe (Tabelle 36) mit 2-NBDG wurden etwa  $0,5\text{--}1 \times 10^6$  PBMCs entsprechend dem im nachfolgenden Kapitel 4.10.5 Durchflusszytometrische Analyse der metabolischen Aktivität beschriebenen Protokoll gefärbt. Final wurden für diese Analysen abweichend 0,3 mL Cellfix hinzugefügt, gevortext und bis zur Analyse bei 4 °C aufbewahrt.



Tabelle 36: Färbungen für PBMC und NK-Zellen der Validierungsgruppe

Kanal	Funktionalität und Phänotyp von PBMC				Reinheit Kontrolle NK-Zellen		NK-Zell Differenzierung
	ungefärbt	MDSCs	8x 2-NBDG	NK Diff 2-NBDG	ungefärbt	7x NK	8x NK
FITC	-	Lin2 20 µL	2-NBDG 50 µL	2-NBDG 50 µL	-		CD11b 5 µL
PE	-	-	CD56 15 µL	CD56 15 µL	-	CD56 5 µL	CD56 5 µL
PerCP	-	CD45 10 µL	CD3 10 µL	CD3 10 µL	-	CD3 10 µL	CD3 10 µL
APC	-	CD15 15 µL	CD15 15 µL	CD27 5 µL	-	CD15 15 µL	CD27 5 µL
PE-Cy7	-	CD34 5 µL	CD16 2,5 µL	CD34 5 µL	-	CD16 1,25 µl	CD34 5 µL
APC-Cy7 APC-H7	-	-	CD19 APC-Cy7 5 µL	CD11b APC- Cy7 5 µL	-	CD19 APC-Cy7 5 µL	CD71 APC-H7 5 µL
Pac Blue BV421 V450	-	CD14 BV421 5 µL	CD14 BV421 5 µL	CD16 BV421 1,25 µL	-	CD14 BV421 5 µL	CD16 BV421 1,25 µL
AmCyan V500 BV510	-	HLA- DR V500 5 µL	CD45 V500 5 µL	CD45 V500 5 µL	-	CD45 V500 5 µL	CD45 V500 5 µL

Für die Oberflächenfärbung der PBMCs wurden  $0,5-1 \times 10^6$  NK-Zellen in 100 µL Cellwash resuspendiert und zusammen mit den Fluorochrom-konjugierten monoklonalen Antikörpern für 15 min bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Nach Ende der Inkubationszeit wurden die Zellen mit 2 mL Cellwash bei 300 xg für 5 min gewaschen und der Überstand verworfen. Die gefärbten NK-Zellen wurden zur Analyse in 300 µL Cellwash aufgenommen und bis zur Messung bei 4°C im Dunkeln gelagert.

#### 4.10.3 Zellzyklus und Zellproliferation

Zur Analyse des Zellzyklus und der Zellproliferation wurden Proliferationsversuche realisiert. Dies wurde mittels CytoTell™ green Verdünnungstests durchgeführt. CytoTell™ ist ein fluoreszierender Farbstoff, diffundiert passiv in die Zelle und bindet intrazellulär an Proteine. Bei jeder Zellteilung wurde der Farbstoff gleichmäßig auf beide Tochterzellen verteilt, sodass sich die Fluoreszenz mit jeder symmetrischen Zellteilung halbierte. Die Verdünnung von CytoTell™ diente damit als Indikator für die

Zellteilung (Liao et al., 2013). Die Färbung wurde analog den Herstellerangaben durchgeführt.

Tabelle 37 zeigt die Färbungen der NK-Zellen im Rahmen der Entdeckungsgruppe, sowie die Färbungen der korrespondierenden gesunden Probanden. Für die Proliferationsanalyse wurden zunächst die Zellen mit CytoTell™ green gefärbt. Hierzu wurden je  $\leq 0,5 \times 10^6$  NK-Zellen in 500  $\mu\text{L}$  PBS gelöst mit 0,25  $\mu\text{L}$  CytoTell™ green (0,25  $\times$ ) vermischt. Anschließend wurden sie für 15 min bei 37°C im Dunkeln inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Zellen mit 4 mL eiskaltem PBS für 5 min bei 300 xg gewaschen und in geeigneter Menge Medium gelöst. Eine Zielkonzentration von  $1 \times 10^6$  NK-Zellen pro Milliliter wurde eingestellt.

NK-Zellen wurden nach Färbung mit CytoTell™ green mit 10 ng/mL IL-12, 45 ng/mL IL-15 und 50 ng/mL IL-18 sowie respektive ohne Zusatz von Zytokinen sieben Tage bei 37°C im CO<sub>2</sub>-Inkubator inkubiert und anschließend erneut, gemäß Tabelle 37 ungefärbt und 6x Proliferation NK-Zellen, gefärbt sowie auf ihre Proliferationsfähigkeit und phänotypischen Eigenschaften vermessen.

Für die Reinheitskontrolle an Tag 0 (Tabelle 37) wurden ohne CytoTell™ green gefärbte NK-Zellen verwendet. Für die Färbung des Proliferationsassay wurden an Tag 0 ohne CytoTell™ green gefärbte und an Tag 7 die mit CytoTell™ green vorgefärbten NK-Zellen (etwa  $0,5\text{--}1 \times 10^6$  Zellen) in 100  $\mu\text{L}$  PBS aufgenommen und mit den entsprechenden Fluorochrom-gekoppelten, monoklonalen Antikörpern, aus (Tabelle 37) 6 x Proliferation NK-Zellen, für 15 min im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert. Final wurden sie mit 2 mL Cellwash bei 300 xg für 5 min gewaschen und in 200–300  $\mu\text{L}$  Cellfix aufgenommen.

Tabelle 37: Färbungen für Proliferationsversuche der Entdeckungsgruppe und für die Kontrollgruppe (Probanden)

Kanal	Reinheitskontrolle NK-Zellen	Proliferationsassay NK-Zellen
	7X Reinheit	6x Proliferation
FITC	ungefärbte NK-Zellen	CD11b – 5 µL
PE		CD56 – 15 µL
PerCP		CD3 – 10 µL
APC		CD27 – 5 µL
PE-Cy7		CD34 – 5 µL
APC-Cy7		CD11b – 5 µL
Pacific Blue (BV421)		CD16 – 1,25 µL
AmCyan (V500)		CD45 - 5 µL

Eine Weiterentwicklung der Proliferationsversuche wurde in der Validierungsgruppe, sowie im Rahmen der Analyse von gesunden Probanden verwendet. Hierfür wurden an Tag 0 Färbungen zur Viabilitätsanalyse mit 7-AAD sowie Annexin V und Proliferationsanalysen aus NK-Zellen durchgeführt, die keiner Färbung mit CytoTell™ green unterlagen (Tabelle 38). An Tag 4 wurden alle Färbungen analog zu den Färbungen von Tag 0 aus mit CytoTell™ gefärbten NK-Zellen vorgenommen (Tabelle 38).

7-AAD und Annexin V APC wurden der Zellsuspension hinzugefügt und die NK-Zell Viabilität mittels Durchflusszytometrie identifiziert. Für die Färbung von 7-AAD und Annexin V wurden  $0,5 \times 10^6$  NK-Zellen zunächst in 100 µL 1x Binding aufgenommen. Anschließend wurde entweder in der Einzelfärbung mit 5 µL 7-AAD oder mit 5 µL Annexin V, oder in der Doppelfärbung mit 5 µL 7-AAD sowie 5 µL Annexin V hinzugegeben. Dies wurde bei Raumtemperatur für 15 min im Dunkeln inkubiert und anschließend mit weiteren 100 µL 1x Binding Puffer versehen und sofort vermessen.

An Tag 0 wurden für die 8x Proliferation Färbung (Tabelle 38) ohne CytoTell™ green gefärbte NK-Zellen und an Tag 4 mit CytoTell™ green gefärbte und im Versuch proliferierte NK-Zellen verwendet. Zunächst wurden die Zellen in 100 µL Cellwash aufgenommen und alle Oberflächenmarker gemäß Tabelle 38 hinzugegeben. Diese wurden für 15 min bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert und anschließend mit

2 mL Cellwash für 5 min bei 300xg gewaschen. Darauffolgend wurden die pelettierten NK-Zellen kurz gevortext, um eine optimale Ablösung zu erhalten, sowie im Anschluss mit 250 µL Fixation / Permeabilization Lösung vermischt und für 20 min bei 4°C im Dunkeln fixiert. Nach dieser Inkubation wurden die Zellen zweimal mit je 2 mL 1x BD Perm / Wash™ Puffer für 5 min bei 300 xg gewaschen und final in 100 µL 1x BD Perm / Wash™ Puffer aufgenommen. Diese Einzelzellsuspension wurde dann mit 5 µL Ki-67 PerCp-Cy5.5 versetzt und für 30 min bei 4°C im Dunkeln inkubiert. Nach Ablauf der Inkubation wurden die Zellen noch zweimal mit je 1 mL 1x BD Perm / Wash™ Puffer bei 300 xg und 4°C für 5 min gewaschen und final in 300 1x BD Stain Buffer aufgenommen und bis zur Messung bei 4°C im Dunkeln gelagert.

Tabelle 38: Färbungen für Proliferationsversuche für die Kontrollgruppe (Probanden) und im Rahmen der Validerungsgruppe

Kanal	Proliferation NK-Zellen Tag 0					Proliferation NK-Zellen Tag 4	
	8x Proliferation	7-AAD / Annexin V	7-AAD	Annexin V	CytoTell	8x Proliferat ion	7-AAD / Annexin V
FITC					CytoTell green 0.25x	CytoTell green	CytoTell green
PE	CD56 5 µL					CD56 5 µL	
PerCP-Cy5.5	Ki-67 5µL	7-AAD 5µL	7-AAD 5µL			Ki-67 5µL	7-AAD 5µL
APC	CD27 5 µL	Annexin V 5 µL		Annexin V 5 µL		CD27 5 µL	Annexin V 5 µL
PE-Cy7	CD34 5 µL					CD34 5 µL	
APC-Cy7 APC-H7	CD11b 5 µL					CD11b 5 µL	
Pac Blue BV421 V450	CD16 1,25 µL					CD16 1,25 µL	
AmCyan V500 BV510	CD71 BV510 5 µL					CD71 BV510 5 µL	

#### 4.10.4 Zytotoxizitätstest

NK-Zellen wurden über Nacht bei Normoxie (20% CO<sub>2</sub>), Hypoxie (1% CO<sub>2</sub>) oder mit Hypoxie-induzierenden chemischen Agenzien DMOG und JNJ kultiviert. Ein Teil blieb ohne Stimulation. Der andere Teil wurde für sechs Stunden mit 45 ng/mL IL-15 geprimt. Nach der Ernte wurden die NK-Zellen mit Violet Proliferation Dye-markierten NK-sensitiven K-562 leukämischen Zielzellen in einem Ratio 12.5:1 oder unbehandelt

für vier Stunden bei Normoxie (20% CO<sub>2</sub>), Hypoxie (1% CO<sub>2</sub>) oder mit den Hypoxie-induzierenden chemischen Agenzien DMOG und JNJ co-kultiviert. Nach Aussaat und Ernte wurden NK- und K-652-Zellen routinemäßig mit Trypanblau auf eine Viabilität  $\geq 95\%$  getestet. Zellpellet und Zellkulturüberstände des Zytotoxizitätsversuchs wurden auf Eiskühlung gesammelt. 7-AAD und Annexin V APC wurden der Zellsuspension hinzugefügt und die Apoptose Stadien der Zielzellen mittels Durchflusszytometrie identifiziert. Zur Kontrolle des spontanen Zelltods wurden die V450<sup>+</sup> leukämischen Zielzellen unter den identischen Konditionen alleine kultiviert. Annexin V Bindung und 7-AAD Färbung war dabei  $< 5\%$  und beziehungsweise  $< 0.2\%$ .

#### 4.10.5 Durchflusszytometrische Analyse der metabolischen Aktivität

NK-Zellen wurden mittels Glut-1 und 2-NBDG (2-[N-(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl) amino]-2-deoxy-D-Glukose) auf ihre glykolytische Aktivität hin analysiert. Die Glukose Aufnahme wurde durch 2-NBDG Aufnahme Tests zur Aufnahme des Fluoreszenz Derivates, welches kompetitiv von D-Glukose, aber nicht von L-Glukose oder Saccharose, inhibiert (Zou et al., 2005). Hierzu wurden 50  $\mu\text{L}$  2-NBDG Stocklösung (100  $\mu\text{M}$ ) mit 100  $\mu\text{L}$  Zellsuspension für zehn Minuten bei 37°C inkubiert und anschließend mit zwei Millilitern kaltem PBS gewaschen. Nach Resuspension in 100  $\mu\text{L}$  PBS stand es gegebenenfalls für weitere Oberflächenfärbungen zur Verfügung.

Die Glut-1 Rezeptor Expression wurde mittels Glut-1.RBD für 20 min bei 37°C im CO<sub>2</sub> Inkubator, gefolgt von einem Waschschrift bei 4°C sowie gegebenenfalls einer weiteren Oberflächenfärbung, analysiert.

BODIPY<sup>®</sup> FL C<sub>16</sub> ist eine grün-fluoreszierende Fettsäure und wurde in einer Konzentration von 1 $\mu\text{M}$  in einer 100  $\mu\text{L}$  Zellsuspension für 15 min bei 37°C kultiviert. Nach zwei aufeinanderfolgenden Waschschriften mit je zwei Millilitern RPMI-1640 + 10% FCS für 5 min bei 300 xg und 4°C wurden bei Bedarf die Oberfläche bei Raumtemperatur gefärbt.

Für die ROS Detektion wurden 0,5  $\mu\text{L}$  des CellROX<sup>®</sup> Deep Red Reagenz zur Messung des zellulären, oxidativen Stresses auf 100  $\mu\text{L}$  Zellsuspension genutzt. Dieser zellgängige Farbstoff zeigt nach 15 min Inkubation, aufgrund einer Oxidation durch reaktive Sauerstoffspezies, eine helle Fluoreszenz. Sofern erforderlich wurden anschließend nach zweimaligem Waschen zusätzliche Oberflächen Rezeptoren gefärbt.

Zur Bestimmung der freien Stickoxide und der Stickoxid Synthase Aktivität in lebenden Zellen wurde das Diaminofluorescein-2 Diacetate (DAF-2DA), ein nicht-fluoreszierendes Zell permeables Reagenz, genutzt. Sobald die Diacetat Gruppe des DAF-2DA durch cytosolische Esterasen hydrolysiert wurde, konnte das DAF-2 freigesetzt und innerhalb der Zelle weiter verestert werden. Die Produktion von NO konvertierte das nicht-fluoreszierende, DAF-2, in sein fluoreszierendes Tiraole Derivat DAF-2T. Dies konnte anschließend detektiert werden. Hierfür wurden 0,3  $\mu\text{L}$  DAF-2DA in 100  $\mu\text{L}$  Zellsuspension und respektiv die Oberflächenrezeptoren für 30 min bei 4°C im Dunkeln gefärbt.

Zusätzlich zur Analyse der metabolischen Aktivität wurden für die Oberfläche jeweils CD56, CD11b, CD27 und CD16 für die multiparametrische Analyse gefärbt. Hierzu wurden 100 µL Zellsuspension mit den entsprechenden Mengen Fluoreszenzgekoppelten Antikörper vermischt und für 15 min im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurde die Zellsuspension mit 2 mL Cellwash für 5 min mit 300 xg bei Raumtemperatur gewaschen. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen in geeigneter Menge Cellwash aufgenommen.

#### 4.10.6 Durchflusszytometrische Analyse von NK-Zell Effektormolekülen

Für die Analyse der Effektor Moleküle IFN- $\gamma$ , Granzyme B und Perforin wurden für eine intrazelluläre Färbung die NK Zellen sequentiell fixiert und permeabilisiert. Zunächst wurden die Oberflächen Rezeptoren mit den Antikörpern gefärbt und anschließend kontinuierlich die Fixierung und Permeabilisierung mit anschließender intrazellulärer Färbung durchgeführt. Die intrazellulären Färbungen wurden mit dem BD Cytotfix/Cytoperm (BD Biosciences), gemäß Herstellerprotokoll, unter Zusatz von Brefeldin A während der letzten vier Stunden der Zellkultur, durchgeführt. Diese Färbung wird für 30 Minuten bei 4°C gemäß Herstellerangaben durchgeführt.

#### 4.10.7 Durchflusszytometrische Analysen von Chemokinrezeptoren

Für die Analyse der Expression von Chemokinrezeptoren auf NK-Zellen wurden sie (Tabelle 8) mit fluoreszenz-markierten Antikörperkonjugate für die Chemokinrezeptoren versetzt. Zunächst wurden  $0,5-1 \times 10^6$  Zellen in 100 µL Cellwash aufgenommen und mit je 5 µL Chemokinrezeptor Antikörperkonjugat versetzt. Bei Bedarf konnten noch allgemeine Oberflächenmarker wie CD11b, CD16, CD27 und CD56 (Kapitel 4.10.2) ergänzt werden. Die Zellen inkubierten für 15 min bei Raumtemperatur im Dunkeln. Nach der Färbung wurde die Zellsuspension mit 2 mL Cellwash für 5 min mit 300 xg bei Raumtemperatur gewaschen. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen in geeigneter Menge Cellwash aufgenommen.

#### 4.10.8 Präparation von peripheren mononukleären Zellen

Blut wurde mittels antikoagulierten-EDTA Abnehmeröhrchen mittels Venenpunktion von gesunden Probanden oder mittels eines zentralvenösen Katheters bei Intensivpatienten, respektive aus Buffy Coats gewonnen. Dieses Probenmaterial wurde anschließend in einer Separationszentrifugation zu peripheren mononukleären Zellen (PBMC) weiterverarbeitet.

#### 4.10.8.1 Separationszentrifugation von PBMC

Ficoll-Paque™ hat eine Dichte von 1,077 g/mL. Dies ermöglichte eine Auftrennung der Blutbestandteile gemäß ihrer spezifischen Dichte. Dabei besitzt Ficoll-Paque™ eine größere Dichte als Lymphozyten und Monozyten, aber eine geringere Dichte als Erythrozyten und der meisten Granulozyten. Weiter bewirkt Ficoll-Paque™ eine Agglutination der Erythrozyten, sodass es zur beschleunigten Sedimentation der Erythrozyten im Zentrifugalfeld kommt und dadurch zur Entstehung eines Erythrozyten-Pellets führt. (Luttmann et al., 2014)

#### Präparation von PBMC für die Querschnittstudien und korrespondierender Analysen

Das antikoagulierte Vollblut der Studienteilnehmer, gemäß Kapitel 4.9.1, wurde in einem Verhältnis 1:4 mit PBS+ verdünnt, langsam auf 15 mL Ficoll-Paque™ in einem 50 mL Zentrifugenröhrchen geschichtet und für 35 min bei 400 xg ohne Bremse und mit halber maximaler Beschleunigung zentrifugiert. Nach der Zentrifugation bestand die oberste Schicht aus Plasma und Thrombozyten. Die PBMC-Interphase zeigte sich als eine weiße Grenzschicht aus Lymphozyten und Monozyten. Unter dem Ficoll-Paque™ befanden sich Erythrozyten und die meisten Granulozyten. Die Interphase wurde in ein 50 mL Röhrchen überführt und mit PBS+ auf 50 mL aufgefüllt und bei 300 xg für 10 min gewaschen. Anschließend wurde nochmals mit 50 mL PBS+ bei 200 xg gewaschen. Die restlichen Thrombozyten konnten so entfernt werden. Der Überstand wurde anschließend abgesaugt und verworfen. Die PBMCs standen zur weiteren Bearbeitung für die hypotone Lyse der verunreinigten Erythrozyten bereit.

#### Präparation von PBMCs für die Längsschnittstudie

Für die Ficoll-Paque™ Separation zur Herstellung von PBMC im Rahmen der Längsschnittstudie, gemäß Kapitel 4.9.1, wurden 1-2 mL Vollblut in einem Verhältnis 1:4 verdünnt und langsam auf 3 mL Ficoll-Paque™ in ein 15 mL Zentrifugenröhrchen geschichtet. Das Röhrchen wurde für 15 min bei 1000 xg ohne Bremse und mit halber maximaler Beschleunigung zentrifugiert. Die abgenommenen PBMCs wurden in ein frisches 15 mL Zentrifugenröhrchen überführt und einmal mit PBS+ bei 300 xg für 10 min gewaschen. Der Überstand wurde verworfen. Anschließend waren die Zellen für die hypotone Lyse der verunreinigten Erythrozyten aufbereitet.

#### 4.10.8.2 Hypotone Lyse der Erythrozyten

Die Lyse der Erythrozyten aus PBMC mittels Erythrozyten-Lyse (Erylyse)-Puffer (Tabelle 30), entfernte alle aus dem Vollblut verunreinigten Erythrozyten. Dafür wurden die osmotischen Eigenschaften des Kaliumchlorids genutzt. Dies führte zum Einströmen von Wasser und dem Platzen der Erythrozyten. Die PBMC wurden mit 5 Teilen Erylyse-Puffer (1x) versetzt und für 5-10 min (je nach Pelletgröße) bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde das Lysat auf 50 mL mit PBS+ aufgefüllt und für 10 min bei 300 xg und Raumtemperatur gewaschen. Final wurde der Überstand verworfen.

#### 4.10.9 Reinigung von Natürlichen Killerzellen

Natürliche Killerzellen konnten durch vorherige Gewinnung von PBMCs und nachfolgender immunomagnetischer Präparation isoliert werden.

##### 4.10.9.1 Immunmagnetische Markierung und Separation von NK-Zellen

Die Isolierung von NK Zellen aus PBMC erfolgte unter sterilen Bedingungen durch die Isolation mit der magnetisch aktivierten Zellsortierungs (MACS, magnetic activated cell sorting) -Technologie.

##### Magnetische Zell Sortierung (MACS<sup>®</sup>, Miltenyi Biotec)

Die magnetische aktivierte Zellsortierung-Technologie beruht auf dem Prinzip der Anreicherung der gewünschten Zellpopulation durch eine antikörpervermittelte Depletion unerwünschter Zellen. Die MACS Separation nutzte Streptavidin-markierte ferromagnetische Partikel, die an biotinylierte Antikörper banden. Die magnetische Trennung erfolgte über eine Säule mit ferromagnetischer Matrix. Diese konnte mittels eines Magneten vollständig magnetisiert werden. Alle im Durchfluss befindlichen NK-Zellen trugen nach der Isolierung keinerlei zusätzliche Partikel. Am Ende der Isolierung wurde die Viabilität gemäß Kapitel 4.10.10.2 analysiert und die Reinheit mittels einer Durchflusszytometrie Oberflächenfärbung auf CD56, CD3 und CD45 (Kapitel 4.10.2) bestimmt.

##### NK-Zellen aus Blut von Probanden und Buffy Coats

Aus der Kontrollgruppe und Buffy Coats fand eine negative Selektion über das humane NK-Isolation Kit statt. Einzelzellsuspension wurden aus PBMC mittels NK-Zell Isolation Kit (human) hergestellt. Hierfür wurden je  $1 \times 10^7$  PBMC mit 40  $\mu$ L MACS Puffer und 10  $\mu$ L NK-Zell Biotin-Antikörper Cocktail resuspendiert. Sie wurden gemäß Herstellerprotokoll zusätzlich nach Präinkubation mit 30  $\mu$ L MACS Puffer und 20  $\mu$ L NK Zell Mikrobead Cocktail versetzt. In Abhängigkeit zur PBMC Gesamtzahl wurden LS (max. Anzahl markierter Zellen von  $10^8$ ) oder MS (max. Anzahl markierter Zellen von  $10^7$ ) Säulen auf einem MACS Separator verwendet.

##### NK-Zellen aus Patientenblut

Dem gegenüber stand die Isolierung von NK-Zellen mittels einer zuerst durchgeführten negativen Isolation. Hierdurch blieben alle unerwünschten Leukozyten-Subpopulationen in der Säule haften, um dann in einem zweiten Schritt mittels positiver Selektion nur reine CD56<sup>+</sup> NK-Zellen zu erhalten. In dieser Form der positiven Selektion blieben die ferromagnetischen Partikel jedoch an den Zellen erhalten. Dementsprechend mussten die NK-Zellen nach der Isolation zur weiteren Verwendung aus der Säule gespült werden. Die Einzelzellsuspension wurden aus primären PBMC mittels eines eigens entwickelten NK-Isolations Protokolls isoliert. Zunächst wurde eine negative Selektion gegen CD3, CD19, CD14 und CD15 durchgeführt. Dafür



wurden je  $1 \times 10^7$  Zellen mit 20  $\mu\text{L}$  MACS Puffer und je 20  $\mu\text{L}$  Antikörper gekoppeltes Biotin-Streptavidin resuspendiert und für 15 min inkubiert, bei  $4^\circ\text{C}$  und  $300 \times g$  für zehn Minuten gewaschen und anschließend magnetisch isoliert. Im zweiten Schritt fand eine positive Selektion gegen CD56, mit 80  $\mu\text{L}$  MACS Puffer und 20  $\mu\text{L}$  CD56 markierten Antikörper über eine weitere magnetische Säule und einem MACS Separator, statt. Nach positiver Selektion konnten die Zellen gewaschen und ihrem finalen Einsatz zugeführt werden.

#### 4.10.10 Zellkultur

##### 4.10.10.1 Auftauen der Zellen sowie Kryokonservierung

Um kryokonservierte K-652 leukämische Zellen in Kultur nehmen zu können, wurden diese zunächst im Wasserbad bei  $37^\circ\text{C}$  angetaut und anschließend in einem Verhältnis 1:10 ( $10^5$  Zellen/mL) mit geeignetem Zellkulturmedium (RPMI-1640 mit 10% FBS, 2 mM L-Glutamine) suspendiert. Nach zwei Waschvorgängen ( $300 \times g$ , 10min,  $4^\circ\text{C}$ ) wurde frisches Medium zugesetzt und in geeignete Zellkulturflaschen ausgesät. Die Inkubation erfolgt bei  $37^\circ\text{C}$  und 5%  $\text{CO}_2$ . Zur Kryokonservierung wurden die Zellen trypsiniert, in Medium aufgenommen und für 10 min bei Raumtemperatur und  $1000 \times g$  pelletiert. Der Überstand wurde abgesaugt, in einem eisgekühltem Einfriermedium (70% Medium, 20% FCS, 10% DMSO) resuspendiert und in Kryoröhrchen gegeben. Die vorbereiteten Zellen wurden zunächst mit einer Einfrierhilfe eingefroren, anschließend in flüssigen Stickstoff überführt und dort gelagert.

##### 4.10.10.2 Bestimmung der Viabilität, Zellgröße und Zellzahl

Zur Bestimmung der Viabilität, Zellgröße und Zellzahl wurden 10  $\mu\text{L}$  Zellsuspension mit 10  $\mu\text{L}$  Trypanblau in einer Einmalzählkammer für Countess II gegeben und mittels der Countess II bestimmt. Die Zellgröße für viable NK-Zellen und PBMCs wurden auf eine Größe zwischen 8 und 30  $\mu\text{m}$  definiert.

##### 4.10.10.3 Zellkulturbedingungen

Die Standard Kultur für NK-Zellen wurde in RPMI-1640 Medium mit 10% FCS in einer Konzentration von  $1 \times 10^6$  Zellen/mL in Multiwell-Platten für Suspensionszellen durchgeführt. Die Kultur fand bei  $37^\circ\text{C}$  und 5%  $\text{CO}_2$  in einem Standard  $\text{CO}_2$  Inkubator mit atmosphärischen Sauerstoffgehalt (20%  $\text{O}_2$ ) oder in einem Luft-kontrollierten Inkubator, mit Stickstoff Injektionen sowie reguliertem  $\text{O}_2$  von 1% und 5%  $\text{CO}_2$  statt. Die Tabelle 39 beschreibt die Konzentrationen der ausgesäten Zellen, entsprechend des jeweiligen Versuches.

Tabelle 39: Konzentrationen der ausgesäten Zellen, entsprechend des jeweiligen Versuches

Versuch	Kapitelnummer	Zelldichte
Metabolische Aktivität	4.10.5	1×10 <sup>6</sup> Zellen/ 1 mL Medium
Metabolische Flussanalyse	4.10.10.	1×10 <sup>6</sup> Zellen/ 1 mL Medium
Migrationsassay	4.10.11	0,5×10 <sup>6</sup> Zellen/ 300 µL Medium
Langzeiteffekt	4.10.5	1×10 <sup>6</sup> Zellen/ 1 mL Medium
Zellzyklus und Zellproliferation	4.10.3	1×10 <sup>6</sup> Zellen/ 1 mL Medium
Zytotoxizitätsanalyse	4.10.1	1×10 <sup>6</sup> Zellen/ 1 mL Medium (NK-Zellen) 0,08×10 <sup>6</sup> Zellen/ 1 mL Medium (K652 Zellen)

Bei Aussaat und Ernte wurden die NK-Zellen mittels Trypanblau auf eine Viabilität von  $\geq 95\%$  getestet.

Die Stimulation erfolgte am nächsten Morgen, für den Migrationsassay sowie den Langzeiteffekt und den Proliferationsassay respektiv direkt. Rekombinante humane Zytokine wurden nach Rekonstitution in PBS + 0,1% BSA, bzw. 4mM Salzsäure (HCl) für TGF- $\beta$  bei -20°C gelagert. Eine chemische Hypoxie wurde durch den Einsatz von Prolyl Hydroxylase Inhibitoren mit 50 µM DMOG oder 20 µM (JNJ-42041935) erzielt (Nguyen et al., 2013). Das Priming mit IL-15 erfolgte für sechs Stunden, bevor im Anschluss die weiteren Stimulanzen für vier Stunden zur Stimulation eingesetzt wurden. Die chemischen Agenzien wurden hierbei für die verschiedenen Stimulationsschemata (Abbildung 13) immer in folgender Endkonzentration eingesetzt:

Tabelle 40: Übersicht über Endkonzentrationen im Versuchsansatz

Chemische Agenzien	Endkonzentration für die Stimulation	Volumen Stammlösung pro Milliliter Zellsuspension [µL]
Brefeldin A	10 ng/mL	1,0
CCL3	10 ng/mL	20
CCL4	10 ng/mL	20
CCL5	10 ng/mL	20
DMOG	50 µM/mL	2,0
IL-4	20 ng/mL	20
IL-10	10 ng/mL	10
IL-12	10 ng/mL	4,0
IL-13	2,0 ng/mL	2,0
IL-15	45 ng/mL, 100 ng/mL <sup>10</sup>	4,5
IL-18	50 ng/mL	0,5
JNJ	20 µM/mL	0,5
TGF- $\beta$	5,0 ng/mL	5,0

<sup>10</sup> Für Injektionen mit sehr hohen Dosen an IL-15

Nach Ablauf der kurz- und mittelfristigen Stimulation, gemäß Abbildung 13, wurden die Zellen abgenommen und für die FACS-Messung vorbereitet. Bei Versuchen der Migration wurden die Zellen nach 48h abgenommen und vermessen. Für Proliferationsanalysen wurden die Zellen vier oder sieben Tage in Kultur genommen bevor sie analysiert wurden.

#### 4.10.11 Metabolische Flussanalysen

Diese Methode diente der Erstellung eines Profils zur Abhängigkeit von verschiedenen Kohlenstoffquellen der primären NK-Zellen. Die Messung der extrazellulären Ansäuerungsrate (ECAR) und Sauerstoffsverbrauchsrate (OCR) wurde mittels XFp Extrazellulärem Flux Analyser (Agilent Technologies) durchgeführt.

Konditionierte NK-Zellen wurden mit dem jeweiligen Serum-freien Agilent Seahorse XF RPMI Medium (pH 7,4), sowohl mit als auch ohne weitere Zusätze, zunächst zweimal gewaschen und anschließend resuspendiert. Die resuspendierten Zellen wurden dabei mit denselben Medienzusätzen wie während der Konditionierung ausgesetzt (Tabelle 40: Übersicht über Endkonzentrationen im Versuchsansatz). Zur Beurteilung von zwei oder drei experimentellen Konditionen, wurden NK-Zellen in Duplikaten oder Triplikaten von je  $2 \times 10^5$  Zellen pro Well in die Seahorse Miniplatte ausgesät. Alle Daten wurden auf die Zellzahl ( $1,5-2,0 \times 10^5$ ) normalisiert und mit der Seahorse Wave Software analysiert.

##### 4.10.11.1 Glykolytische Flussanalyse

Für die Analyse des glykolytischen Flux, wurde die ECAR unter basalen Bedingungen gefolgt von der sequentiellen Addition von Glukose ( $30 \mu\text{mol/Well}$ ), Oligomycin ( $14.4 \text{ nmol/Well}$ ) und 2-Desoxyglucose ( $150 \mu\text{mol/Well}$ ) vermessen. Drei Parameter konnten dabei bestimmt werden: (i) Glykolyse oder glykolytischer Flux, welche sich in der ECAR der Zellen nach Glukoseaddition darstellte; (ii) glykolytischer Kapazität, welche das Maximum des ECAR nach Behandlung mit Oligomycin repräsentierte; und (iii) die glykolytische Reserve, welche das maximale Leistungsvermögen von Zellen zur Steigerung der glykolytischen Funktion indizierte.

Tabelle 41: Auflistung der Injektionskomponenten

Injektionskomponenten	Mechanismus
Glukose	Eine sättigende Glukosekonzentration förderte die Glykolyse.
Oligomycin	Oligomycin inhibierte die ATP Synthase (Komplex V) in den Mitochondrien und führte zu einer gesteigerten Abhängigkeit von der Glykolyse.
2-DG	2-DG ist ein kompetitiver Inhibitor der Glukose und kann die Glykolyse gänzlich blockieren.

#### 4.10.11.2 Bestimmung der zellulären Sauerstoffverbrauchsrate

Zur Analyse der zellulären Sauerstoffverbrauchsrate, vor allem der Analyse der von NK-Zellen verwendeten Kohlenstoffquelle, wurde das Serum-freie Agilent Seahorse XF RPMI Medium (pH 7,4) mit Pyruvat (1 mM), Glutamin (2 mM) und Glukose (10 mM) supplementiert. Gemäß Herstellerprotokoll wurden die Zellen nach der Aussaat für 45 min bei 37°C in einem Wärmeschrank präinkubiert. Die OCR wurde zunächst unter basalen Konditionen gefolgt von sequentieller Addition von UK5099 (6 nmol/Well) ebenso wie einer 1:1 Mischung von BPTES (6 nmol/Well) und Etomoxir (8 nmol/Well) inspiziert.

Tabelle 42: Auflistung Injektionskomponenten

Injektionskomponenten	Mechanismus
BPTES	Ein allosterischer Inhibitor des Glutamin Oxidations-Signalwegs. Dieser Inhibitor der Glutaminase verhinderte, dass Glutamin in Glutamat konvertiert werden konnte.
Etomoxir	Ein Inhibitor des Oxidationssignalwegs von langkettigen Fettsäuren. Die Carnitin Palmitoyl-Transferase 1A wurde durch Etomoxir inhibiert. Dadurch wurde die Translokation von langkettigen Fettsäuren aus dem Cytosol in die Mitochondrien für die beta Oxidation verhindert.
UK5099	Inhibitor des Glukose Oxidationssignalwegs. Der mitochondriale Pyruvat Inhibitor Carrier wurde blockiert. Dadurch konnte Glukose während der Glykolyse nicht mehr in Pyruvat konvertiert werden.

#### 4.10.11.3 Bestimmung der mitochondrialen Atmung

Zur Untersuchung der mitochondrialen Atmung wurde der Mito-Stress-Test durchgeführt. Das Serum-freie Agilent Seahorse XF RPMI Medium (pH 7,4) wurde mit Pyruvat (1 mM), Glutamin (2 mM) und Glucose (10 mM) supplementiert. In diesem Test wurden mit zeitlichem Abstand und in aufeinanderfolgenden Schritten 2,5 µmol Oligomycin, 0,25 µmol FCCP und 0,5 µmol Antimycin A plus Rotenon in die Kultur zugegeben. Zuerst wurde Oligomycin in die Kultur injiziert, wodurch die ATP-Synthese durch die Atmungskette inhibiert wurde. Damit war eine Bestimmung des Sauerstoffverbrauchs der ATP-Synthase beziehungsweise der ATP-Produktion, unabhängig vom natürlichen Protonenverbauchs über die mitochondriale Membran, möglich. Im zweiten Schritt konnte durch die FCCP Zugabe, die Atmungskette entkoppelt und dadurch ein Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials erzeugt werden. Resultierend kam es zu einem rapiden Energie- und Sauerstoffverbrauch ohne ATP-Bildung. Die maximale Atmungsrate konnte durch den Anstieg des OCR bestimmt werden. Im finalen Schritt wurde ein Gemisch auch Rotenon, einem Inhibitor des Komplex-I der Atmungskette, und Antimycin A, einem Inhibitor des Komplex-III der Atmungskette, injiziert. Hiermit ließ sich die komplette Hemmung der mitochondrialen Atmung bzw. der ATP-Produktion erzwingen und erlaubte eine Berechnung der respiratorischen Kapazität der Zellen.

Tabelle 43: Auflistung Injektionskomponenten

Injektionskomponenten	Mechanismus
FCCP	FCCP sorgt für einen Kollaps des Protonengradienten und stört das Membranpotential. Dadurch kommt es zur Depolarisation der inneren Membran, wodurch der Sauerstoffverbrauch in Komplex V sein Maximum erreicht.
Oligomycin	Oligomycin inhibiert die ATP Synthase (Komplex V) in den Mitochondrien und führt zu einer gesteigerten Abhängigkeit von der Glykolyse
Rotenon & Antimycin A	Der Atmungsketteninhibitor (Komplex III) Antimycin A blockiert gemeinsam mit Inhibitor des Atmungskettenkomplexes I die mitochondriale Atmung. Dadurch ist es möglich nicht nicht-mitochondriale Atmung außerhalb der Mitochondrien zu bestimmen.

#### 4.10.12 Migrationsassay

Für die Migrationsassays wurden die NK-Zellen aus dem Blut gesunder Probanden gewonnen. Pro Migrationsassay wurden jeweils sechs Bedingungen in einer 24-Well Platte getestet, welche mit zwölf Matrigel®-beschichtete Inserts ausgestattet war. Matrigel® entstammte einem Maus-Sarkom und war reich an extrazellulären Matrix-Proteinen ebenso wie einer Vielzahl von Wachstumsfaktoren. Durch diesen

biologischen Ursprung zählt Matrigel® zu dem am meisten genutzten Model für 2D- und 3D *in vitro* Zellkulturen (Corning, 2019).

Für die Übertragbarkeit der Versuchsergebnisse in die *in-vivo* Verhältnisse, ist Matrigel® als biologisches Basalmembran-Modell ein geeignetes System für die Migration. Durch das Matrigel® wurden die physiologischen Bedingungen hergestellt, wie sie die NK-Zellen *in-vivo* bei der Migration durch die extrazelluläre Matrix der Basalmembranen erfahren.

Die Transwell-Platte wurde bei -20 °C gelagert und musste vor Beginn des Migrationsassays für 30 min bei Raumtemperatur aufgetaut und anschließend hydratisiert werden. Hierfür wurde in jedes Well und jedes Insert 500 µL des RPMI-Mediums (+10% FCS) pipettiert und die Platte mit den Inserts für 2 Stunden im 37 °C Inkubator platziert. Nach Beendigung dieser zweistündigen Präinkubation wurde das Medium entfernt. Im Anschluss erfolgte die Beladung der 12 Wells mit Medium. In jedes Well wurden jeweils 1,5 mL RPMI-Medium +10% FCS pipettiert und die jeweiligen Konzentrationen an Chemokinen und Zytokinen je nach Bedingung zugefügt. Es folgte die Beladung der Transwell-Inserts. Pro Insert wurden  $5 \times 10^5$  Zellen in 300 µL RPMI-Medium mit 10 % FCS ausgesät. Danach wurden die Zytokine zu den Zellen hinzu pipettiert. In das Transwell-Insert wurden keine Chemokine hinzugegeben, um einen Chemokingradienten hin zu dem unteren Kompartiment zu erzeugen.

Die 24 Well Platte wurde für 48 Stunden im CO<sub>2</sub>-Inkubator (37°C, 5% CO<sub>2</sub>) inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen geschabt, die Zellviabilität und die Zellzahlen bestimmt. Die Zellkulturüberstände wurden in 1,5 mL Eppendorf-Tubes überführt und für spätere Messungen bei -80°C gelagert. Die NK-Zellen wurden einer Immunophänotypisierung hinsichtlich ihrer Chemokinrezeptor und CD62L Rezeptorexpression (siehe Kapitel 4.10.5) unterzogen sowie die Zellviabilität und Zellzahl bestimmt (siehe Kapitel 4.10.10.2). Die Auswertung der Migrationsassay erfolgte mittels der Mittelwerte der migrierten Zellzahlen und der Durchflusszytometrie-Daten.

#### 4.10.13 Magnetischer Bead-Array-Assay

Nach dem Auftauen der Proben wurden die Zellkulturüberstände beziehungsweise Plasmaproben zunächst bei 10 000 xg für zehn Minuten bei 4°C zentrifugiert. Die Proben wurden bis zur Analyse auf einem MAGPIX System bei -80°C gelagert und anschließend mit der MILLIPLEX Analyst Software ausgewertet.

#### Proteinbestimmung in Zellkulturen

Zellkulturüberstände wurden zur Quantifizierung der Spiegel an IFN-γ, TNF-α, CCL-3 (MIP-1α), CCL-4 (MIP-1β), CCL-5 (RANTES), MIF, VEGF, Perforin, Granzym A, Granzym B mit den MILLIPLEX Map Kits bestimmt. Falls notwendig wurden die Plasmaextrakte in MILLIPLEX MAP Assay Puffer verdünnt. Für die Quantifizierung von Proteinen aus EDTA-Plasma wurden 25 µL vorbereitetes Plasma (unverdünnt oder gegebenenfalls verdünnt) je Well eingesetzt.

### Proteinbestimmung im EDTA-Plasma

Plasmaproben wurden zu bestimmten Zeitpunkten zur Quantifizierung der Proteinkonzentrationen an Arginase-1, CCL-3, CCL-4, CCL-5, Granzyme A, Granzyme B, IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-12p40, IL-12p70, IL-13, IL-15, Perforin, TNF- $\alpha$  und VEGF mit MILLIPLEX Map Kits bestimmt. Für die Quantifizierung der Zellkulturüberstände wurden 25  $\mu$ L unverdünnter Zellkulturüberstand je Well eingesetzt.

#### 4.10.14 Gesamte RNA

Die totale RNA für die quantitative Real Time Polymerase Kettenreaktion wurde aus, isolierten und in RNeasy<sup>®</sup> gelagerten NK-Zellen aufgereinigt. Es wurde zur weiteren Aufreinigung eine bereits berichtete modifizierte Methode zur Isolierung mittels dem miRvana<sup>™</sup> miRNA Isolations Kit, den kleineren Pure Link Micro Kit Filtersäulen sowie eReaktionsgefäßen (Figueiredo et al., 2017; Velasquez et al., 2016) verwendet. Dies erfolgte um eine höhere finale RNA Konzentration zu erhalten, als mit dem regulären mirVana Kit. Die Zentrifuge wurde hier angepasst (10 000xg, 1min) und die RNA in 15  $\mu$ L, 95°C warmen, Nuclease-freiem Wasser bei 14°000xg für 1min eluiert. Die isolierte RNA wurde einer DNase-Behandlung unterzogen und spektrometrisch (2100 Bioanalyzer Instrument) quantifiziert. Die Präparationen enthielten mindestens eine durchschnittliche RNA Konzentration von  $\geq 220$  ng/ $\mu$ L mit einer RNA Integritätsanzahl von  $\geq 8$ .

#### 4.10.15 Quantitative Real Time-Polymerase Kettenreaktion

Für die Bestimmung der Gen Expressionsanalyse in Patientenproben der Entdeckergruppe wurde ein TaqMan<sup>™</sup> qRT (quantitative Real Time) -PCR auf dem 7900HT Fast Real Time PCR Instrument durchgeführt. Als endogene Kontrolle wurde AKIRIN gewählt (Coulibaly et al., 2019). Für jede Patientenprobe (Sepsis n=5 und SIRS n=5) wurden ca. 800 ng totale RNA für die reverse Transkription in cDNA eingesetzt. Hierzu wurde das High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit mit RNase I Inhibitor verwendet. Zunächst wurde die RNA in 10  $\mu$ L Nuclease freiem Wasser aufgenommen und mit 10  $\mu$ L 2x Reverse Transkriptase Mastermix vorsichtig vermischt. Anschließend wurde die reverse Transkription auf dem Thermocycler ausgeführt. Final entstanden 20  $\mu$ L cDNA. Dann wurden 25 ng/Well cDNA für jedes zu amplifizierenden Zielgen verwendet. Die Analysen wurden mit TaqMan<sup>®</sup> Gene Expression Assay in Triplikaten auf 96-Well Platten durchgeführt. Die im Test bestimmten Identifikationen (IDs) der Gene und selektierten Endogenen Kontrollen sind in Tabelle 44 dargestellt.

Tabelle 44: Gen Informationen und Spezifikationen für GenExpression Assays

Name	Gen Symbol	TaqMan Assay ID	GeneBank Nummer
Akirin 1	<i>AKIRIN1</i>	Hs01047800_g1	NM_024595
Glyceraldehyde-3-phosphate Dehydrogenase	<i>GAPDH</i>	Hs99999905_m1	NM_002046
Fcy-Rezeptor IIIa (CD16A)	<i>FCGR3A</i>	Hs02388314_m1	NM_000569
H2A Histone Family Member Z	<i>H2AFZ</i>	Hs01888362_g1	NM_002106
TATA Box bindendes Protein	<i>TBP</i>	Hs99999910_m1	NM_003194

Die Ergebnisse wurden als Schwellenwert Zyklus (Ct, threshold cycle) Wert normalisiert, welche invers proportional zur Ziel Anzahl der cDNA Kopien in der PCR Reaktion sind. Die Ct Werte sind als Gruppen Mittelwerte angegeben. Dabei wurden alle Werte auf Akirin1 normalisiert und die  $\Delta\Delta$  Ct Methode zur relativen Quantifizierung verwendet. Dadurch wurde eine Berechnung des Expressionsunterschiedes (Ratio) möglich. Hierfür wurde von jeder Probe der Ct Wert des Referenzgens subtrahiert. Nach dieser Normierung wird vom neuen  $\Delta$ Ct Wert der behandelten Probe der  $\Delta$ Ct Wert einer Kontrolle subtrahiert. Dies führt zum  $\Delta\Delta$ Ct Wert und damit dem relativen Expressionsunterschied einer Probe zwischen der Behandlung und der Kontrolle (Ratio), normalisiert zum Referenzgen Akirin 1. Kalkulationen auf den vielfachen Unterschieden basieren auf den entsprechenden Mengen von totalen RNA, welche in jeder reversen Transkription (Input RNA) eingesetzt wurden. Der Ratio berechnet sich dabei durch  $\log_2^{-\Delta\Delta Ct}$  und setzt eine Verdoppelung der DNA Menge in jedem Zyklus voraus.

Formel 2: Berechnung des  $\Delta$ Ct Wertes

$$\begin{aligned}\Delta Ct &= Ct \text{ Zielgen} - Ct \text{ Referenzgen} \\ \Delta\Delta Ct &= \Delta Ct \text{ Behandlung} - \Delta Ct \text{ Kontrolle} \\ \text{Ratio} &= 2^{-\Delta\Delta Ct}\end{aligned}$$

#### 4.10.16 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte mit der GraphPad Prism Software. Die jeweiligen verwendeten, statistischen Tests sind in den Legenden der Abbildungen vermerkt. Die Fehlerbalken repräsentieren die mediane Standardabweichung vom Mittelwert. Die ausgewerteten Daten wurden gemäß Verteilungslevel für Unterschiede von Mittelwert- und Varianzanalysen mit parametrischen (Student's t-Test, einfaktorierter (one-way ANOVA) oder zweifaktorieller Varianzanalyse (two-way ANOVA)) oder nicht parametrischen (Wilcoxon oder Kruskal-Wallis) Test ausgewertet. Bei allen Analysen wurde ein Signifikanzniveau von  $p < 0,05$  als Schwellenwert festgelegt.



## 5 ERGEBNISSE

Die im Rahmen dieser Dissertation gesammelten Ergebnisse wurden aus Patienten sowie aus *in vitro* Analysen von Probanden, respektive Buffy Coats gesammelt.

### 5.1 Demographische und klinische Charakteristika der Patienten

Die demographischen Daten und klinischen Charakteristika der Querschnittsstudie sind in Tabelle 45 zusammengefasst. Für diese Studie wurden Patienten eingeschlossen, die mit der Diagnose einer Sepsis (schweregradunabhängig, nach Sepsis-1/2 Definition) oder eines posttraumatischen SIRS (durch Polytrauma oder postoperativ) auf die interdisziplinäre Intensivstation, dem Aufwachraum oder der chirurgischen Intermediate Care der Universitätsmedizin Mannheim aufgenommen wurden (Bone et al., 1992; Levy et al., 2003). Alle eingeschlossenen Patienten haben die Diagnose Sepsis auch gemäß der Sepsis-3 Definition (Singer et al., 2016).

Tabelle 45: Patientencharakteristika der Querschnittsstudie

Charakteristika	Entdeckungsgruppe		Validierungsgruppe	
	SIRS Patienten (n=23)	Sepsis Patienten (n=23)	SIRS Patienten (n=12)	Sepsis Patienten (n=9)
<b>Geschlecht</b>				
Männer (%)	16 (70%)	10 (43%)	10 (83%)	6 (67%)
<b>Alter</b>				
Median (Spanne)	73 (28-88)	70 (36-83)	70 (41-83)	61 (46-78)
<b>Fokus/SIRS Ätiologie</b>				
<i>SIRS Ätiologie</i>				
Abdominale Operation	8	n.a.	3	n.a.
Thorakale Operation	4	n.a..	0	n.a..
Vaskuläre Operation	3	n.a..	1	n.a..
Oropharynx Operation	1	n.a.	1	n.a.
Polytrauma	6	n.a.	1	n.a.
Urologische Operation	0	n.a.	6	n.a.
<i>Sepsis Fokus</i>				
pulmonal	n.a.	10	n.a.	5
abdominal	n.a.	10	n.a.	3
urogenital	n.a.	1	n.a.	0
Weichteilgewebe	n.a.	2	n.a.	0

Endokarditis	n.a.	0	n.a.	1
<b>SOFA Score</b>				
Median (SD) <sup>a</sup>	6,5 ± 2,9	10,9 ± 2,5*	5 ± 2,3	13 ± 3,3
<b>ICU Aufenthaltsdauer (Tage)</b>				
	4,2 ± 4,9	14,7 ± 15,1*	2,5 ± 3,5	10 ± 9,4
<b>ICU Mortalität (%)</b>				
Anzahl (%)	0 (0%)	9 (40%)	0 (0%)	3 (33%)
<b>Laborparameter</b>				
WBC median [10 <sup>9</sup> /l]	16,4	17,4	12,7	10
CRP median [mg/l]	39,7	359	115	183
PCT median [µg/l]	0,4	8,6	1,6 <sup>#</sup>	3,4 <sup>°</sup>

<sup>a</sup> Daten sind als Median ± Standard Abweichung präsentiert.

\* p-Wert < 0,0001 gemäß Wilcoxon-Rangsummen Test

# nur bei 5 von 12 Patienten bestimmt.

° nur bei 8 von 9 Patienten bestimmt.

n.a. nicht zutreffend

### 5.1.1 Durchflusszytometrische Charakterisierung der Leukozyten

Die Charakterisierung erfolgt anhand der Durchflusszytometrie. Hinsichtlich der Gesamtleukozytenverteilung im Vollblut zeigt Abbildung 7 eine sehr ähnliche Verteilung zwischen SIRS und Sepsis Patienten. Die absoluten Zellzahlen der CD15<sup>+</sup> Granulozyten tendieren bei SIRS Patienten gegenüber Sepsis Patienten ohne statistisch signifikant zu einer leichten Erhöhung. Während eines SIRS scheinen die Granulozyten leicht erhöht. Gegenüber den Referenzwerten von gesunden Personen (Sack et al., 2007), sind die Werte für Granulozyten ebenfalls erhöht. Für die NK-Zellen ist ein Abfall der absoluten Zellzahl von SIRS nach Sepsis zu beobachten. Diese ist jedoch nicht signifikant.

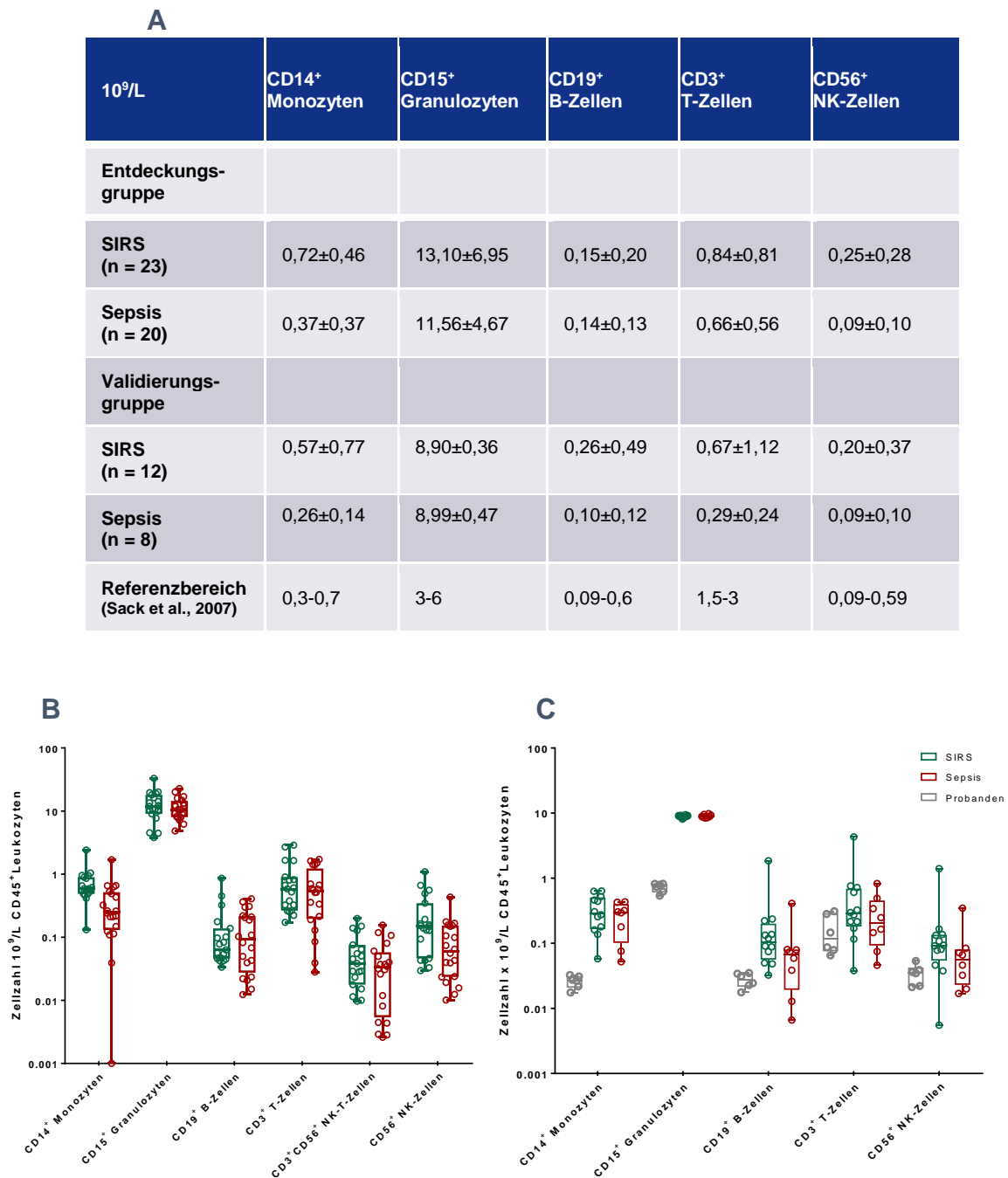


Abbildung 7: Durchflusszytometrische Verteilung der Leukozyten im Vollblut von Sepsis und SIRS Patienten bei Intensivaufnahme.

Verteilung der Gesamtleukozyten binnen 24 h nach Intensivaufnahme. **(A)** Tabellarische Darstellung der prozentualen Verteilung der Gesamtleukozyten mit Standardabweichung von Patienten der Entdeckungsgruppe und in der Validierungsgruppe. **(B)** Graphische Darstellung der prozentualen Verteilung der Gesamtleukozyten von Patienten der Validierungsgruppe und in **(C)** der Entdeckungsgruppe. Die Entdeckungsgruppe umfasst: SIRS n=23; Sepsis n=20 und die Validierungsgruppe: SIRS n=12; Sepsis n=8. Die statistische Analyse wurde mit der Two-Way ANOVA Varianzanalyse durchgeführt.

### 5.1.2 Durchflusszytometrische Analyse der Verteilung von NK-Zellen

Abbildung 8 demonstriert die Vollblut Gating Strategie Differenzierung der NK-Zellzustände mit CD11b und CD27 (Abbildung 1) im Rahmen der Querschnittsstudie. Diese gilt sowohl für Probanden als auch für Patienten mit SIRS und Sepsis.

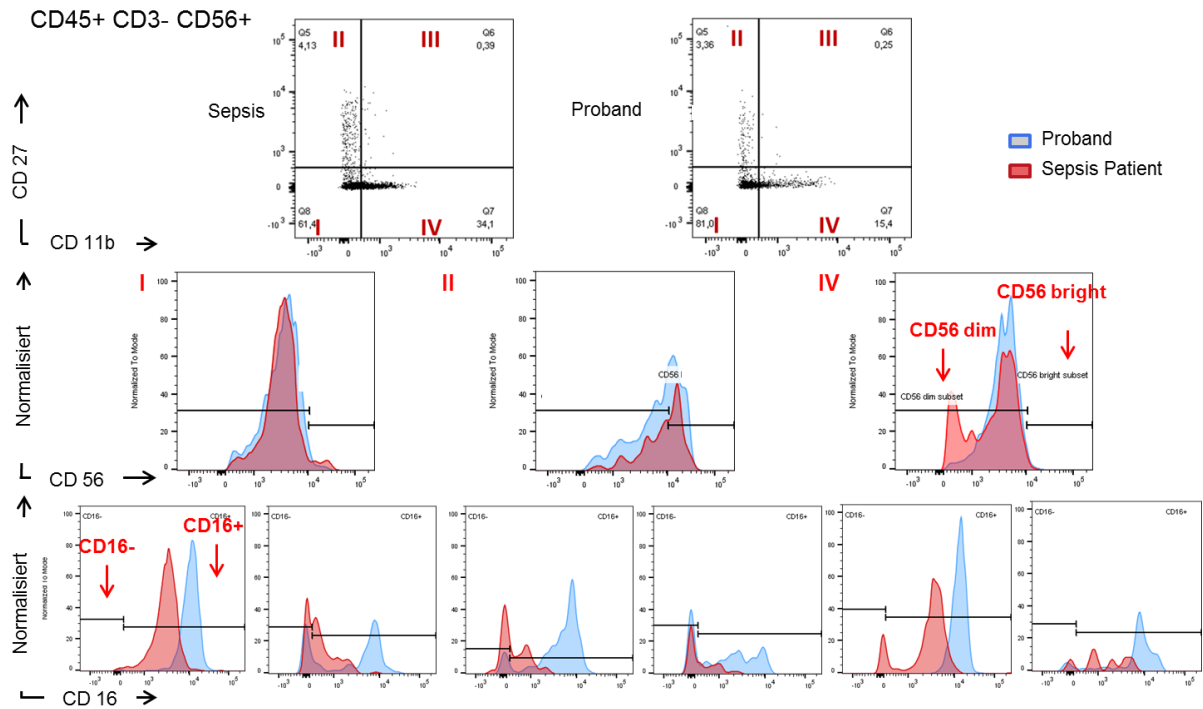


Abbildung 8: Repräsentatives Beispiel für die Gating Strategie zur Differenzierung der Reifung nach CD11b und CD27 mittels Durchflusszytometrie.

Aus den vier Stufen wurden mittels eines CD56 Histogramm die beiden Subpopulationen CD56<sup>dim</sup> sowie CD56<sup>bright</sup> unterschieden. In Beiden wurden mittels eines CD16 Histogramms die CD16 positiv Population bestimmt. Beispielhaft sind hier die Ergebnisse eines Probanden und eines Patienten mit Sepsis dargestellt.

In Abbildung 9 sind die peripheren Vollblutanalysen der SIRS- und Sepsis-Patienten binnen 24 Stunden nach Diagnose und Intensivaufnahme dargestellt. Die Differenzierung erfolgt über die Marker CD11b und CD27 (siehe Kapitel 2.2.2). Dabei zeigte sich vor allem in den NK-Zellen (Stadium IV) signifikante Unterschiede zwischen SIRS und gesunden Probanden. Bereits in Stadium II der NK-Zellen sind signifikante Unterschiede zu SIRS erkennbar. Weiter werden diese bei den Sepsis-Patienten in Stadium II und III gegenüber den gesunden Probanden deutlich.

#### A

%	I CD27 <sup>+</sup> CD11b <sup>-</sup>	II CD27 <sup>+</sup> CD11b <sup>+</sup>	III CD27 <sup>+</sup> CD11b <sup>+</sup>	IV CD27 <sup>-</sup> CD11b <sup>+</sup>
SIRS (n = 12)	59,18	3,77	15,64	21,39
Sepsis (n = 8)	43,11	2,21	32,26	22,43

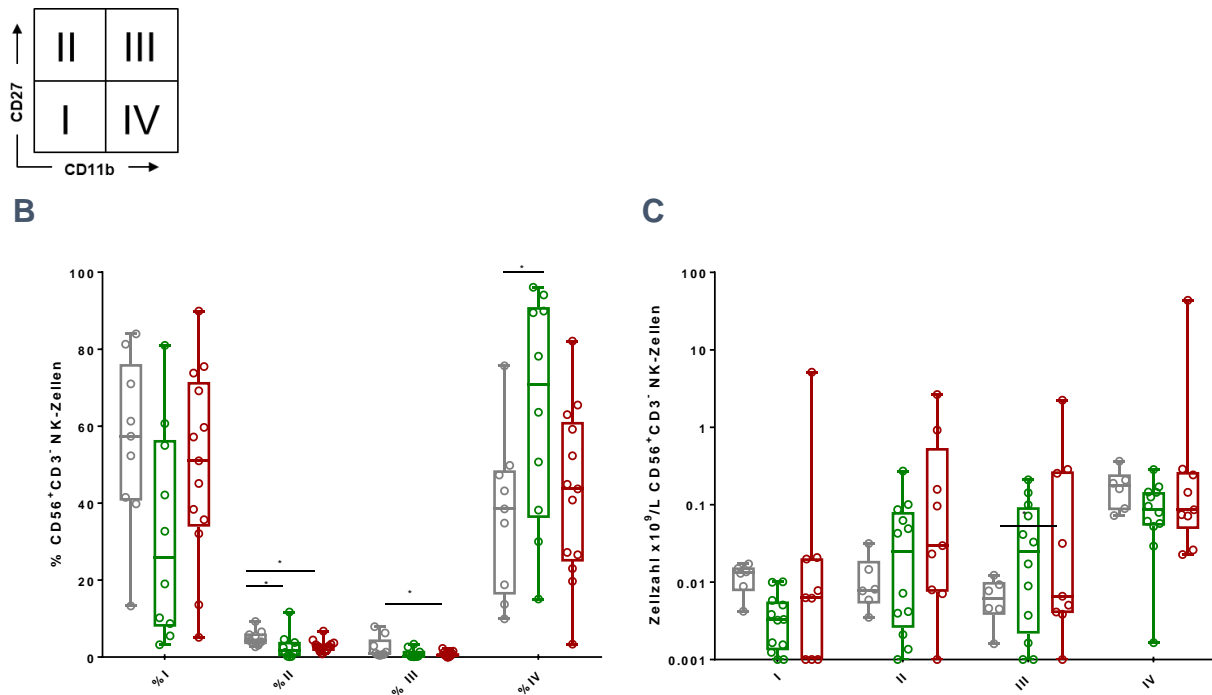
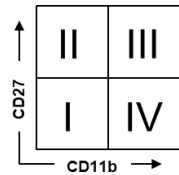


Abbildung 9: NK-Zell-Stadien der Patienten und Probanden der Entdeckungs- und Validierungsgruppe. Periphere durchflusszytometrische Vollblutanalysen von Patienten und gesunden Probanden im Rahmen der Entdeckungs- und Validierungsgruppe zur Identifizierung neuer Vollblutdifferenzierungsmarker zwischen SIRS und Sepsis. **(A)** zeigt die prozentuale Verteilung der NK-Zell-Stadien der Validierungsgruppe. **(B)** zeigt die graphische Darstellung der prozentualen Frequenz in der Entdeckungsgruppe und **(C)** die graphische Darstellung der absoluten Zellzahl der NK-Zell-Stadien in der Validierungsgruppe. Die Fallzahlen sind n=10 SIRS, n=13 Sepsis, n=9 Probanden für die Entdeckungsgruppe und n=12 SIRS, n=8 Sepsis, n=6 Probanden für die Validierungsgruppe. Die statistische Analyse wurde mittels Wilcoxon-Vorzeichen-Rang Test (\* $p < 0,05$ ) durchgeführt.

Signifikante Veränderungen lassen sich hinsichtlich der Anzahl der exprimierten CD16 Moleküle pro Zelle beobachten (Abbildung 10). Dies wird besonders in den Stadien III und IV deutlich. In Stadium II ( $CD27^+$ ) lassen sich sowohl Patienten mit SIRS, als auch mit einer Sepsis durch eine signifikant reduzierte CD16 MeFI pro Zelle einordnen. Dieser Effekt nimmt in Stadium III nochmal zu, sodass sich nicht nur eine Sepsis, sondern auch ein SIRS, signifikant von Probanden differenzieren lässt. Zusätzlich lässt sich in Stadium IV der NK-Zellen eine Differenzierung zwischen SIRS und Sepsis beobachten. Der prozentuale Anteil der  $CD16^+$  NK-Zellen innerhalb der Aktivierungszustände (Abbildung 10) bietet, ebenso wie die Relation der  $CD16^+$  Rezeptorexpression zur gesamten NK-Population (Daten nicht gezeigt), keinen signifikanten Unterschied (Abbildung 10).

**A**

% CD16	I CD27 <sup>-</sup> CD11b <sup>-</sup>	II CD27 <sup>+</sup> CD11b <sup>-</sup>	III CD27 <sup>+</sup> CD11b <sup>+</sup>	IV CD27 <sup>-</sup> CD11b <sup>+</sup>
SIRS (n = 10)	64,80	60,52	58,32	42,17
Sepsis (n = 13)	80,86	61,28	44,32	67,26
Proband (n = 9)	62,24	46,29	77,53	36,85



**B**

Zellzahl x 10 <sup>9</sup> /L	I CD27 <sup>-</sup> CD11b <sup>-</sup>	II CD27 <sup>+</sup> CD11b <sup>-</sup>	III CD27 <sup>+</sup> CD11b <sup>+</sup>	IV CD27 <sup>-</sup> CD11b <sup>+</sup>
SIRS (n = 12)	8,60±6,23	0,18±0,23	4,55±7,61	1,66±2,07
Sepsis (n = 8)	6,64±6,01	0,20±0,18	8,37±12,54	4,33±9,21

**C**

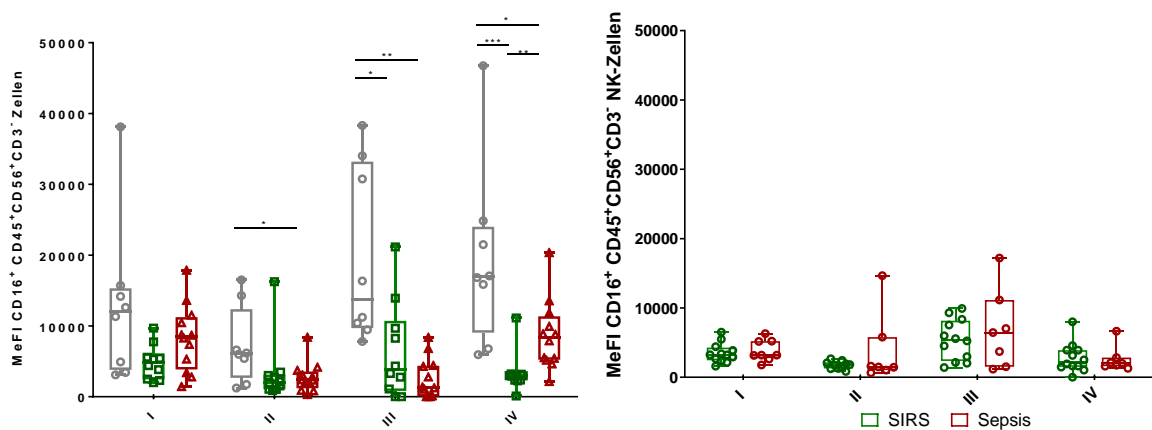


Abbildung 10: Durchflusszytometrische Vollblutanalyse der CD16 Expression in Abhängigkeit des NK-Zell Differenzierungsstadiums in Patienten und Probanden. Periphere Vollblutanalysen von Patienten und Probanden zur Identifizierung neuer Vollblut Differenzierungsmarker zwischen SIRS und Sepsis. **(A)** präsentiert die prozentuale Verteilung  $\pm$ SEM der CD16 Expression in den Substadien der Entdeckungsgruppe. **(B)** zeigt die absolute Zellzahl mit Standardabweichung der CD16<sup>+</sup> NK-Zellen je Differenzierungszustand in der Validierungsgruppe. **(C)** demonstriert die graphische Darstellung der MeFI CD16 Expression in der Entdeckungsgruppe und in **(D)** in der Validierungsgruppe. Verteilung in der Entdeckungsgruppe ist n=10 SIRS, n=13 Sepsis, n=9 gesunde Probanden und in der Validierungsgruppe n=12 SIRS, n=8 Sepsis sowie n=4 Probanden. Die statistische Analyse wurde mit dem Wilcoxon-Vorzeichen-Rang Test durchgeführt, dabei gilt \*p<0,05, \*\*p<0,01 und \*\*\*p<0,001.

### 5.1.3 Genexpressionsanalyse bei Patienten mit SIRS und Sepsis

Genexpressionsanalysen (Abbildung 11) wurden von ausgewählten Genen der Transkriptom- und Pathwayanalyse (siehe Kapitel 2.6) bei Patienten mit SIRS und Sepsis als quantitative, relative Änderungen in den Expressionsleveln von drei Genen durch Real-Time PCR bestimmt. Als endogenes Kontrollgen diente AKIRIN-1 (Coulibaly et al., 2019). Für *FCGR3A* (Low affinity immunoglobulin gamma Fc region

receptor III-A), das Gen für CD16a, lässt sich ein leichter Abfall bei Sepsis-Patienten im Vergleich zu SIRS beobachten. Für *GAPDH* (Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase), ein an der Spaltung von Glukose mit Ziel der Energiegewinnung beteiligtes Enzym, ist eine leichte Hochregulation bei Sepsis im Vergleich zu SIRS ablesbar. Ebenfalls kann festgestellt werden, dass das nukleare Protein H2A Histon Familie Mitglied Z (*H2AFZ*) verantwortlich für die nukleosomale Struktur des chromosomalen Gerüsts in Eukaryonten ist. Es ändert sich in Sepsis Patienten gegenüber SIRS Patienten nicht (Hatch und Bonner, 1990; Patowary et al., 2012).

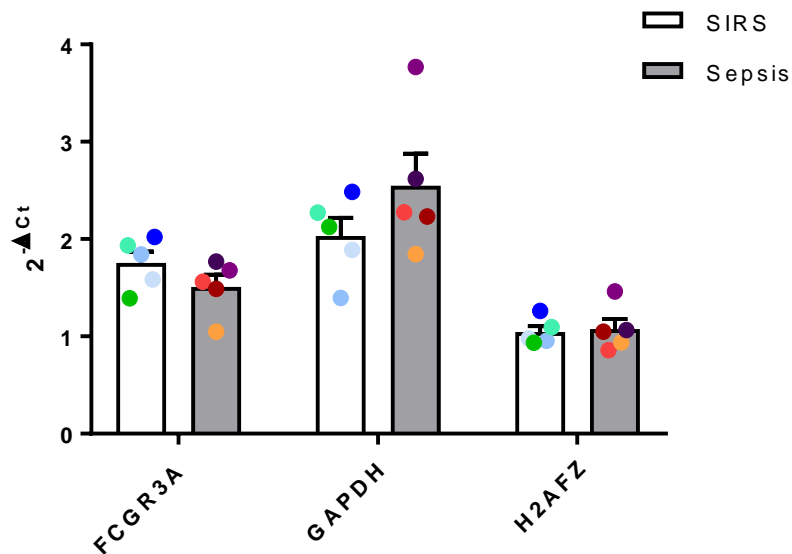


Abbildung 11: Genexpressionsanalyse ausgewählter Gene der Transkriptomanalyse aus Patienten mit SIRS und Sepsis bei Intensivaufnahme der Entdeckungsgruppe.

Die Gene sind anhand der Transkriptomanalysen ausgewählt. AKIRIN-1 wird als endogenes Kontrollgen verwendet. Für jeden Patienten sind die linearisierten Quantitäten ( $2^{-\Delta Ct}$ ) als Mittelwert mit SEM dargestellt. Die Daten in den Kreisen repräsentieren die einzelnen Werte der Patienten; SIRS n=5 und Sepsis n=5.

#### 5.1.4 Quantifizierung der Plasmakonzentrationen von NK-Zell- und Sepsis-assoziierten Proteinen

Die Analyse der Plasmaproteinkonzentrationen wurde aus dem EDTA-Plasma von Patienten mit einem Übergang von SIRS nach Sepsis im Rahmen der longitudinalen Studie (siehe Kapitel 4.9.1) durchgeführt. Zwischen Juni 2016 und August 2018 wurden 85 Patienten in die longitudinale Studie eingeschlossen. Hiervon hatten sieben Patienten einen Übergang von SIRS nach Sepsis. Ein Polytrauma war in allen sieben Patienten Ätiologie zur Intensivaufnahme. Die Proteinkonzentrationen der SIRS Patienten wurden bei Studieneinschluss, jeweils morgendlich um sieben Uhr, sowie acht Stunden vor der Diagnosestellung einer Sepsis, mit den Proteinkonzentrationen von zwei bis drei morgentlichen Zeitpunkten (gemäß ärztlicher Einschätzung) nach Übergang zur Sepsis verglichen. Aus den Einzelwerten wurden die Mittelwerte vor und nach dem Übergang zur Sepsis gebildet und verglichen (siehe Kapitel 4.9.1).

Die Literatur schreibt den proinflammatorischen Zytokinen IL-2, IL-6, IL-12, IL-15 und TNF- $\alpha$  eine Beteiligung an der Initiation und Aktivierung von Entzündungsreaktionen zu (siehe Kapitel 2.2.2). Die Zytokine aktivieren NK-Zellen und sind während der Sepsis erhöht. Die mittleren Konzentrationen zeigen für proinflammatorische Zytokine keine Unterschiede für die Übergänge zwischen SIRS und Sepsis. Simultan ist ein signifikanter Anstieg des IL-6 Rezeptor  $\alpha$  (Abbildung 12 sIL-6Rezeptor  $\alpha$ ) nach dem Übergang von SIRS zu Sepsis zu beobachten. Die antiinflammatorischen Zytokine IL-4, IL-10, IL-13 zeigen dagegen keinen signifikanten Unterschied beim Übergang von SIRS zu Sepsis. NK-Zellen können durch Aktivierung Chemokine sekretieren, die für die Migration hin zum Ort der Inflammation notwendig sind. Für CCL5 zeigt sich eine signifikanter 2,6 x Steigerung der mittleren Plasmakonzentration (Abbildung 12 CCL5). CCL3 und CCL4 hingegen zeigen keinerlei Unterschiede in der Sepsis gegenüber SIRS. Für die Sekretion der Effektormoleküle Granzyme A, Granzyme B und Perforin ergeben sich keine Änderungen. Granzyme A ist in Abbildung 12 nicht dargestellt, da es nur für zwei Proben bestimmbar war. Arginase-1 und VEGF können diverse immunmodulatorische Effektorfunktionen im humanen Organismus übernehmen, aber auch sie zeigen keine Änderung.

CCL3, IL-2, IL-13 und VEGF waren bei sechs Patienten bestimmbar. IL-12p40 konnte in fünf Patienten bestimmt werden.

Zusammenfassend lässt sich somit festhalten, dass es lediglich für das Chemokin CCL5 und für die Expression des sIL-6 Rezeptor  $\alpha$  zu signifikanten Änderungen kommt.



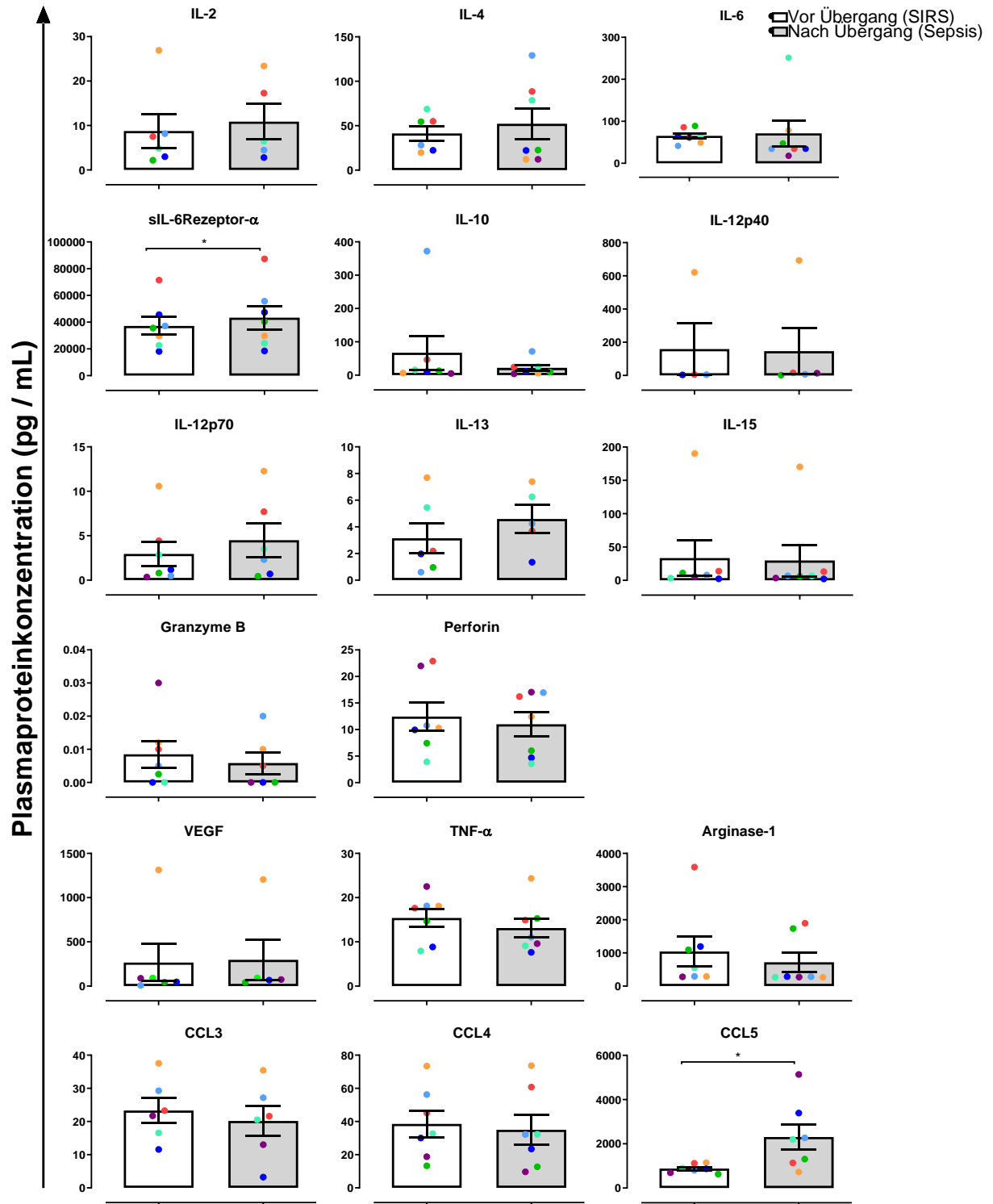


Abbildung 12: Plasmaproteinkonzentrationen von Patienten mit Übergang von SIRS nach Sepsis.

Die Proteinsekretion wurde aus dem EDTA-Plasma von Patienten mit einem Übergang von SIRS nach Sepsis im Rahmen der longitudinalen Studie (Kapitel 4.9.1) bestimmt (n=7). Die Proteinkonzentrationen der Mittelwerte der Einzelwerte vor dem Übergang (bei Studieneinschluss, morgens um 7 Uhr, sowie acht Stunden vor Diagnose Sepsis) von SIRS nach Sepsis (gemäß ärztlicher Einschätzung) sind mit denen nach dem Übergang verglichen. Die statistische Auswertung erfolgt mit dem Wilcoxon-Vorzeichen-Rang Test, dabei gilt \*p < 0,05.

## 5.2 Metabolische Aktivität und Effektorfunktionen von NK-Zellen *in vitro*

Frühe Veränderungen des Metabolismus, insbesondere Veränderungen der Glykolyse und der Effektorfunktionen, unter IL-15 Priming und unter Berücksichtigung von sekundären Stimuli, werden in den nachfolgenden Kapiteln mittels einem *in vitro* Modell analysiert. Bei Patienten mit systemischen Inflammationen ist von einem kurzfristigen Priming mit verzögertem zeitlichen Kontakt und sekundären Stimuli unter hypoxischen Bedingungen am Ort der Inflammation auszugehen. Die hierzu verwendeten Stimulation- und Konditionierungsschemata sind in Abbildung 13 dargestellt. Eine hypoxische Konditionierung fand direkt nach Isolierung der NK-Zellen von Probanden für 16 Stunden statt. Daran konnte sich ein Priming über sechs Stunden sowie nach Bedarf eine sekundäre Stimulation über weitere vier Stunden anschließen. Die senkrechten Linien repräsentieren die Zeitpunkte der Zellernte. Dadurch ist es möglich ein Modell unter Berücksichtigung eines zeitlich verzögerten Eintreffens der unterschiedlichen Zytokine, sowie die veränderten Sauerstoffpartialdrucke im inflammatorischen Mikromilieu zu entwickeln.

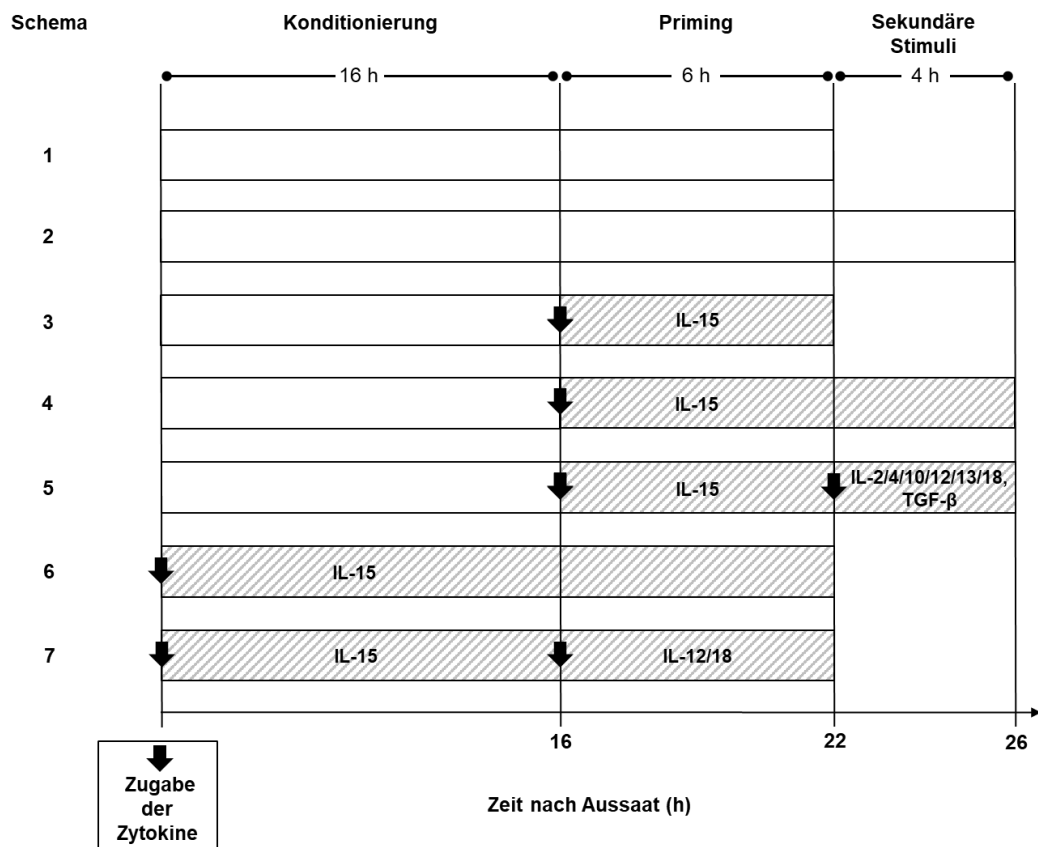


Abbildung 13: Schema zur Konditionierung und Stimulation von NK-Zellen aus Probanden

Velasquez et al. (2016) zeigten, dass eine hypoxische Konditionierung von mit IL-15 geprimten, humanen NK-Zellen die transkriptionelle Hochregulation von glykolytischen Genen aktiviert. Dabei sind die Gene der mit HIF-1 $\alpha$ - und dem Glykolyse-Signalweg assoziierten transkriptionellen Signaturen besonders aktiv. Die Effekte des Primings, mit sekundärer Stimulation durch sowohl proinflammatorischen (IL-12, IL-18) als auch antiinflammatorischen (IL-4, IL-10, IL-13, TGF- $\beta$ ) Zytokinen auf den Metabolismus sowie deren Effektorfunktionen wurden innerhalb dieses Projekts untersucht

(Schema 5). Wie Abbildung 13 zeigt, wurden hierfür frisch isolierte humane periphere NK-Zellen über Nacht (16h) unter Normoxie (20% O<sub>2</sub>), chemisch-induzierter Hypoxie (DMOG und JNJ) oder Hypoxie (1% O<sub>2</sub>) konditioniert. Sie verblieben entweder unbehandelt (Schema 1 und 2; unst) oder wurden folglich einem Priming mit IL-15 für die finalen sechs oder zehn Stunden der Zellkultur unterzogen (Schema 3 und 4). Schema 6 und 7 (üN) zeigen eine direkte Stimulation nach Isolierung mit IL-15. Zur Analyse des Effekts eines zeitlich versetzten Kontakts mit unterschiedlichen Stimuli, wie es im Verlauf einer Inflammation zu erwarten ist, werden einzelne anti- und proinflammatorische Zytokine oder deren Kombination daraus nach sechsstündigem Priming für die finalen vier Stunden hinzugefügt. So lässt sich dieses Modell zur Untersuchung der Metabolischen Aktivität und neuer Biomarker verwenden.

### 5.2.1 Rolle der *in vitro* Hypoxiekonditionierung und sekundären Stimulation auf Phänotyp, Effektorfunktionen und metabolisches Profil

Unveröffentlichte Vorarbeiten der Arbeitsgruppe PD Dr. Lindner zeigten, dass bei Patienten mit SIRS und Sepsis in der Transkriptomanalyse der Kohlenstoff Metabolismus signifikant zwischen den beiden Gruppen differenziert (Abbildung 3). Konsequenterweise untersucht diese Arbeit, als Referenz für die Glykolyse, zuerst den Effekt des Primings, sechs Stunden IL-15, auf den glykolytischen Flux (Abbildung 14). Da in Inflammationen ein hypoxisches Mikromilieu herrscht, wurden sowohl die Ergebnisse der primären als auch der sekundären Stimulation unter Hypoxie analysiert. Zunächst wurde der Einfluss von IL-15 Priming bei zeitgleicher kurzzeitiger Hypoxie auf die metabolische Aktivität genauer beleuchtet. Hierfür wurden extrazelluläre Flussanalysen zur Messung der ECAR genutzt, da diese die glykolytische Rate reflektieren. Die Echtzeitbeobachtungen des glykolytischen Metabolismus unter Hypoxie (1% O<sub>2</sub>) zeigten lediglich einen leichten Trend zum gesteigerten glykolytischen Flux bei IL-15 geprimten Zellen (Abbildung 15). Deshalb werden NK-Zellen chemisch-induzierter Hypoxie (DMOG und JNJ) ausgesetzt. Diese Inhibitoren der Prolyl-Hydroxylasen (PHDs), können HIF-1 $\alpha$  stabilisieren und zu einer gesteigerten glykolytischen Aktivität beitragen (Kapitel 2.2.3). Die glykolytische Aktivität durch ein kurzes IL-15 Priming mit DMOG und JNJ präkonditionierten NK-Zellen demonstrieren im Vergleich zur Normoxie eine signifikante Steigerung ( $p < 0,05$  bzw.  $p < 0,01$ ) (Abbildung 14A).

Obwohl sowohl DMOG als auch JNJ die Glykolyse steigern kommt es nur bei mit JNJ behandelten NK-Zellen zu einer Steigerung der glykolytischen Kapazität. Diese glykolytische Kapazität ist in mit JNJ behandelten NK-Zellen leicht hochreguliert ( $p < 0,05$ ) (Abbildung 14 B), wobei die glykolytische Reserve in DMOG-behandelten NK-Zellen nahezu fehlt ( $p < 0,05$ ) (Abbildung 14C). Darauf aufbauend zeigt Abbildung 15, die Abhängigkeit der Glykolyse von einem zweiten Stimulus (für die finalen vier Stunden) bis zur vollen Aktivierung (gemäß Abbildung 13 Schema 5).

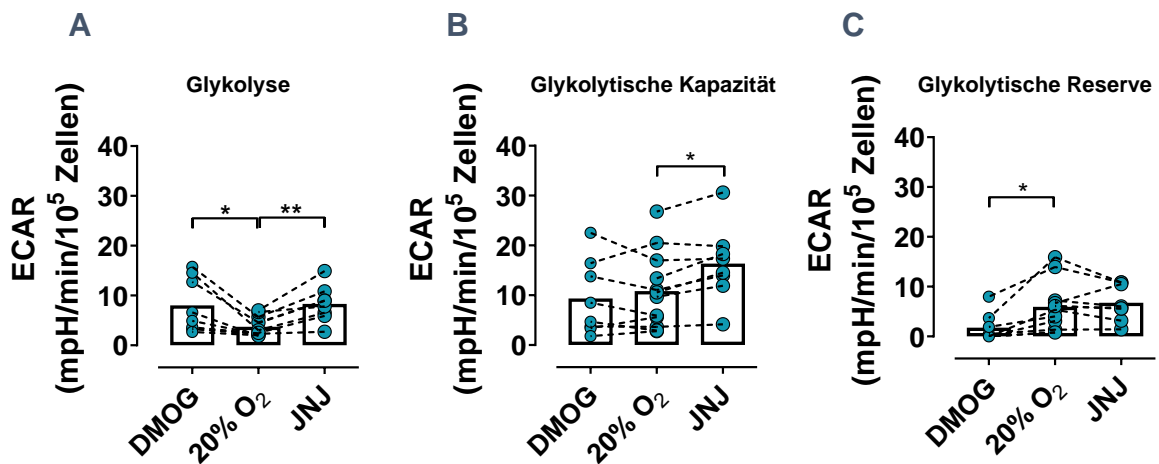


Abbildung 14: Chemische Hypoxie führt bei IL-15 geprimten NK-Zellen zu erhöhtem glykolytischem Flux. Die NK-Zellen wurden einer DMOG- oder JNJ-Behandlung zur Analyse der Azidifizierungsrate und des glykolytischen Flux ausgesetzt. **(A)** zeigt den glykolytischen Flux unter den chemisch-induzierter Hypoxie nach IL-15 Priming (6h). **(B)** repräsentiert die glykolytische Kapazität und **(C)** die glykolytische Reserve unter DMOG-, JNJ-Behandlung und Umgebungssauerstoff nach IL-15 Priming. (n=6) Die statistische Auswertung erfolgt mittels Wilcoxon-Vorzeichen-Rang Test, dabei gilt \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ .

Hierzu wurden periphere, humane NK-Zellen der Probanden über Nacht (22h) unter Normoxie oder Hypoxie konditioniert und nach Bedarf mit IL-15 für die finalen sechs Stunden stimuliert (Abbildung 15 A). So kann die extrazelluläre Azidifizierungsrate bestimmt und damit Rückschlüsse auf die glykolytische Rate gezogen werden. Eine Konditionierung unter Hypoxie mit nachfolgendem IL-15 Priming führt zu einer signifikant gesteigerten, glykolytischen Azidifizierungsrate. Die Auswirkungen sekundärer Stimuli auf die Glykolyse der präkonditionierten und sekundär stimulierten NK-Zellen wurden in den nachfolgenden Schritten überprüft.

Hierfür wurde der glykolytische Flux von humanen NK-Zellen in Antwort auf ein Priming oder gefolgt von einer sekundären Stimulation mit den proinflammatorischen Zytokinen IL-12 und IL-18, respektive den letzteren beiden alleine, für die letzten vier Stunden getestet.

Unter Normoxie und sequentieller Behandlung von IL-15 geprimten NK-Zellen und der weiteren Kombinationsstimulation aus IL-12 und IL-18 kommt es, im Vergleich zum alleinigen IL-15 Priming, zu einem signifikant erhöhten glykolytischen Fluss (Abbildung 15 B). Die Untersuchung der Auswirkung einer zweistufigen Stimulation mit proinflammatorischen Zytokinen (Abbildung 15 C) unter physiologischer Hypoxie zeigt einen gesteigerten glykolytischen Fluss in primär mit IL-15 geprimten und sequentiell mit IL-12 und IL-18 stimulierten NK-Zellen gegenüber der nicht stimulierten NK-Zellen.

Die Effekte der antiinflammatorischen Zytokinen (IL-4, IL-10, IL-13 und TGF- $\beta$ ) auf die Glykolyse wurden zusätzlich betrachtet. Hierzu wurden die NK-Zellen zunächst über Nacht bei Normoxie oder unter DMOG-Behandlung konditioniert (16h), folgend mit IL-15 geprimt (zehn Stunden), für die letzten vier Stunden mit dem entsprechenden antiinflammatorischen Zytokin versetzt. Anschließend wurde der glykolytische Fluss vermessen. Es können keine Veränderungen im glykolytischen Fluss detektiert werden (Abbildung 15 E-H). Es deutet darauf hin, dass alle signifikanten Steigerungen durch die Hypoxie ausgelöst werden.

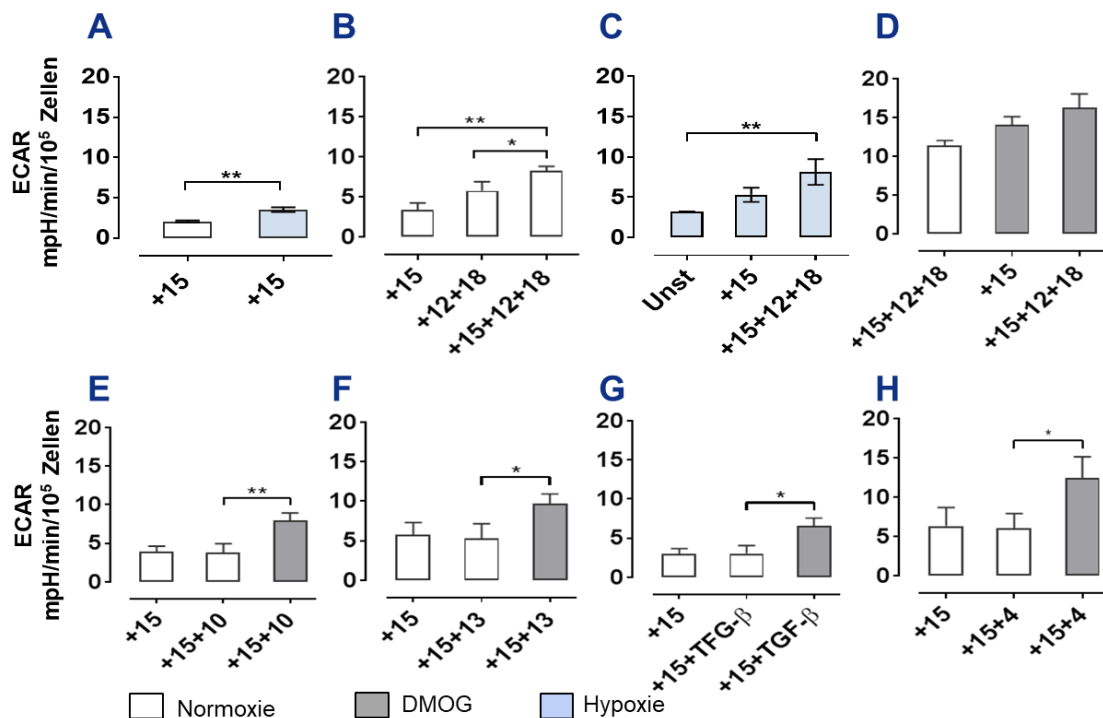


Abbildung 15: Auswirkungen der Hypoxie und sekundären Stimuli auf die Azidifizierungsrate.

Die Diagramme zeigen die Ergebnisse des Glykolyse Stress Tests stimuliertet NK-Zellen der Probanden (n=3). **(A)** zeigt die Glykolyse nach IL-15 Priming (6h) unter Normoxie und Hypoxie. **(B)** präsentiert die Rate der Glykolyse unter Normoxie im Vergleich der Stimulationsbedingungen IL-15 (10h), IL-12 plus IL-18 (nur finale 4h) sowie IL-15 (10h) mit sekundären Stimuli IL-12/IL-18 (finale 4h). **(C)** Analyse der Glykolyse unter Hypoxie mit den unterschiedlichen Stimuli 10h. **(D)** Zweistufigen Stimulation (10h) mit IL-15 und gegebenenfalls für die finalen 4h IL-12 plus IL-18 unter Normoxie und DMOG im Vergleich. **(E)** Einfluss von antiinflammatorischem IL-10 (finale 4h) nach IL-15 Priming unter Normoxie und DMOG auf den glykolytischen Flux. **(F)** Einfluss von antiinflammatorischem IL-13 (finale 4h) nach IL-15 Priming unter Normoxie und DMOG auf den glykolytischen Flux. **(G)** Einfluss von antiinflammatorischem TGF-β (finale 4h) nach IL-15 Priming unter Normoxie und DMOG auf den glykolytischen Flux. **(H)** Einfluss von antiinflammatorischem IL-4 (finale 4h) nach IL-15 Priming unter Normoxie und DMOG auf den glykolytischen Flux. In weiß sind Analysen unter Normoxie, in grau unter DMOG-Behandlung und in hellblau unter Hypoxie dargestellt. Die statistische Auswertung basiert auf One-Way Anova. Es gilt \*p<0,05; \*\*p<0,01.

Zusammenfassend lässt sich anhand dieser Daten aufzeigen, dass IL-15 geprimte NK-Zellen den glykolytischen Fluss nach Präinkubation unter Hypoxie oder in Antwort auf sekundäre Stimulation mit IL-12 und IL-18 steigern. Dem gegenüber verharren NK-Zellen nach Kontakt mit antiinflammatorischen Zytokinen ohne eine Steigerung des glykolytischen Metabolismus.

### 5.2.2 Gesteigerte Funktionalität und Frequenz der Effektormoleküle durch *in vitro* sekundäre Stimuli

Aus Vorarbeiten dieser Gruppe sowie anderen Studien ist bereits bekannt, dass IL-15 Priming (sechs Stunden) die Effektorfunktionen von NK-Zellen fördert (Alter et al.,

2005; Velasquez et al., 2016). Bei Patienten mit SIRS und Sepsis ist aufgrund des inflammatorischen Mikromilieus davon auszugehen, dass NK-Zellen unter anderem mit diesem Zytokin konfrontiert sind. Die genauen Effekte sowie die Signalwege nach kurz- und mittelfristigem Priming sind nicht umfassend bekannt. Deshalb wurden im Rahmen dieser Dissertation die Effekte der mittelfristiger (26h) beziehungsweise kurzfristigen (6-10h) Stimulation gegen das Priming (6h) mit IL-15, sowie die zusätzlichen Veränderungen durch eine sekundäre Stimulation mit IL-12 und IL-18 der Probanden NK-Zellen, anhand der IFN- $\gamma$  Produktion und der Effektorfunktionen bestimmt. Das Priming mit IL-15 und die anschließende Stimulation mit IL-12 und/oder IL-18 für die finalen vier oder sechs Stunden lassen Rückschlüsse auf IFN- $\gamma$ -Produktion sowie Expression von Effektormechanismen und damit auf die NK-Zell-Aktivität zu. Die kurz- und mittelfristige Stimulation der NK-Zellen mit IL-15, gefolgt von einer sekundären Stimulation mit einem einzelnen proinflammatorischen Zytokin zeigt keinerlei Veränderungen in der IFN- $\gamma$ -Produktion (Abbildung 16 A). Eine kurzfristige Stimulation (zehn Stunden) mit IL-15 und anschließender Kombinationsstimulation von IL-12 und IL-18 bewirkt eine ähnlich hohe Fähigkeit zur Induktion der IFN- $\gamma$ -Produktion, wie sie bei einer mittelfristigen Stimulation (26h) mit IL-15 und zusätzlichen Stimulation (IL-12 plus IL-18) vorliegt (Abbildung 16). Ähnliche Muster waren in der IFN- $\gamma$ -Expression pro Zelle (MeFI) von IL-15 geprimten und sekundär mit IL-12 und IL-18 stimulierten NK-Zellen zu beobachten (Abbildung 16 B).

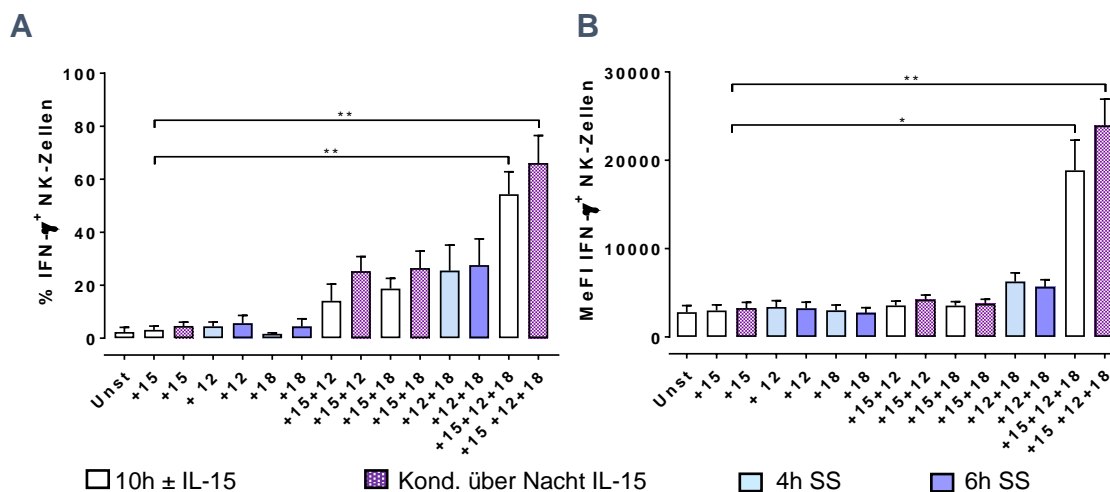


Abbildung 16: Frequenz und Mediane Fluoreszenzintensität der IFN- $\gamma$  produzierenden NK-Zellen.

Stimulation gemäß der Konditionen in Abbildung 13 unter Umgebungssauerstoff der NK-Zellen aus Buffy Coats (n=5). **(A)** zeigt die prozentuale Verteilung der IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> NK-Zellen. **(B)** zeigt die IFN- $\gamma$  MeFI. Eine sekundäre Stimulation mit IL-12 und/oder IL-18 erfolgte für die finalen 4h oder 6h. Für signifikante Veränderungen zwischen Normoxie gilt gemäß Kruskal-Wallis-Test (Varianzanalyse) \*p < 0,05; \*\*p < 0,01. Kond entspricht einer Konditionierung mit IL-15 über Nacht, SS entspricht einer sekundären Stimulation für die finalen 4h respektive 6h.

Da in Inflammationen ein hypoxisches Mikromilieu herrscht, wurden die Ergebnisse der sekundären Stimulation unter Hypoxie analysiert. Deshalb erfolgte eine weitere Konditionierung über Nacht unter Normoxie oder chemisch-induzierter Hypoxie (DMOG) mit IL-15 geprimten NK-Zellen (sechs Stunden) und sequentieller sekundärer NK-Zell-Stimulation für die finalen vier Stunden. Der Einfluss der DMOG-Behandlung zeigt eine einheitliche reduzierte Frequenz und MeFI der IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> NK-Zellen im

Vergleich zur Normoxie. Signifikant ist der Abfall der IFN- $\gamma^+$  Frequenz im Vergleich von Normoxie gegen DMOG (Abbildung 17 CD56<sup>+</sup> NK-Zellen). Ein signifikanter Anstieg der IFN- $\gamma$  Sekretion wird durch die Co-Stimulation mit IL-15 und IL-12 plus IL-18 initiiert (Abbildung 17 CD56<sup>+</sup> NK-Zellen). Der Prozentanteil der IFN- $\gamma^+$  NK-Zellen verdoppelt sich im Vergleich zu den getrennten IL-15 oder IL-12 plus IL-18 Prozentanteilen. Noch deutlicher ist dieser Effekt in der Anzahl der IFN- $\gamma$  Moleküle pro Zelle unter Normoxie. Dabei vervierfachen sich die IFN- $\gamma$  MeFI Werte im Vergleich zu den Einzelstimulationen.

Bei CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen (Abbildung 17 CD56<sup>bright</sup>) zeichnet sich ein signifikanter Anstieg der IFN- $\gamma$  Produktion durch Priming und sekundäre Stimuli mit IL-12 und IL-18 ab. Dies präsentiert sich sowohl in einem Anstieg der prozentualen Anteile an IFN- $\gamma^+$  NK-Zellen, als auch in ihrer MeFI und zeigt einen klar synergistischen Effekt der einzelnen proinflammatorischen Zytokine. Dieser signifikante Anstieg ist in CD56<sup>dim</sup> NK-Zellen unter Normoxie (Abbildung 17 CD56<sup>dim</sup>) ebenfalls zu beobachten. Generell ist bei den Subpopulationen festzuhalten, dass eine DMOG-Behandlung einen inhibitorischen Effekt auf die IFN- $\gamma$  Sekretion der NK-Zellen ausübt. Des Weiteren ist eine geringere IFN- $\gamma$  MeFI unter DMOG-Behandlung zu beobachten.

Diese Daten zeigen, dass die IL-15 Priming die humane NK-Zell-Kapazität bewahrt und die IFN- $\gamma$  Produktion induziert. Eine sekundäre Stimulation mit proinflammatorischen Zytokinen fördert die IFN- $\gamma$  Sekretion über die durch Priming induzierte IFN- $\gamma$  Produktion hinaus.

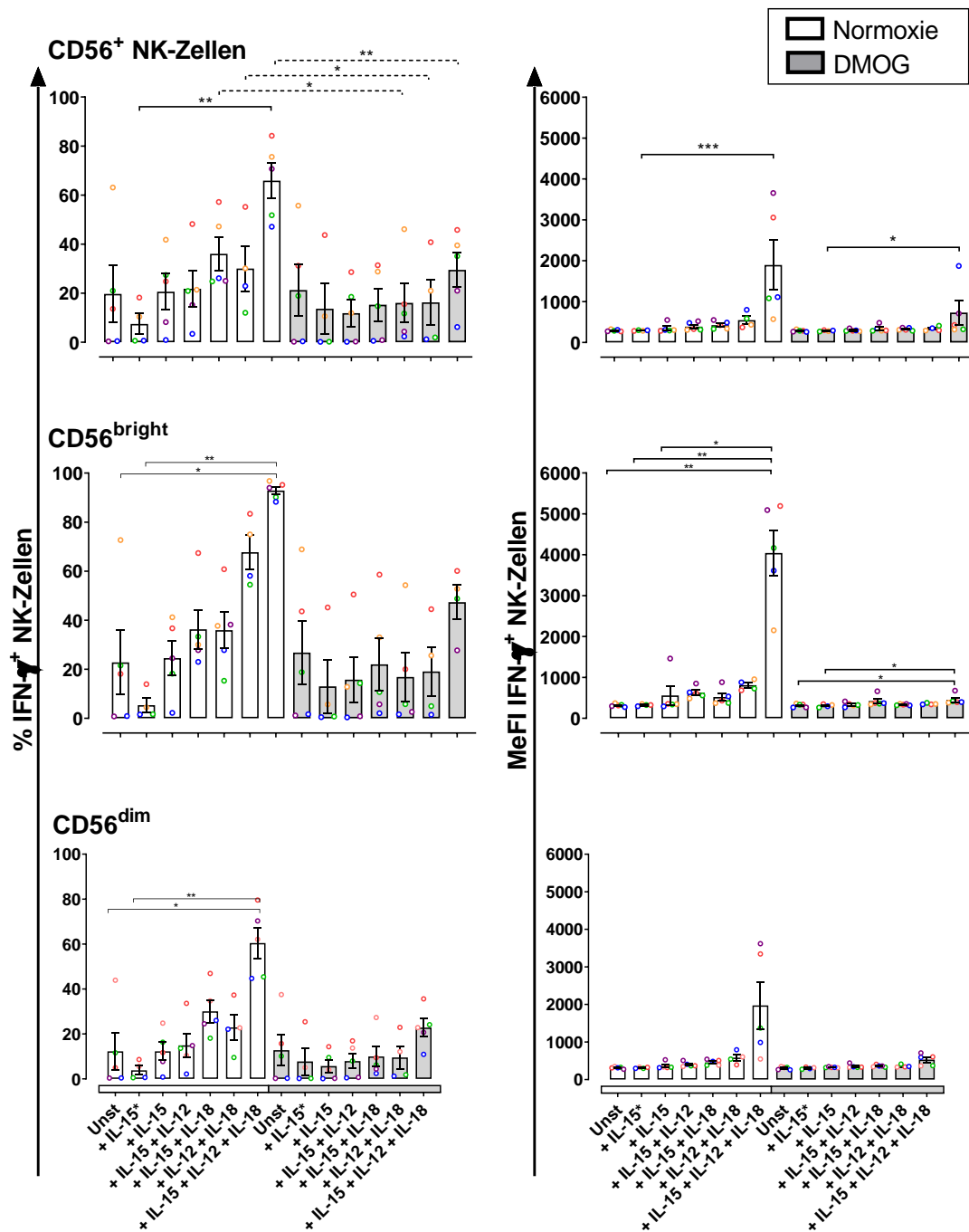


Abbildung 17: Durchflusszytometrische Bestimmung von Frequenz und medianer Fluoreszenzintensität der IFN- $\gamma$  produzierenden NK-Zellen unter Normoxie und DMOG-Behandlung.

Der Versuch wurde unter Normoxie und DMOG durchgeführt (n=6). Die NK-Zellen sind präkonditioniert und anschließend für 10h alleine oder sequenziell stimuliert. Eine Ausnahme hiervon bildet +IL-15\*. Diese sind für 6h mit IL-15 inkubiert. **(CD56<sup>+</sup> NK-Zellen)** Prozentuale Anteile der IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> NK-Zellen und deren IFN- $\gamma$  MeFI pro NK-Zelle. **(CD56<sup>bright</sup>)** Prozentuale Anteile der IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen und deren IFN- $\gamma$  MeFI pro CD56<sup>bright</sup> NK-Zelle. **(CD56<sup>dim</sup>)** Prozentuale Anteile der IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> CD56<sup>dim</sup> NK-Zellen und deren IFN- $\gamma$  MeFI pro CD56<sup>dim</sup> NK-Zelle. Die statistischen Auswertungen beruhen auf dem Kruskal-Wallis-Test (Varianzanalyse). Für signifikante Veränderungen zwischen Normoxie und DMOG gilt \*p < 0,05; \*\*p < 0,01.

Die Expressionsmuster der Effektormoleküle Perforin und Granzyme B bleiben in Antwort auf die unterschiedlichen Stimulationskonditionen, sowohl unter Normoxie als



auch unter chemisch-induzierter Hypoxie, unverändert (Abbildung 18 CD56<sup>+</sup> Granzyme B und Perforin). Dies zieht sich ebenfalls durch ihre Subpopulationen hinweg. Bei DMOG präkonditionierten CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen zeigt sich unter allen Stimulationsschemata ein Trend hin zu einer geringen MeFI. Dies ist sowohl für die MeFI von Granzyme B als auch für Perforin zu beobachten (Anhang Abbildung 43 CD56<sup>bright</sup>).

Durchflusszytometrische Analysen der Frequenz der CD16<sup>+</sup> NK-Zellen aus gesunden Probanden, sowie deren MeFI zeigen eine partielle Steigerungen auf die Behandlung mit Zytokinen und Hypoxie (Abbildung 18). Es sind knapp 25% aller CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen CD16<sup>+</sup>, während nahezu alle CD56<sup>dim</sup> NK-Zellen CD16<sup>+</sup> sind. Dabei ist festzustellen, dass bei fehlender IL-15-Zugabe und gleichzeitig Zugabe von IL-12 und IL-18 es zu einer tendenziell reduzierten CD16 Expression auf CD56<sup>dim</sup> NK-Zellen kommt. Dieser Effekt ist unter Normoxie ausgeprägter als unter DMOG-Behandlung. Zusätzlich ist eine signifikante Steigerung der CD16<sup>+</sup> Frequenz von CD56<sup>dim</sup> NK-Zellen nach sequentieller Stimulation (IL-12 plus IL-18) von IL-15 geprimten NK-Zellen (Abbildung 18 CD56<sup>dim</sup>) im Vergleich CD56<sup>dim</sup> NK-Zellen, die nur IL-15 ausgesetzt sind. Auf CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen lässt sich eine Tendenz zur reduzierten CD16 MeFI pro Zellen unter DMOG-Behandlung verzeichnen (Abbildung 18 CD56<sup>bright</sup>). Dieser Trend setzt sich auf CD56<sup>dim</sup> NK-Zellen nicht fort.

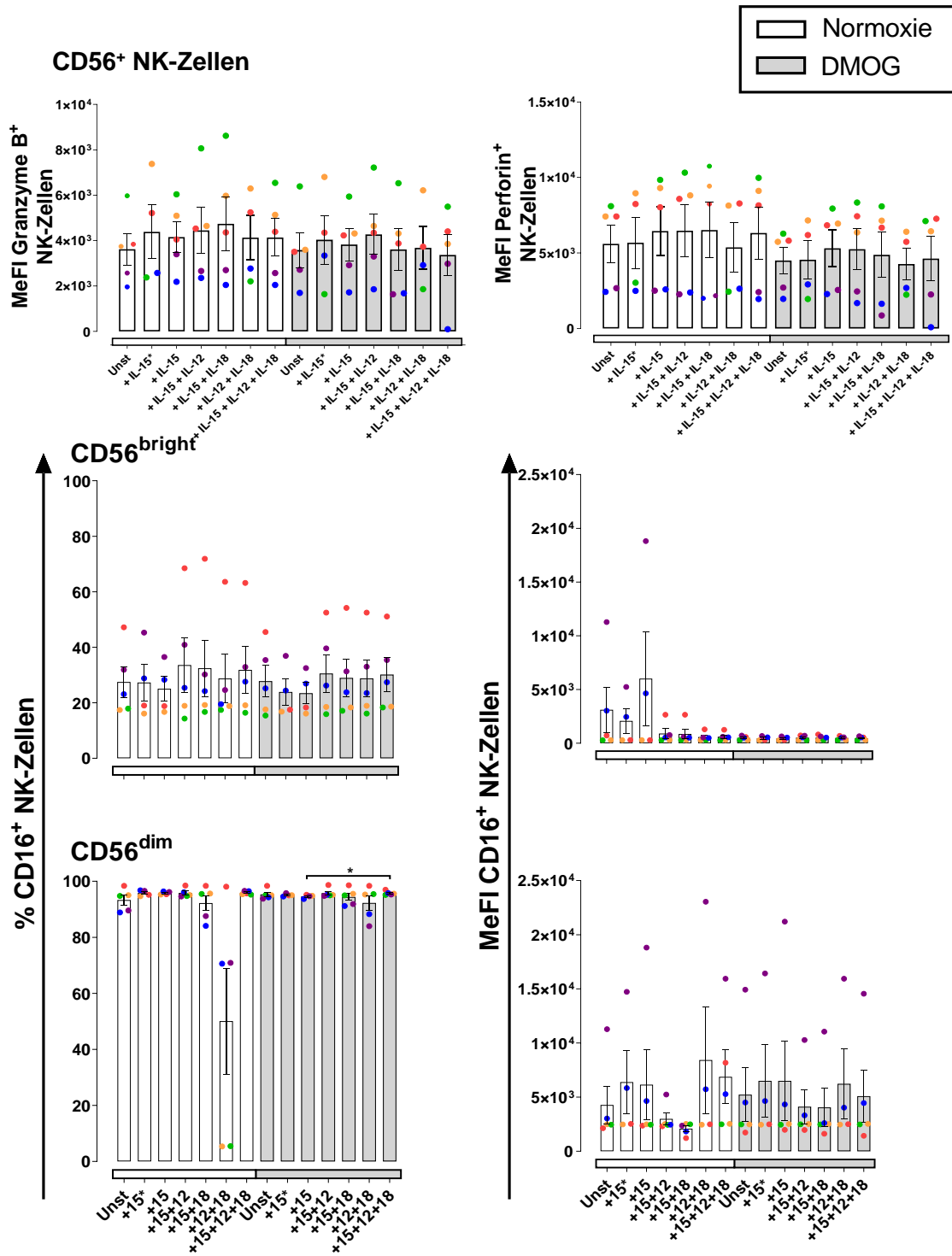


Abbildung 18: Durchflusszytometrische Analyse der Frequenz und MeFI von CD16 sowie MeFI der Granzyme B und Perforin pro NK-Zelle unter Normoxie und DMOG-Behandlung.

Das Experiment wurde unter Normoxie und DMOG durchgeführt (n=6). Hierfür sind NK-Zellen präkonditioniert und anschließend für 10h alleine oder sequenziell stimuliert worden. Eine Ausnahme hiervon bildet +IL-15\*, diese Zellen sind für 6h mit IL-15 inkubiert. **(CD56<sup>+</sup> NK-Zellen)** repräsentiert die Granzyme B und Perforin MeFI pro NK-Zelle. **(CD56<sup>bright</sup>)** CD16<sup>+</sup> MeFI sowie die Frequenz der CD16<sup>+</sup> CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen. **(CD56<sup>dim</sup>)** zeigt die CD16<sup>+</sup> MeFI Moleküle pro NK-Zelle sowie die Frequenz der CD16<sup>+</sup> CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen. Die statistischen Auswertungen erfolgen mittels Kruskal-Wallis-Test (Varianzanalyse). Für signifikante Veränderungen zwischen Normoxie und DMOG gilt \*p < 0,05; \*\*p < 0,01.





Der Versuch wurden unter Normoxie und DMOG-Behandlung durchgeführt (n=5). Die NK-Zellen wurden präkonditioniert und anschließend für 10h alleine oder sequenziell stimuliert. Die Abbildung präsentiert die prozentualen Anteile der Glut-1<sup>+</sup> NK-Zellen und deren Glut-1 MeFI, sowie die 2-NBDG MeFI unter Normoxie und DMOG-Behandlung. Eine Ausnahme hiervon bildet +IL-15<sup>\*</sup>, diese sind für 6h mit IL-15 inkubiert. Die statistischen Auswertungen erfolgt anhand des Kruskal-Kruskal-Wallis-Tests (Varianzanalyse). Für signifikante Veränderungen zwischen Normoxie und DMOG gilt \*p < 0,05; \*\*p < 0,01.

Obwohl die Glut-1 Expression durch sekundäre Stimuli gesteigert wird, zeigte sich keinerlei statistische Signifikanz bei der Aufnahme von 2-NBDG zwischen den unterschiedlichen Präinkubations- und Stimulationsbedingungen. Dies änderte sich unter der chemisch-induzierter Hypoxie nicht (Abbildung 20 2-NBDG). Die 2-NBDG MeFI je Zelle bleibt auch in den Subpopulationen der NK-Zellen unverändert. Lediglich unter IL-15 Stimulation mit sequentieller Co-Stimulation von IL-15 mit IL-12 plus IL-18 zeigen sich gegenüber der einzelnen sekundären Stimulation mit IL-18 eine doppelt so starke MeFI. Dieser Effekt ist von der Sauerstoffkonzentration unabhängig (Anhang Abbildung 44 CD56<sup>bright</sup> und CD56<sup>dim</sup>).

Insgesamt lässt sich somit festhalten, dass NK-Zellen die Glut-1 Expression hoch regulieren können und die aktive Aufnahme und Aktivierung der Glykolyse nicht zur Induktion der IFN- $\gamma$  Freisetzung benötigt wird. Dieser Effekt ist sowohl unabhängig von dem Sauerstoffpartialdruck.

#### 5.2.4 Physiologische Hypoxie bewahrt eine durch IL-12 und IL-18 in IL-15 geprägten NK-Zellen hervorgerufene IFN- $\gamma$ Induktion

Bisher ist in humanen Zelllinien ein Zusammenhang zwischen den Genexpressionsmustern und der Regulation der Proteinexpression durch physiologische Hypoxie (1% O<sub>2</sub>) ebenso wie durch DMOG-Behandlung bekannt. Die differentielle Expression glykolytischer Gene deutet daraufhin, dass andere regulatorische Mechanismen darin involviert sind (Elvidge et al., 2006).

Die durchflusszytometrische Analyse der IFN- $\gamma$  Produktion der NK-Zellen nach Vorbehandlung unter physiologischer Hypoxie stimmt mit den vorherigen Beobachtungen unter chemisch-induzierter Hypoxie überein (Abbildung 17). Hierfür wurden ähnliche Experimente wie unter DMOG-Behandlung durchgeführt. NK-Zellen wurden separat einer Konditionierung unter Normoxie (20% O<sub>2</sub>) oder physiologischer Hypoxie (1% O<sub>2</sub>) ausgesetzt und zunächst einem Priming mit IL-15 sowie gegebenenfalls einer sekundären Stimulation mit IL-12 und IL-18 unterzogen (Abbildung 13 Schema 4 und 5). Nach sekundärer Stimulation zeigte sich eine signifikante Steigerung der IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> gesamten NK-Zellen, ebenso wie eine Steigerung der IFN- $\gamma$  MeFI, im Vergleich zum alleinigen Priming oder den Kontrollen. Diese signifikante Steigerung ist unabhängig vom umgebenden Sauerstoffpartialdruck, da es unter beiden Sauerstoffkonzentrationen nachweisbar ist (Abbildung 21 IFN- $\gamma$ ).

Generell zeigen CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen (etwa 80%), im Vergleich zu CD56<sup>dim</sup> NK-Zellen (rund 60%) eine leicht gesteigerte IFN- $\gamma$  Produktion (Anhang Abbildung 45 CD56<sup>bright</sup>). Für die IFN- $\gamma$  MeFI ist das Phänomen noch deutlicher. Die MeFI halbieren sich fast

unter Hypoxie im Vergleich zu Normoxie. Diese Reduktion zeigt sich lediglich in co-stimulierten gesamten NK-Zellen. Für die nicht stimulierten oder nur mit IL-15 geprimten NK-Zellen ist dies nicht nachweisbar.

Es ist festzuhalten, dass die IFN- $\gamma$  Expression je NK-Zelle in den gesamten CD56<sup>+</sup> gesamten NK-Zellen um 20% geringer ist als die IFN- $\gamma$  Expression von CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen (Abbildung 21, Anhang Abbildung 45 CD56<sup>bright</sup>). Im Gegensatz zu chemisch-induzierter Hypoxie beeinflusst der Sauerstoffpartialdruck die IFN- $\gamma$  Produktion nicht (Abbildung 17 und Abbildung 21). Ein Priming mit IL-15 und eine folgende sequentielle Stimulation mit IL-12 und IL-18 generiert die stärkste IFN- $\gamma$  Produktion. Die Produktion ist dabei unabhängig von dem vorliegenden Sauerstoffpartialdruck.

Darüber hinaus führt die physiologische Hypoxie zu keinerlei inhibitorischen Effekten auf die MeFI von Perforin (Abbildung 21 Perforin) und Granzyme B (Abbildung 21 Granzyme B) bei nicht geprimten oder primär mit IL-15 stimulierten und gegebenenfalls mit IL-12 und IL-18 sequentiell stimulierten NK-Zellen.

Die stärkste Granzyme B MeFI liegt bei CD56<sup>+</sup> gesamten NK-Zellen (Abbildung 21) sowie in CD56<sup>dim</sup> (Anhang Abbildung 46) NK-Zellen nach zehnstündiger Inkubation mit IL-15 vorl. Die deutlichste Expression auf CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen liegt nach sequentieller Stimulation mit IL-15 und IL-12 plus IL-18 vor. Unter Hypoxie bietet sich ein dementsprechendes Verhalten.

Für Perforin bestehen ebenfalls keine inhibierenden Effekte unter Hypoxie. Die am deutlichsten ausfallende Perforin MeFI ist nach sequentieller Co-Stimulation mit IL-15 und IL-12 plus IL-18 zu finden (Abbildung 21). Die CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen verfügen über knapp ein Drittel so starken MeFI wie die gesamten CD56<sup>+</sup> NK-Zellen oder CD56<sup>dim</sup> NK-Zellen. Zwischen den einzelnen Stimulationsbedingungen kommt es zu keinerlei signifikanten Veränderungen (Anhang Abbildung 46).

Umfassend lässt sich festhalten, dass die MeFI von Granzyme B und Perforin unabhängig von proinflammatorischen Zytokinen sowie dem umgebenden Sauerstoffpartialdruck ist.

CD16 Frequenz und MeFI zeigen in der Durchflusszytometrie keine Veränderungen auf die Stimulationsbedingungen und den verminderten Sauerstoffpartialdruck (Abbildung 21). Die CD16<sup>+</sup> MeFI in den gesamten CD56<sup>+</sup> und CD56<sup>dim</sup> NK-Zellen (Abbildung 21 CD16<sup>+</sup> und Anhang Abbildung 47 CD56<sup>dim</sup>NK-Zellen) zeigen eine Tendenz zur Reduktion durch die sequentielle Stimulation nach Priming. Dieser Abfall ist unter Normoxie stärker ausgeprägt, als unter Hypoxie zu beobachten. Auf den CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen (rund 35%) ist die CD16 Expression deutlich geringer, als auf der Gesamtpopulation (nahezu 100%) oder in den CD56<sup>dim</sup> NK-Zellen (knapp 30%).

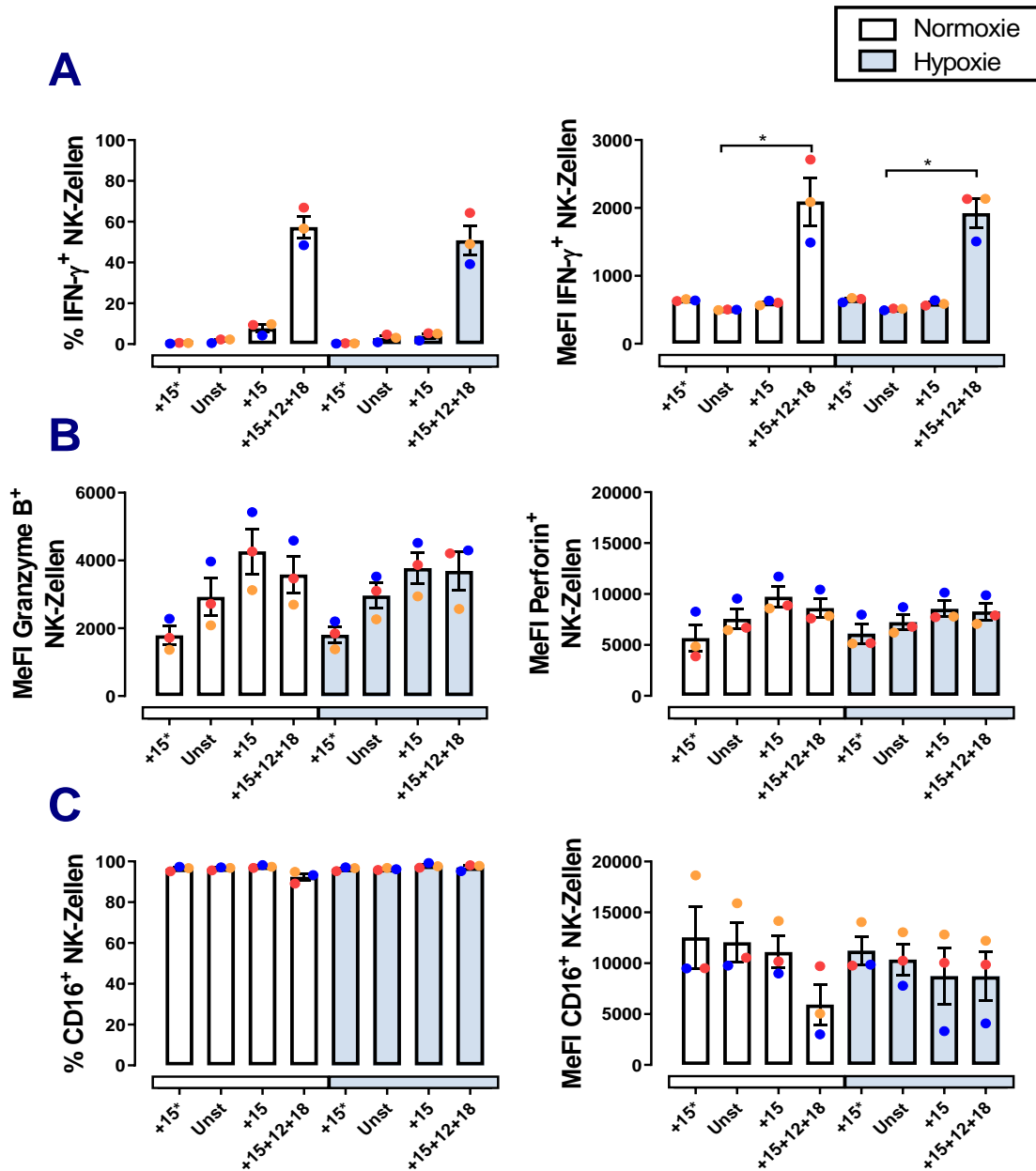


Abbildung 21: Durchflusszytometrische Bestimmung von Frequenz und MeFI der IFN- $\gamma$  sowie die MeFI der Granzyme B und Perforin pro NK-Zelle unter Normoxie und Hypoxie.

Das Experiment wurde unter Normoxie und Hypoxie (1% O<sub>2</sub>) durchgeführt (n=3). Hierfür wurden NK-Zellen präkonditioniert und anschließend für 10h primär mit IL-15 oder sequenziell stimuliert. Eine Ausnahme hiervon bildet +IL-15\*, diese Zellen wurden für 6h mit IL-15 inkubiert. **(A)** Prozentuale Anteile der IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> NK-Zellen und deren MeFI. **(B)** Darüber hinaus sind die MeFI von Granzyme B und Perforin dargestellt. **(C)** zeigt die Frequenz und MeFI von CD16 auf NK-Zellen unter Normoxie und Hypoxie. Für signifikante Veränderungen zwischen Normoxie und DMOG gilt gemäß Kruskal-Wallis-Test (Varianzanalyse), \*p<0,05.

Zusammenfassend lässt sich während der Granzyme B (Abbildung 21), Perforin (Abbildung 21) und CD16 (Abbildung 21) Analyse feststellen, dass die Expression der Effektormoleküle und die Fähigkeit zur zytotoxischen Ausprägung unabhängig von der Sauerstoffkonzentration in der Mikroumgebung und den proinflammatorischen Stimuli ist. Dagegen zeigen die IFN- $\gamma$  Expression und die Fluoreszenzintensität ein gutes

Ansprechen auf die Zytokinstimulation (Abbildung 21). Die verstärkte Sekretion unabhängig von Veränderungen des Sauerstoffpartialdrucks.

Unter Nutzung identischer Stimulationsschemata (Abbildung 13 Schema 3, 4 und 5) wurde die Kapazität von NK-Zellen zur Freisetzung der Chemokine CCL3 (Abbildung 22 CCL3), CCL4 (Abbildung 22 CCL4) und CCL 5 (Abbildung 22 CCL5) bestimmt. Die Menge an sekretiertem Protein ist nach Priming und sekundärer Stimulation mit IL-12 und IL-18 am stärksten. NK-Zellen sekretieren nach sequentieller Stimulation zehnmal so viel CCL3, wie unter einem reinen IL-15 Priming. Physiologische Hypoxie scheint, analog zur Chemokinsekretionen unter DMOG-Behandlung, einen inhibierenden Effekt auf die Proteinsekretion zu bewirken. Für CCL3 (Abbildung 22 CCL3) reduziert sich die Menge an sekretierten Protein unter Hypoxie auf 80%. Ganz so drastisch sind die Effekte auf CCL4 und CCL5 nicht. Es liegt eine Reduktion um ein Fünftel vor. Unter physiologischer Hypoxie ist für CCL4 ist ein signifikanter Anstieg der Chemokinsekretion unter sekundären Stimuli im Gegensatz zur alleinigen IL-15-Stimulation zu verzeichnen. Für CCL5 (Abbildung 22 CCL5) zeichnet sich bereits nach sechsständiger IL-15 Stimulation eine Tendenz zur gesteigerten Sekretion ab, ohne jedoch statistische Signifikanz zu erreichen.

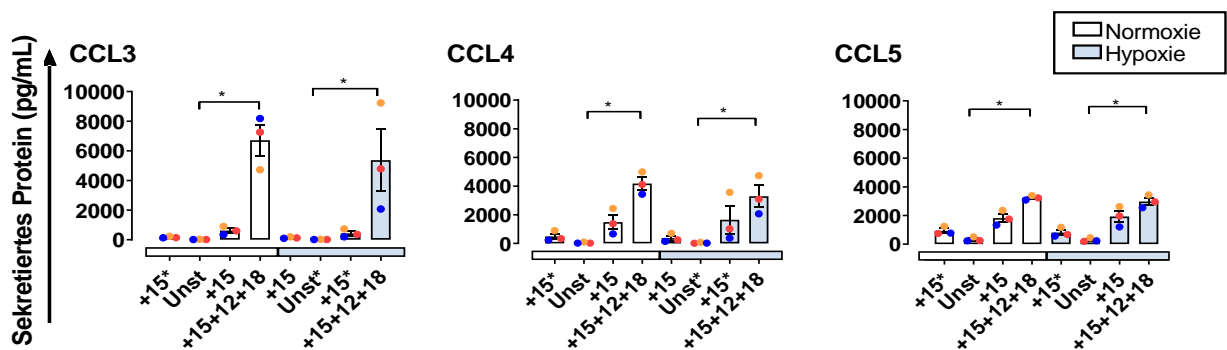


Abbildung 22: Sekretion der chemotaktischen Proteine CCL3, CCL4 und CCL5 nach Priming und sekundärer Stimulation unter Normoxie und Hypoxie mittels Magnetic-Bead-Array Analyse.

Das Experiment wurde unter Normoxie und physiologischer Hypoxie (1% O<sub>2</sub>) durchgeführt (n=3). NK-Zellen wurden präkonditioniert und anschließend für 10h primär mit IL-15 oder sequentiell mit IL-12 und IL-18 stimuliert. Die Zellkulturüberstände wurden zum Zeitpunkt der Zellernte gesammelt worden und dienen der Proteinbestimmung. (CCL3) präsentiert die Sekretion von CCL3. (CCL4): zeigt Sekretion von CCL4. (CCL5) dokumentiert die CCL5 Sekretion. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Kruskal-Wallis-Test, dabei gilt: \*p<0,05.

Zusammenfassend zeigen diese Daten einen vorteilhaften Effekt des kurzfristigen IL-15 Priming in Kooperation mit sekundären Stimuli in Form von IL-12 und IL-18. Jedoch zeigen NK-Zellen unter physiologischer Hypoxie möglicherweise einen leicht negativen Einfluss auf NK-Zell Chemokinantworten.



### 5.2.5 Verstärkte Glut-1 Expression durch IL-15 Priming und sekundäre proinflammatorische Zytokine ohne die Glukoseaufnahme zu steigern

Sowohl unter Normoxie als auch unter Hypoxie zeigen die gesamten NK-Zellen nach IL-15 Priming, im Vergleich zu den nicht stimulierten (gemäß Abbildung 13 Schema 3 bis 5) NK-Zellen, eine gesteigerte durchflusszytometrische Glut-1 Expression (Abbildung 23 Glut-1<sup>+</sup>). Wie bereits unter chemisch-induzierter Hypoxie beobachtet, existieren für die 2-NBDG MeFI der Glukoseaufnahme keinerlei Unterschiede nach sekundärer Stimulation mit proinflammatorischen Zytokinen (Abbildung 23 2-NBDG).

Für die beiden Subpopulationen CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen (Anhang Abbildung 48 CD56<sup>bright</sup>) und CD56<sup>dim</sup> NK-Zellen (Anhang Abbildung 48 CD56<sup>dim</sup>), ergibt sich ebenfalls eine Steigerung der Glut-1 Expression nach Priming und sekundärer Stimulation. Die Frequenz der Glut-1<sup>+</sup> NK-Zellen nimmt bereits nach sechs Stunden Priming zu und wird bei zehnstündigem Inkubation weiter verstärkt. Die Glukoseaufnahme präsentiert anhand der 2-NBDG MeFI, eine Unabhängigkeit der 2-NBDG MeFI in den Subpopulationen von proinflammatorischen Zytokinen und der umgebenden Sauerstoffpartialdruck (Anhang Abbildung 48 CD56<sup>bright</sup> und CD56<sup>dim</sup>).

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass NK-Zellen der Probanden unter Hypoxie und Priming mit sekundärer Stimulation von IL-15 mit IL-12 und IL-18 eine verstärkte Glut-1 Rezeptorexpression erzeugen, aber ohne dabei zusätzliche Glukose aufzunehmen.

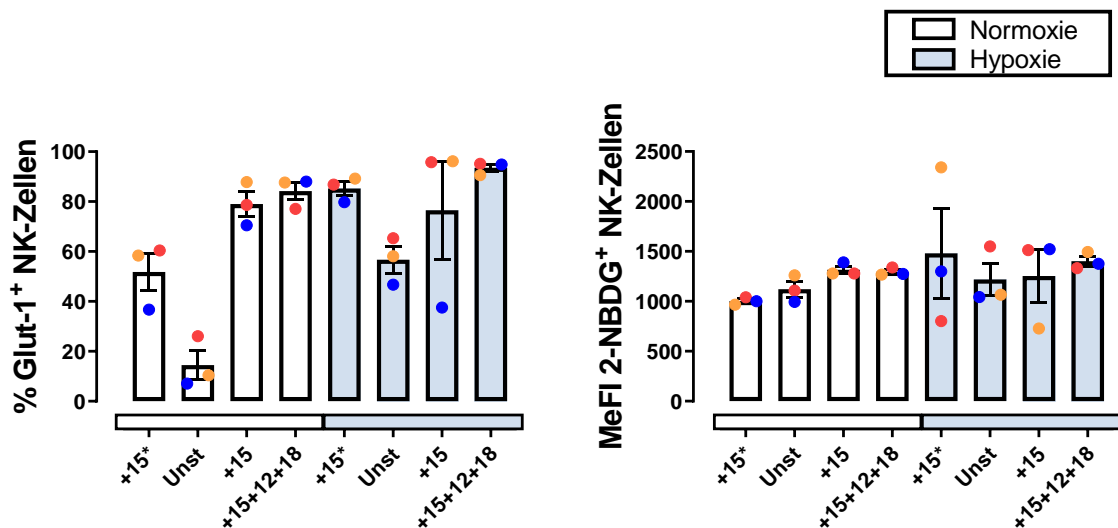


Abbildung 23: Durchflusszytometrische Analyse der Expression von Glut-1 sowie 2-NBDG MeFI unter Normoxie und Hypoxie.

Der Versuch wurde sowohl unter Normoxie als auch unter Hypoxie (1% O<sub>2</sub>) durchgeführt (n=3). Die NK-Zellen wurden präkonditioniert und anschließend für zehn Stunden primär mittels IL-15 oder sequentiell stimuliert. Eine Ausnahme hiervon bildet +IL-15\*. Diese wurden für sechs Stunden mit IL-15 inkubiert. Die Abbildung zeigt die prozentualen Anteile der Glut-1<sup>+</sup> NK-Zellen, sowie die 2-NBDG MeFI sind dargestellt. Die statistische Auswertung erfolgt mittels Kruskal-Wallis-Test.

### 5.2.6 NK-Zell-Zytotoxizität und Zytokinproduktion nach Kontakt mit leukämischen Zielzellen sind unabhängig von der Glykolyse

Die Stimulation mit proinflammatorischen Zytokinen führt zu einer Hochregulation der Glut-1 Expression sowie der 2-NBDG MeFI der gesamten NK-Zellen. Das repräsentative Beispiel in Abbildung 24 zeigt einen Anstieg der Glut-1 und 2-NBDG nach Kontakt mit den Zielzellen. Die Modulation der Parameter nach Co-Inkubation mit K-652 Zielzellen wurde nachfolgend untersucht. Es zeigt sich bei der Glukoseaufnahme, vor allem in zuvor mit IL-15 stimulierten NK-Zellen eine umfassende Tendenz zur verstärkten Glukose (2-NBDG) Aufnahme. Die NK-Zell Elimination von leukämischen Zielzellen koinzidiert mit der Absenkung der Glut-1 Oberflächenexpression und der reduzierten 2-NBDG Aufnahme (Abbildung 24). Des Weiteren wurden NK-Zellen über Nacht einer chemisch-induzierter Hypoxie (DMOG), einer physiologischer Hypoxie (1% O<sub>2</sub>) oder der Normoxie ausgesetzt. Anschließend wurden sie mit IL-15 geprimt und nach dem Priming für die finalen vier Stunden mit K-652 Zielzellen vermischt (Abbildung 13 Schema 3, 4 und 5). Während der vollständigen Zytotoxizitätsanalyse zeigt sich unter allen Kulturbedingungen nach Co-Inkubation mit K-652 Zielzellen eine leicht gesteigerte Anzahl der Glut-1<sup>+</sup> NK-Zellen. Jedoch zeigen nur Kulturen unter DMOG-Behandlung eine statistische Signifikanz. Die Co-Inkubation von IL-15 stimulierten und mit K-652 Zellen vermischten NK-Zellen führt zu einem leichten Anstieg der Glut-1 Expression (Abbildung 25 Glut-1). Zusätzlich zeigt sich eine gesteigerte Glukoseaufnahme Kapazität der gesamten NK-Zellen nach Kontakt mit den Zielzellen, ohne eine Signifikanz zu erreichen (Abbildung 25 2-NBDG). Es existieren wahrscheinlich keine Unterscheide, da es einen Probanden (gelber Punkt) mit erhöhten Werten gibt. In den beiden Subpopulationen, CD56<sup>bright</sup> und CD56<sup>dim</sup> NK-Zellen ist eine erhöhte Glut-1 Rezeptorexpression nach IL-15 Priming unter Normoxie und DMOG-Behandlung nachweisbar (Anhang Abbildung 49 CD56<sup>bright</sup> und CD56<sup>dim</sup>).

Zusammenfassend lässt sich somit festhalten, dass NK-Zellen durch den Kontakt mit K-652 Zielzellen eine leichte Steigerung des glykolytischen Metabolismus aufweisen.

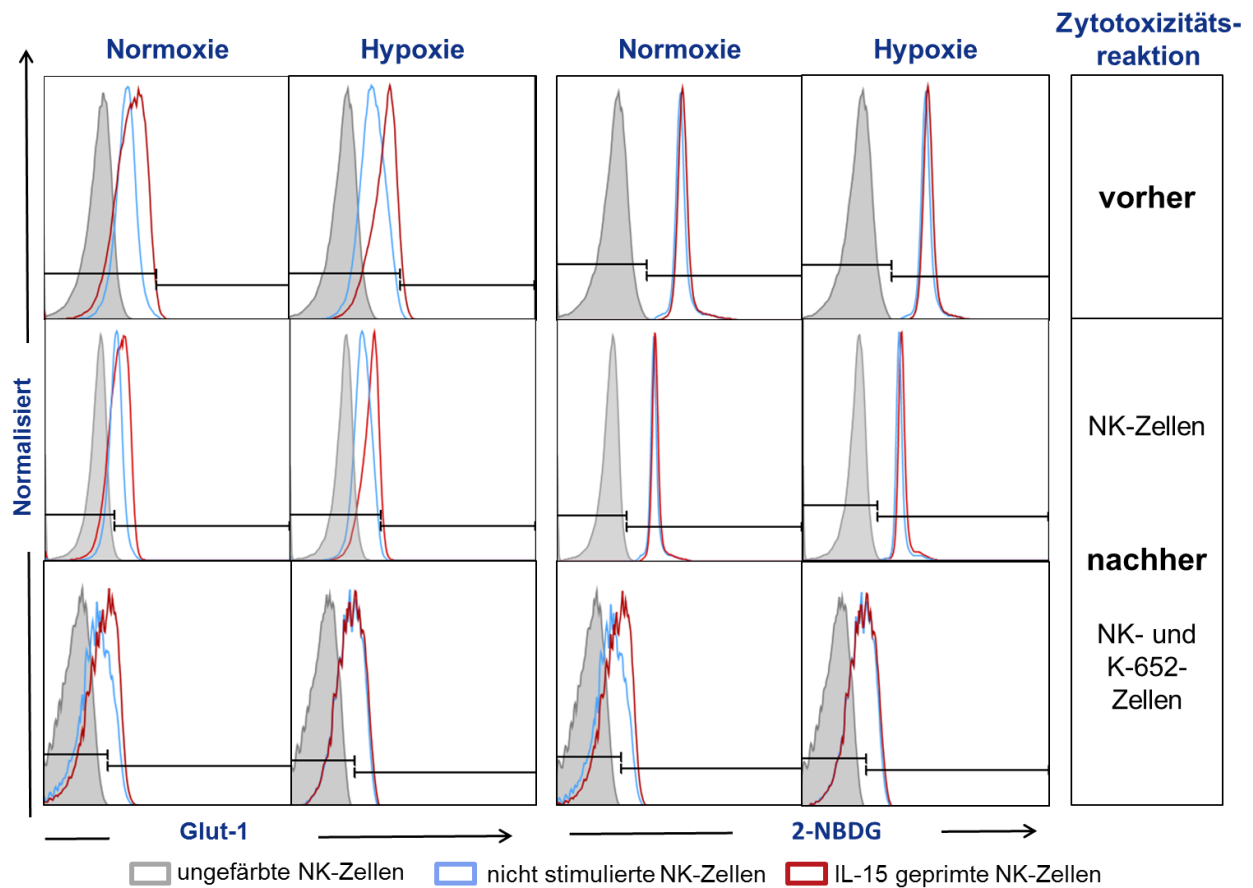


Abbildung 24: Repräsentatives Beispiels eines durchflusszytometrischen Vergleichs der Glut-1 und 2-NBDG Expression vor und nach Kontakt mit K-652 leukämischen Zielzellen.

NK-Zellen wurden aus Buffy Coats isoliert, *in vitro* konditioniert, teilweise mit IL-15 geprimt (6h) und einer anschließenden Co-Inkubation (4h) unterzogen. (**Vorher**) zeigt die Glut-1 und 2-NBDG Histogramme nach sechsständigem Priming. (**Nachher**) zeigt die Histogramme der NK-Zellen für die finalen vier Stunden nach zehnstündiger Inkubation sowohl ohne Zugabe von K-652 Zellen, als auch nach Co-Inkubation von NK- und K-652 Zellen. In grau sind ungefärbte NK-Zellen, in rot sind mit IL-15 geprimte und im Kontakt mit K-652 Zielzellen befindliche NK-Zellen, sowie in blau sind nicht geprimte sowie im Kontakt mit Zielzellen befindliche NK-Zellen dargestellt.

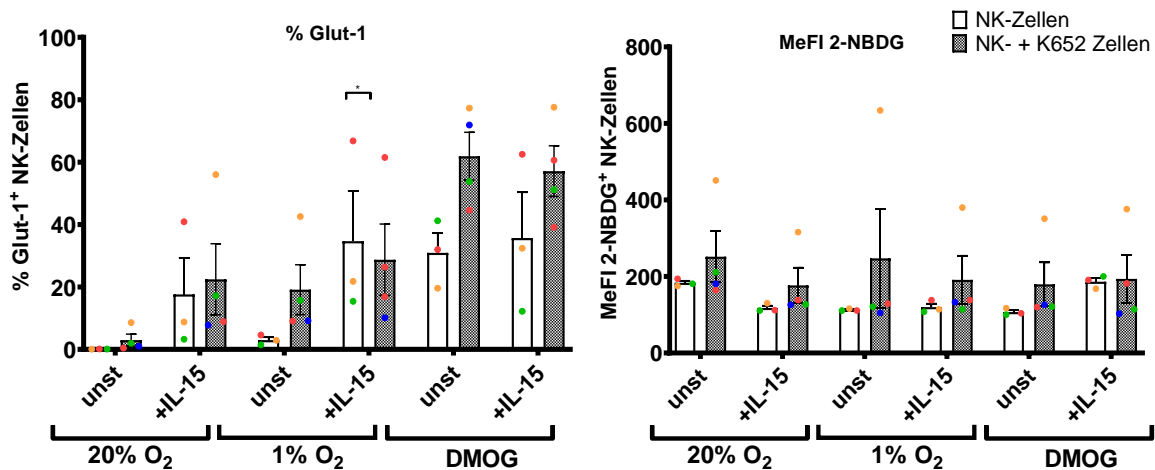


Abbildung 25: Durchflusszytometrische Analyse der Frequenz der Glut-1 Expression und 2-NBDG MeFI während des Kontakts mit Zielzellen.

Der Versuch wurde unter Normoxie, Hypoxie, DMOG mit IL-15 Priming durchgeführt (n=4). Die NK-Zellen wurden präkonditioniert und anschließend für 6h mit IL-15 geprimt. Nach dem Priming wurden sie für die finalen vier Stunden mit K-652 Zielzellen vermischt. Als Referenz wurden parallel Kulturen von NK-Zellen ohne Co-Inkubation verwendet. Die statistische Analyse erfolgt mittels TWO-Way ANOVA, dabei gilt  $*p < 0,05$ .

Darüber hinaus werden die Effektormoleküle von NK-Zellen in Anwesenheit von K-652 Zielzellen analysiert. Hierzu wurden sowohl Effektor-, Zytokin-, als auch Chemokin-Antworten auf die differenziell präkonditionierten und mit Zielzellen vermischten NK-Zellen überprüft. Die NK-Zell vermittelte Zytotoxizität ist analog zu Velasquez et al., (2016) und wurde durch die Messung der Viabilität mit 7-AAD und Annexin V festgehalten (Anhang Abbildung 50). Die Zellkulturüberstände wurden geerntet und später auf die Proteinkonzentrationen von neun unterschiedlichen, löslichen Faktoren durch Multiplex Immunoassay bestimmt. Nach Co-Inkubation mit K-652 Zellen besteht eine Tendenz zur einer erhöhten IFN- $\gamma$  (nur statistisch signifikant bei Präinkubation mit DMOG) und TNF- $\alpha$  Sekretion unter allen Konditionsbedingungen. Besonders unter hypoxischen Bedingungen kann von einem mindestens additiven Effekt ausgegangen werden (Abbildung 26 IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$ ).

In Anwesenheit der leukämischen Zielzellen sekretieren NK-Zellen höhere Chemokin-Quantitäten, inklusive CCL3, CCL4, CCL5 und MIF, im Vergleich zu NK-Zellen ohne Kontakt zu den Zielzellen (Abbildung 26 CCL3-5 und MIF). Es besteht ein Hinweis auf einen additiven Effekt bei einer hypoxischen Behandlung. NK- und K652-Zellen können alleine VEGF sekretieren (Abbildung 26 VEGF). In Co-Kulturen unter Hypoxie oder DMOG kann eine gesteigerte Sekretion von zytotoxischen Effektormolekülen beobachtet werden. Diese Reduktion von Perforin ist nicht signifikant (Abbildung 26 Perforin). Die Granzyme B Sekretion nach Co-Kultivierung mit K-652 Zellen von hypoxisch präkonditionierten und mit IL-15 primär stimulierten NK-Zellen ist signifikant hochreguliert (Abbildung 26 Granzyme B).

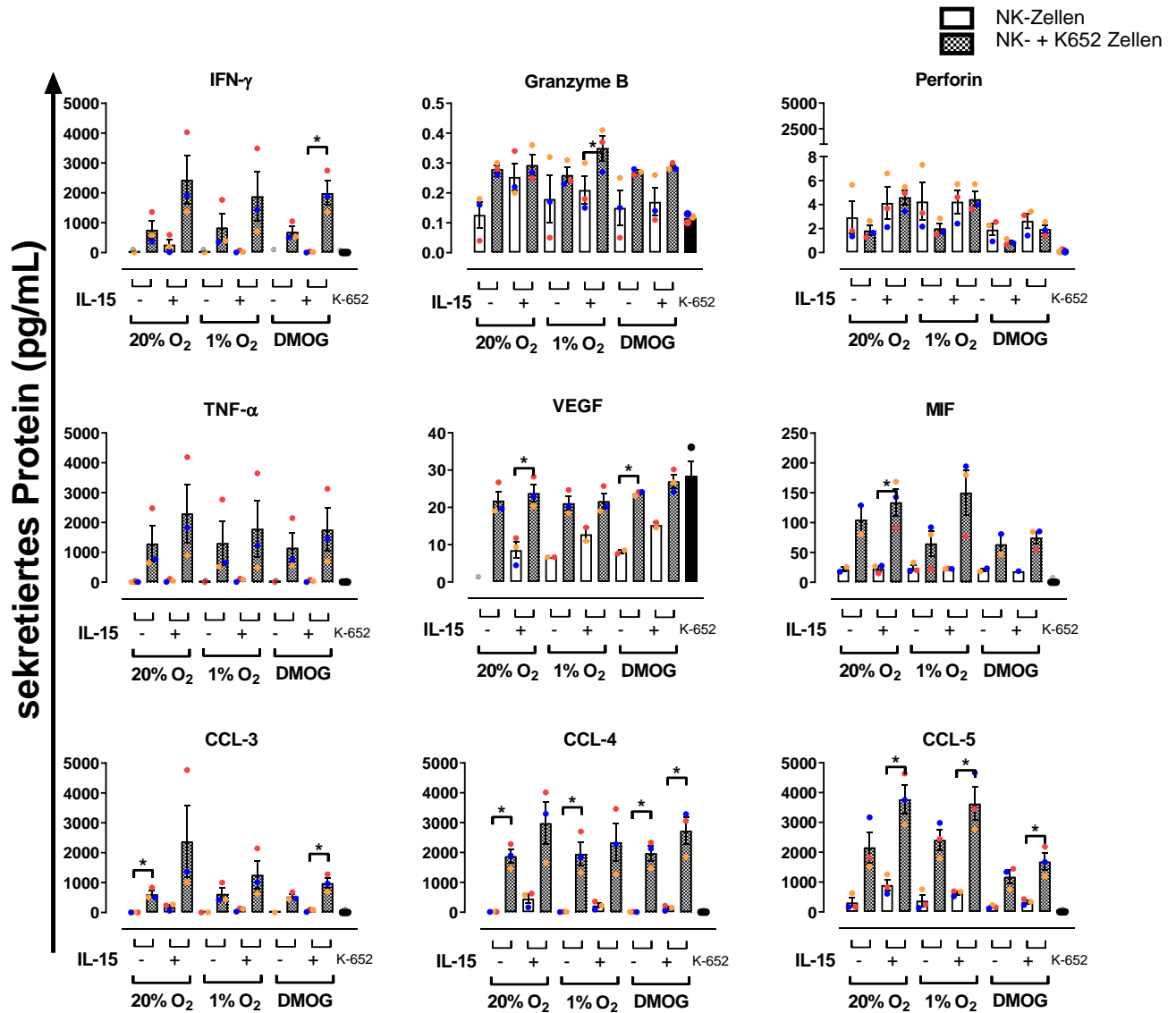


Abbildung 26: Bestimmung der Sekretion von Effektormolekülen, chemotaktischen Proteinen und immunmodulatorische zytotoxische Moleküle nach Kontakt mit K-652 Zielzellen mittels Magnetic-Bead-Array.

Für die Proteinanalyse wurden Versuche mit *in vitro* NK-Zellen unter Normoxie, Hypoxie und chemisch-induzierter Hypoxie (DMOG) mit gleichen IL-15 Priming durchgeführt (n=4). Die NK-Zellen wurden präkonditioniert und anschließend für 6h mit IL-15 geprimt. . Nach dem Priming sind sie für die finalen vier Stunden mit K-652 Zielzellen vermischt. Als Referenz wurden parallel Kulturen von NK-Zellen ohne Co-Inkubation verwendet Die statistische Analyse erfolgte mittels TWO-Way ANOVA, dabei gilt \*p< 0,05.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass präkonditionierte NK-Zellen sowohl unter Normoxie als auch unter Hypoxie, in Anwesenheit von K-652 leukämischen Zielzellen, ihren glykolytischen Metabolismus nicht eindeutig hochregulieren. Dennoch sind sie in der Lage den spezifischen Mechanismus zur zellulären Zytotoxizität zu aktivieren, eine synergistische Sekretion von zytolytischen Effektormolekülen sowie teilweise synergistische Zytokin- und Chemokinantworten hervorzurufen.

### 5.2.7 Induktion der IFN- $\gamma$ Produktion von NK-Zellen ist ein Glukose-unabhängiger Prozess

Die vorherigen Erkenntnisse präsentieren, dass NK-Zellen eine leichte Hochregulation des glykolytischen Flux (Abbildung 15) und keine Änderung der Glut-1 Expression sowie Glukoseaufnahme (Abbildung 25 und Abbildung 26), bei gleichzeitiger Induktion einer starken Chemokin- und Zytokinantwort aufweisen. Nachfolgend wurde die NK-Zell Effektorfunktionen nach Zytokinstimulation in Abwesenheit von Glukose analysiert. Ein Glukoseentzug nach Aktivierung durch sekundäre Stimulation mit IL-12 und IL-18 (finale vier Stunden) zeigte durchflusszytometrisch keinen Effekt in der Frequenz der Glut-1<sup>+</sup> NK-Zellen oder in ihrer Glukose-Aufnahme-Kapazität (Abbildung 27). In den CD56<sup>dim</sup> NK-Zellen zeigt sich eine signifikante Steigerung der Glut-1 Expression nach totalem Glukoseentzug (Abbildung 27 Glut-1<sup>+</sup>). Auf den CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen zeigt sich eine konstant gleichbleibende 2-NBDG Glukoseaufnahme (Abbildung 27 CD56<sup>bright</sup>). Parallel war auf den gesamten CD56<sup>+</sup> und CD56<sup>dim</sup> NK-Zellen eine Abnahme der 2-NBDG<sup>+</sup> MeFI durch sequentielle Stimulation, ohne weitere Änderungen durch den Glukoseentzug, zu beobachten (Abbildung 27 2-NBDG).

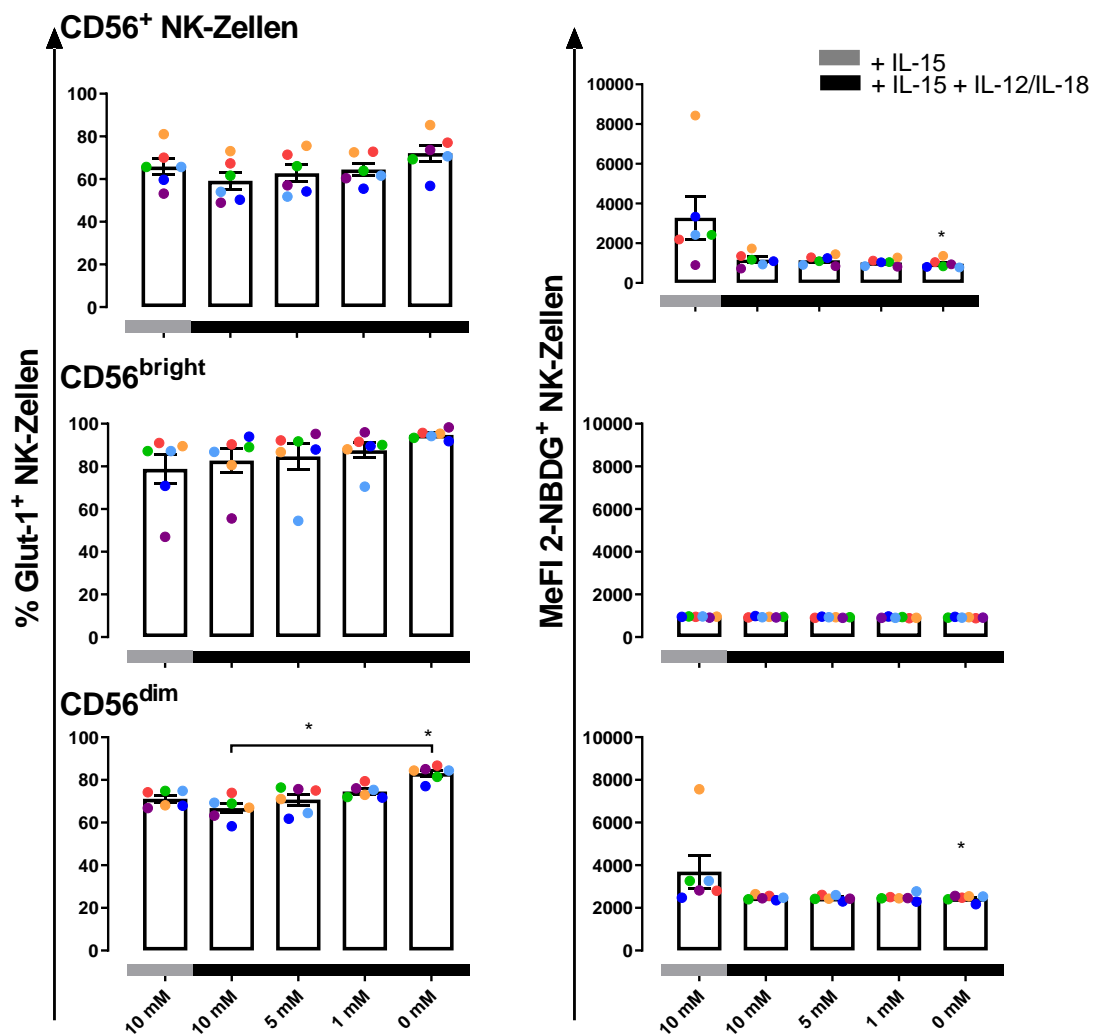


Abbildung 27: Durchflusszytometrische Analyse der Glut-1 Expression und MeFI von 2-NBDG während des Glukoseentzugs.

Der Versuch wurde unter Normoxie mit gleichen IL-15 Priming durchgeführt (n=6). Die NK-Zellen wurden präkonditioniert und anschließend für 10h mit IL-15 geprimt und für die finalen 4h sequentiell mit IL-12 und IL-18 stimuliert. Nach dem Priming wurde sie für die finalen vier Stunden die Glukose entzogen. **(CD56<sup>+</sup> NK-Zellen)** zeigt die Frequenz der Glut-1+ NK-Zellen und die 2-NBDG MeFI pro Zelle. **(CD56<sup>bright</sup>)** zeigt die Frequenz der Glut-1+ CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen und die 2-NBDG MeFI pro CD56<sup>bright</sup> NK-Zelle. **(CD56<sup>dim</sup>)** zeigt die Frequenz der Glut-1+ CD56<sup>dim</sup> NK-Zellen und die 2-NBDG MeFI pro CD56<sup>dim</sup> NK-Zelle. Einzelne Sternchen symbolisieren den statistischen Vergleich zu unter 10mM Glukose, mit IL-15 geprimten NK-Zellen. Die statistische Analyse erfolgte mittels Kruskal-Wallis-Test, dabei gilt \*p< 0,05; mM gibt die vorherrschende Glukosekonzentration an.

Wie bereits zuvor unter 10 mM Glukose bei sequentieller Stimulation beobachtet werden konnte, ist die Frequenz und MeFI von CD16<sup>+</sup> NK-Zellen unabhängig gegenüber dem Glukoseentzug (Abbildung 28). Für die MeFI zeigte sich während der sequentiellen Stimulation bei Glukoseentzug ein leichter Abfall. Die Fähigkeit zur zytotoxischen ADCC Funktion wurde anhand der Frequenz und MeFI von CD16<sup>+</sup> bestimmt und insbesondere in den CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen durch die sequentielle Stimulation beeinflusst. Die Frequenz und MeFI von CD16<sup>+</sup> NK-Zellen sind unabhängig von der vorherrschenden Glukosekonzentration (Abbildung 28 CD56<sup>bright</sup>). In den CD56<sup>dim</sup> NK-Zellen zeigt sich ein Abfall durch die Kombination aus Glukoseentzug und sekundärer Stimulation (Abbildung 28 MeFI CD16).

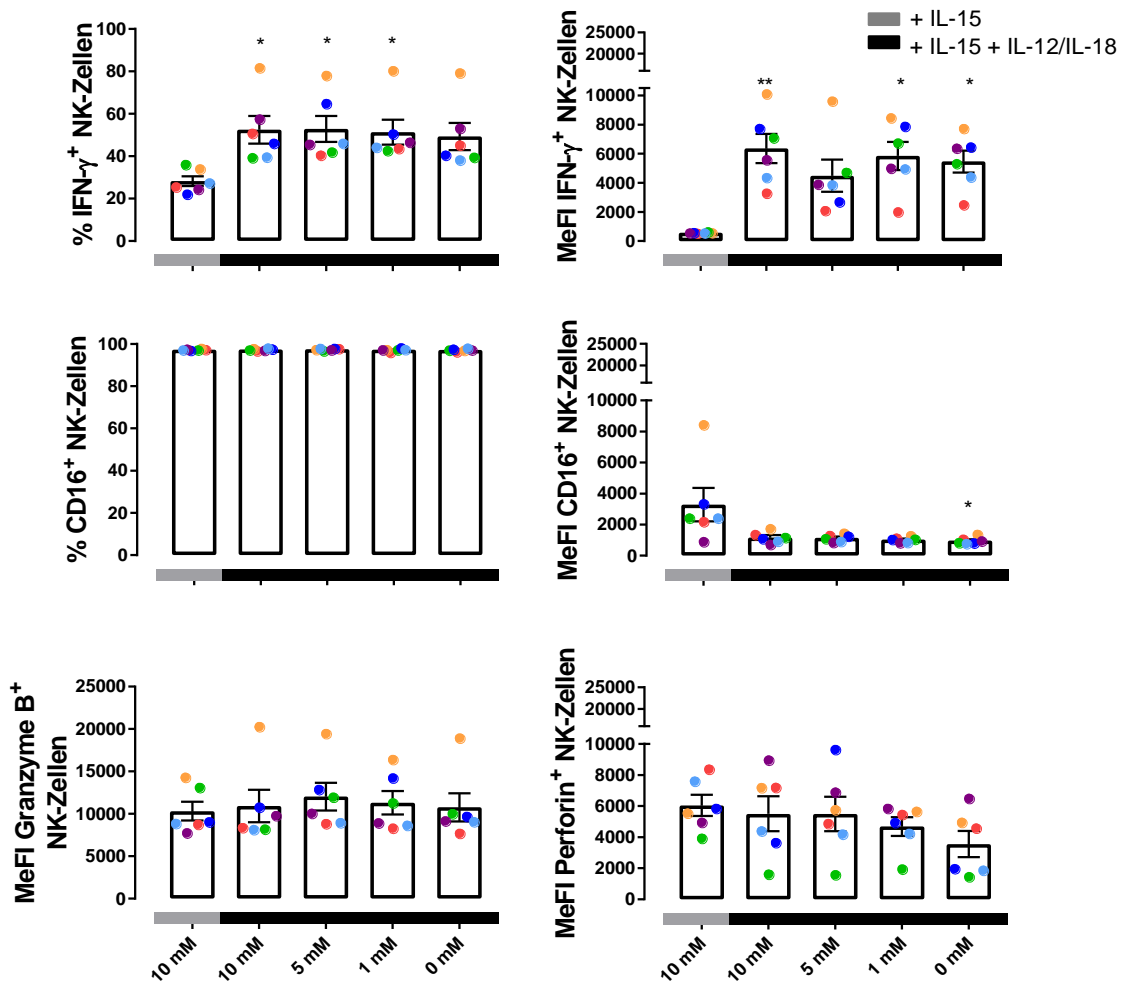


Abbildung 28: Durchflusszytometrische Analyse der Frequenz und MeFI von IFN- $\gamma$  und CD16 sowie die MeFI von Granzyme B und Perforin auf NK-Zellen unter Normoxie während des Glukoseentzugs. Der Versuch wurde unter Normoxie durchgeführt ( $n=6$ ). Hierfür werden NK-Zellen präkonditioniert und anschließend für 10h alleine oder sequenziell stimuliert. Nach dem Priming wurde für die finalen vier Stunden die Glukose entzogen und mit IL-12 und IL-18 sekundär stimuliert. **(IFN- $\gamma$ )** präsentiert die prozentualen Anteile der IFN- $\gamma$ + NK-Zellen und deren IFN- $\gamma$  MeFI. **(CD16)** zeigt die CD16+ Frequenz sowie die MeFI der CD16+ NK-Zellen. **(Granzyme B)** zeigt die MeFI der Granzyme B Molekülen pro NK-Zelle. **(Perforin)** präsentiert die MeFI der Perforin Molekülen pro NK-Zelle. Einzelne Sternchen symbolisieren den statistischen Vergleich zu unter 10mM Glukose, mit IL-15 geprimten NK-Zellen. Die statistischen Auswertungen erfolgte mittels Kruskal-Wallis-Test, dabei gilt \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ .

Analog zu den bisherigen Erkenntnissen führte eine primäre Applikation von IL-15 (sechs Stunden) mit ergänzender sekundärer IL-12 und IL-18 Stimulation (finale vier Stunden) zu einer signifikant gesteigerten IFN- $\gamma$  Produktion.

NK-Zellen präsentieren unter Glukoseentzug einen verminderten Effekt auf die NK-Zell IFN- $\gamma$ -Antworten (Abbildung 27). Es zeigte sich, dass sich die IFN- $\gamma$  Expression und MeFI über alle NK-Zellen (Abbildung 27), sowie die beiden NK-Zellsubpopulationen CD56<sup>dim</sup> (Anhang Abbildung 52CD56<sup>dim</sup>) und CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen (Anhang Abbildung 52CD56<sup>bright</sup>), von der sequentiellen Stimulation, jedoch nicht von der Glukosekonzentration abhängig sind.

Die MeFI der zytotoxischen Effektormoleküle Perforin und Granzyme B decken eine ebenfalls nicht negativ durch den Glukoseentzug beeinflusste Sekretion auf (Abbildung



28). Die Unabhängigkeit von der Glukosekonzentration zeigt sich nicht nur bei der gesamten NK-Zellpopulation (Abbildung 27), sondern auch in den beiden Subpopulationen (Anhang Abbildung 53 CD56<sup>bright</sup> und CD56<sup>dim</sup>).

Ergänzend untersucht diese Arbeit die Auswirkungen des Glukoseentzugs auf die Chemokinsekretionen der NK-Zellen. Wie bereits zuvor beobachtet, ist auch die Chemokinsekretion von CCL3, CCL4 und CCL5 unabhängig von der Glukosekonzentration (Abbildung 29).

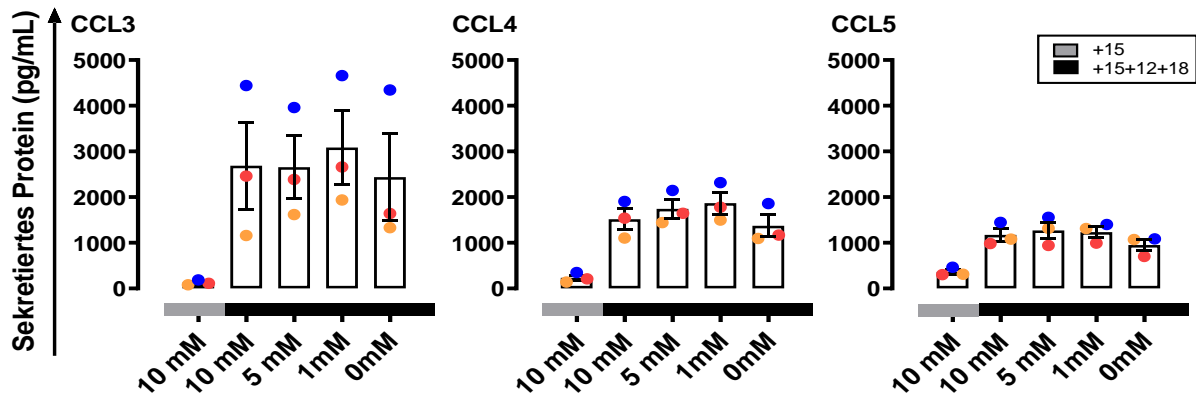


Abbildung 29: Untersuchung der Proteinsekretion von CCL3, CCL4 und CCL5 unter Glukoseentzug mittels Magnetic Bead Array.

Das Experiment wurde unter Glukose- und L-Glutaminentzug durchgeführt (n=3). Hierfür wurden NK-Zellen präkonditioniert und anschließend für 10h alleine oder sequenziell mit IL-12 und IL-18 stimuliert. Die Glukose wurde während der finalen vier Stunden entzogen. Die Zellkulturüberstände wurden zum Zeitpunkt der Zellernte gesammelt und dienen der Proteinbestimmung. **(CCL3)** präsentiert die Sekretion von CCL3 unter den Stimulationsbedingungen. **(CCL4)** zeigt Sekretion von CCL4 unter den Stimulationsbedingungen. **(CCL5)** dokumentiert die CCL5 Sekretion unter den diversen Bedingungen. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Kruskal-Wallis-Test.

Zusätzlich wurden zur Interpretation des glykolytischen Metabolismus sowie der mitochondriale, respiratorische Kapazität der glykolytischen Flux bestimmt. Die Azidifizierungsrate (ECAR) und die Sauerstoffverbrauchsrate (OCR) der NK-Zellen wurden hierzu unter Glukose- und L-Glutaminentzug, vermessen. Zunächst wurden NK-Zellen, gemäß Abbildung 13, mit IL-15 geprimt, während der letzten vier Stunden in Zellkulturmedium mit und ohne Glukose resuspendiert und mit den proinflammatorischen Zytokinen IL-12 und IL-18 versetzt. Diese Echtzeitdaten zeigen eine höhere ECAR und OCR für Zellen, welche zunächst mit IL-15 geprimt und dann in Glukose-haltigem Medium resuspendiert und anschließend sequenziell mit IL-12 und IL-18 aktiviert wurden (Abbildung 30).

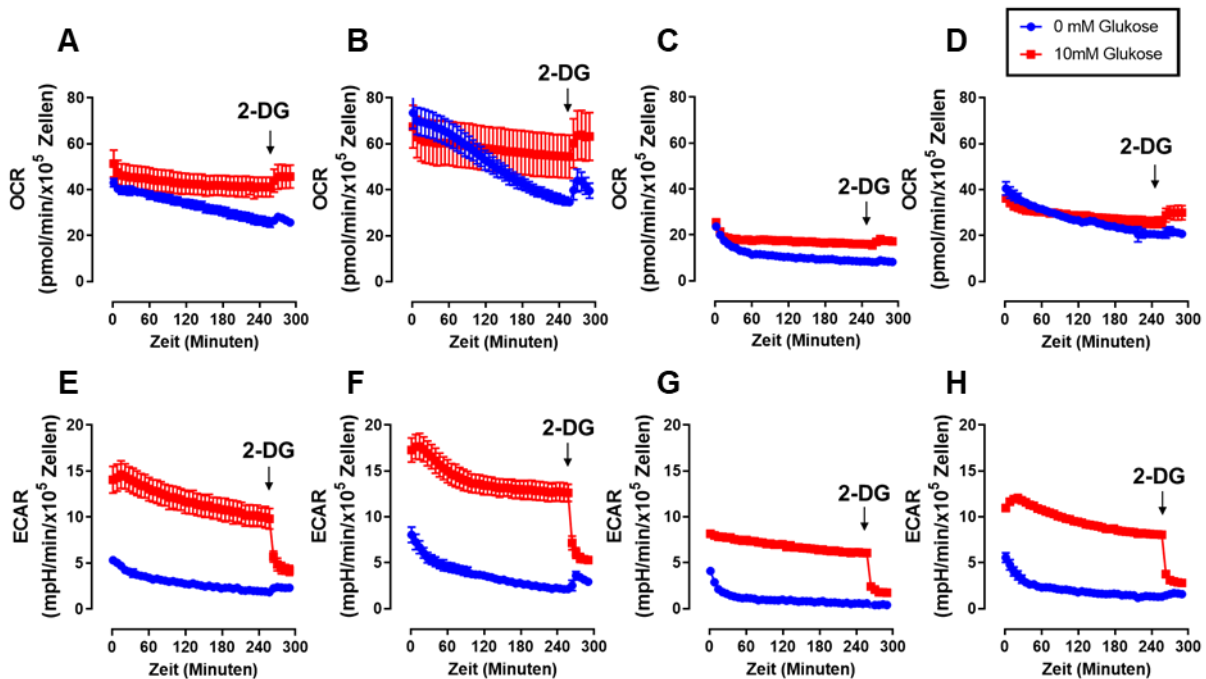


Abbildung 30: Repräsentative Analyse der Azidifizierungs- und der Sauerstoff-verbrauchsrate unter Glukose- und L-Glutaminentzugs und Inhibition der Glykolyse.

NK-Zellen sind zur Analyse der Sauerstoffverbrauchsrates und des glykolytischen Flux einem Glukose- und L-Glutaminentzug ausgesetzt ( $n=4$ ). Die Graphen zeigen jeweils drei technische Replikate. Die Zeitspanne zwischen Glukoseentzug und Beginn der Messung betrug rund zwei bis drei Minuten. Die L-Glutaminkonzentration betrug konstant 0mM. **(A - B)** zeigen den Glykolytischen Flux unter den verschiedenen Glukosekonzentrationen und IL-15 Priming (6h) **(C - D)** zeigt den Glykolytischen Flux unter den verschiedenen Glukosekonzentrationen und IL-15 Priming (6h) mit sekundärer Stimulation (4h), während **(E - F)** die Sauerstoffverbrauchsrates unter den verschiedenen Glukosekonzentrationen und IL-15 Priming (6h) zeigt. **(G-H)** beschreibt die Sauerstoffverbrauchsrates unter den verschiedenen Glukosekonzentrationen und IL-15 Priming (6h) mit sekundärer Stimulation (4h).

Des Weiteren wurde die Abhängigkeit der Effektormoleküle bei simultaner Analyse der Veränderungen der Glykolyse während des Glukoseentzugs untersucht. Während einer verlängerten Behandlung der NK-Zellen mit IL-15, wurden diese mit einer höheren Konzentration (100 ng/mL, anstelle 45 ng/mL) und für einen längeren Zeitraum (120h anstelle von zehn Stunden), als die sonst üblichen Versuchsbedingungen, inkubiert. Die NK-Zellen wurden während der finalen vier Stunden mit IL-12 und IL-18 stimuliert und einem Glukoseentzug unterzogen. Die NK-Zellen zeigen dabei ähnliche Glut-1 Expressionen, 2-NBDG MeFI, IFN- $\gamma$ -Antworten sowie MeFI der Effektormoleküle (Granzyme B und Perforin), wie sie auch nach kurzfristiger Kultur mit IL-15 (zehn Stunden) detektierbar waren (Anhang Abbildung 54). Für Glut-1 ist zu erkennen, dass trotz sekundärer Stimulation mit IL-12 und IL-18 eine klare Tendenz zur gesteigerten Glut-1 Rezeptorexpression auf NK-Zellen besteht (Anhang Abbildung 54). Für 2-NBDG sind ebenso wie für das zytotoxische Effektormolekül IFN- $\gamma$  kein Unterschiede und Effekte zu beobachten, sodass von einer Unabhängigkeit der zytotoxischen Funktion gegenüber dem glykolytischen Metabolismus auszugehen ist (Anhang Abbildung 54 2-NBDG und IFN- $\gamma$ ). Die Effektormoleküle Granzyme B und Perforin bleiben ebenfalls gänzlich unverändert (Anhang Abbildung 53). Die Chemokinsekretion von CCL3, CCL4 sowie CCL5 bleibt ebenfalls durch den Glukoseentzug und der davor stattfindenden

Langzeitstimulation mit hochdosiertem IL-15 (100 ng/mL) unbeeinflusst (Anhang Abbildung 54).

Abschließen lässt sich festhalten, dass die Glykolyse nicht essentiell für NK-Zellen betrieben werden muss oder entscheidend an der Regulation der IFN- $\gamma$  Produktion sowie an der zytolytischen Kapazität von humanen peripheren NK-Zellen beteiligt ist.

#### 5.2.8 NK-Zellantworten nach IL-15 Priming oder Kontakt mit proinflammatorischen Zytokinen besitzen eine mitochondriale Flexibilität

Die bisher aufgezeigten Ergebnisse zeigen, dass die NK-Zell Kapazität zur Induktion von funktionellen und metabolischen Antworten unabhängig von einem glykolytischen Metabolismus ist. Deshalb wurden in den nachfolgenden Analysen die Fähigkeit der NK-Zellen zur Verwendung von Pyruvat, Fettsäuren und Glutamin als Energiequelle für die mitochondriale Respiration genauer beleuchtet (gemäß Kapitel 2.7.2.3 Mito Fuel Flex Test). Hierzu wurden mit IL-15 primär inkubierte sowie teilweise sekundär stimulierte und unter Normoxie und chemisch-induzierter Hypoxie präkonditionierte gesamte NK-Zellen während der Blockade der drei Kohlenstoffquellen vermessen. IL-15 geprimte NK-Zellen wurden zunächst mit dem mitochondrialen Pyruvat-Inhibitor UK5099 und folglich sequenziell mit der Carnitin Palmitoyltransferase 1A Inhibitor Etomoxir und final dem Glutaminase Inhibitor BPTES versetzt. Dies spiegelt die Abhängigkeit der mitochondrialen Atmung von den verschiedenen Kohlenstoffquellen wieder. Bei diesen Resultaten zeigt sich ein signifikanter Abfall der OCR nach Zugabe aller drei Inhibitoren. Die alleinige Inhibition der Glykolyse hatte keinen Effekt (Abbildung 31 A). Es zeigte sich während der Fatty Acid Dependency keinerlei Effekte (Abbildung 31 B). Lediglich eine sequentielle Stimulation mit IL-15 sowie IL-12 und IL-18 unter DMOG präsentierte bei totaler Inhibition der Aufnahme der Kohlenstoffquellen eine Steigerung der mitochondrialen Atmung (Abbildung 31 C). Zusätzlich werden im Rahmen dieser Arbeit die respiratorische Kapazität von IL-15 geprimte NK-Zellen nach sekundärer Aktivierung durch IL-12 und IL-18 analysiert. Dabei zeigt sich nach sekundärer Stimulation und chemisch-induzierter Hypoxie eine gesteigerte respiratorische Kapazität der Fettsäuren, im Vergleich zu der gleichen Stimulation unter Normoxie (Abbildung 31 D).

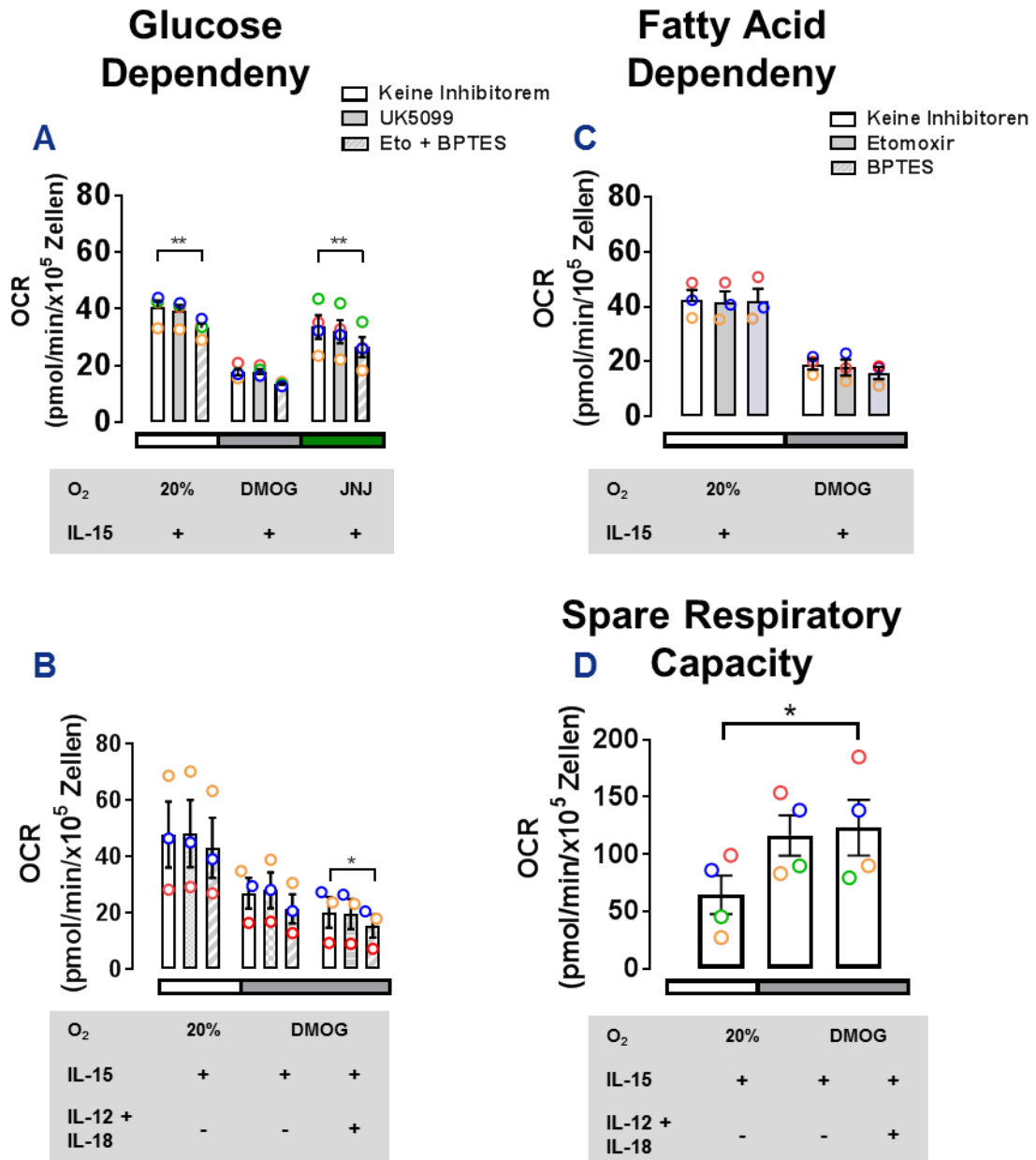


Abbildung 31: Sauerstoffverbrauchsrate in Abhängigkeit von Pyruvat (Glukose), Glutamin und langkettigen Fettsäuren.

NK-Zellen wurden mit einer chemisch-induzierten Hypoxie (DMOG und JNJ) zur Analyse der Sauerstoffverbrauchsrate und mitochondrialen Atmung unter den verschiedenen Kohlenstoffquellen ausgesetzt. **(A)** zeigt die Sauerstoffverbrauchsrate unter Analyse der Glukoseabhängigkeit. **(B)** zeigt die Sauerstoffverbrauchsrate unter Untersuchung der Abhängigkeit gegenüber Glukose und IL-15 Priming mit sekundärer IL-12 und IL-18 Stimulation darbietet. **(C)** verdeutlicht die Sauerstoffverbrauchsrate unter Analyse der Abhängigkeit gegenüber Fettsäuren. **(D)** präsentiert die respiratorische Kapazität anhand des Mito Stress Test nach sukzedaner Stimulation von IL-15 gefolgt von IL-12 und IL-18. (n=3) Die statistische Auswertung erfolgte mittels Kruskal-Wallis Test, dabei gilt \*p<0,05.

Diese Daten zeigen während einem Priming mit proinflammatorischen Zytokinen Änderungen in der Sauerstoffkonzentration und damit eine inhärente metabolische Flexibilität zur Kontrolle der verwendeten mitochondrialen Substrate.

### 5.2.9 NK-Zellen zeigen keine direkte Abhängigkeit von oxidativer Phosphorylierung und Fettsäuremetabolismus

Zur Analyse der Flexibilität gegenüber den verfügbaren Kohlenstoffquellen wurden die Expressionen und Frequenzanteile auf NK-Zellen nach aufeinanderfolgenden Stimulation von IL-15 Priming (sechs Stunden) mit IL-12 und IL-18 (zusätzliche vier Stunden) analysiert (gemäß Abbildung 13). Bodipy FL C<sub>16</sub> dient als Surrogate für Lipide. Die Lipid Frequenz ist sowohl unabhängig vom Sauerstoffpartialdruck (DMOG), als auch von der Zytokinstimulation (Abbildung 32 % Bodipy<sup>TM</sup> FL C<sub>16</sub>). Ein ähnliches Bild ergibt sich auch bei der FL C<sub>16</sub> MeFI (Abbildung 32 MeFI Bodipy<sup>TM</sup> FL C<sub>16</sub>). Sowohl unter NK-Zell Priming, wie auch unter Hypoxie bestehen bei NK-Zellen keine Unterschiede im Fettsäuremetabolismus. Zur weiteren Analyse der mitochondrialen Abhängigkeit und der damit verbundenen oxidativen Phosphorylierung (Abbildung 32 MeFI ROS) konnte ebenfalls eine geringfügige Abnahme durch sequentielle Stimulation festgestellt werden. Dieser Effekt ist losgelöst vom vorherrschenden Sauerstoffpartialdruck. Durch das IL-15 Priming mit zusätzlicher sekundärer Stimulation scheint ein Schutz vor reaktiven Sauerstoffspezies vorzuliegen. Dies zeichnete sich bereits durch die alleinige Gabe der proinflammatorischen Zytokine IL-12 und IL-18 ab. Die mitochondriale Abhängigkeit der NK-Zellen wird nicht weiter durch Stickstoffmonoxid beeinflusst. Dieses vasoaktive Molekül ändert seine Freisetzung durch den Kontakt mit Zytokinen und reduzierten Sauerstoff nicht. Folglich bleibt sowohl die oxidative Phosphorylierung, sowie die durch Arginase-1 Depletion vermittelte mikrobielle Elimination unverändert (Abbildung 32 MeFI iNOS).

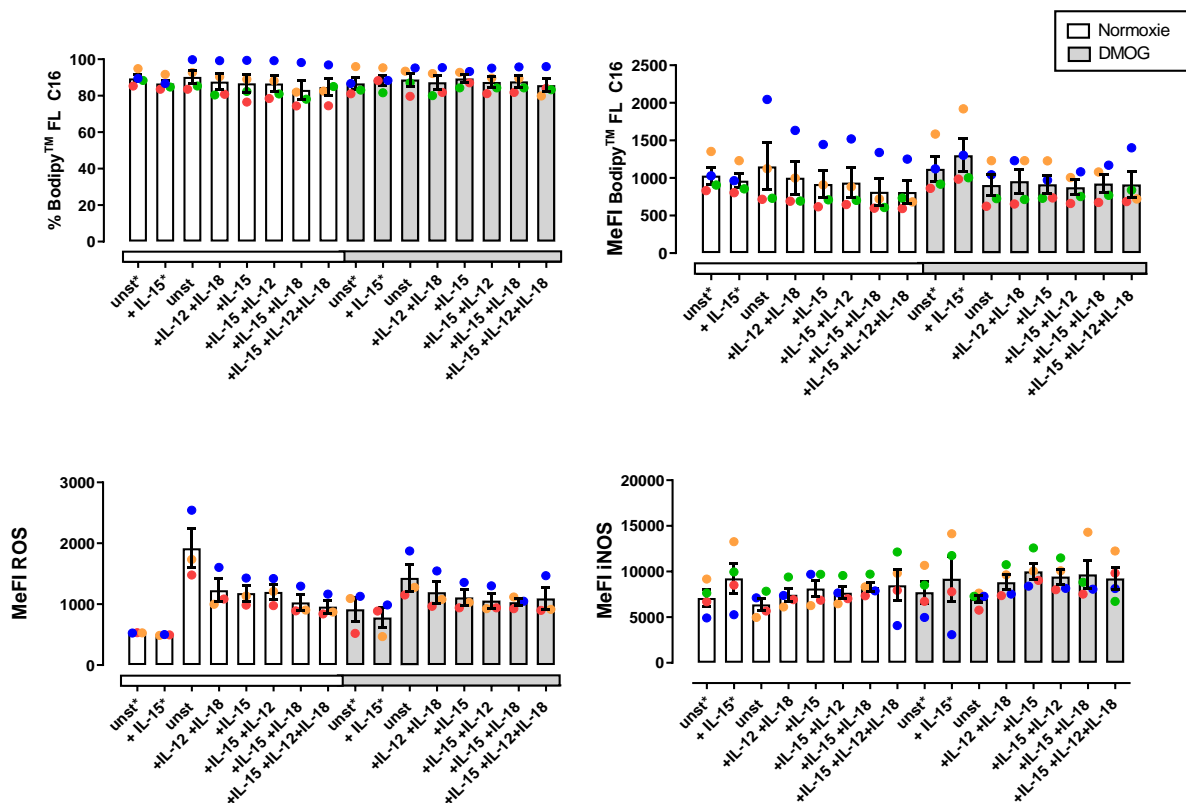


Abbildung 32: Analyse der Verwendung anderer Kohlenstoffquellen und Produktion von NO unter Normoxie und DMOG.

Der Versuch wurde unter Normoxie und DMOG mit gleichen Stimulationsbedingungen durchgeführt (n=3). Die NK-Zellen wurden präkonditioniert und anschließend für 10h alleine oder sequenziell mit IL-12 und/oder IL-18 stimuliert. Eine Ausnahme hiervon bildet +IL-15\*, diese sind für 6h mit IL-15 inkubiert.

Die statistischen Auswertungen beruhen auf dem Kruskal-Wallis-Test. (**%Bodipy**) Prozentuale Anteile der Bodipy<sup>+</sup> NK-Zellen. (**MeFI Bodipy**) beschreibt die Anzahl der Bodipy MeFI pro NK-Zelle. (**MeFI ROS**) zeigt die Anzahl der ROS MeFI pro NK-Zelle. (**MeFI iNOS**) präsentiert die Anzahl der NO MeFI pro NK-Zelle, aufgrund der Bestimmung iNOS Synthese.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass während einer sequentiellen Stimulation mit proinflammatorischen Zytokinen nach Priming oder Reduktion des Sauerstoffpartialdrucks keinerlei Veränderungen des Fettsäuremetabolismus oder der oxidativen Phosphorylierung vorliegen. Weiter zeigen diese Daten eine unveränderte vasoaktive Funktion von Stickstoffmonoxid ohne erkennbaren metabolischen Einfluss ist. Somit kann weiterhin von einer anhaltenden metabolischen Flexibilität zur Kontrolle der verwendeten mitochondrialen Substrate ausgegangen werden.

#### 5.2.10 Zeitabhängigkeit der Chemokinrezeptorexpression nach Migration

Aus Vorversuchen mit IL-15 Priming und sekundärer Stimulation liegen Erkenntnisse vor, dass es Veränderungen der Chemokinrezeptoren über die Zeit gibt, diese jedoch unabhängig von den Chemokin- und Zytokin-Stimulationen und dem umgebenden Sauerstoffpartialdruck sind (Anhang Abbildung 52).

Die Rezeptorexpression der drei Rezeptoren CCR1, CCR3 und CCR5 präsentieren nach Migration (Abbildung 33) und nach sekundärer Stimulation mit Chemokinen für die Rezeptorfrequenz keine signifikanten Unterschiede. Die medianen Fluoreszenzintensitäten ermöglichen eine Aussage zur relativen Anzahl der Rezeptoren pro NK-Zelle. Die Abbildung 33 CCR1 verdeutlicht, dass die CCR1-Expression durch eine Migration signifikant nach sekundärer Stimulation sinkt. Direkt nach der Isolation der Zellen zeigt sich eine Expression von rund 75% der NK-Zellen, während nach der Migration maximal 15% der NK-Zellen CCR1 exprimieren (Abbildung 33). Dieser Unterschied ließ sich bereits zwischen Tag1 und Tag 2 während der Langzeitstimulation beobachten (Anhang Abbildung 52). Eine zusätzliche Analyse der Chemokin-Rezeptorexpression nach Migration der Zellen durch Matrigel zeigte keine statistisch signifikanten Veränderungen zwischen den verschiedenen Stimuli nach 48 Stunden (Abbildung 33). Generell ist jedoch erkennbar, dass IL-15 alleine oder im Cocktail mit CCL3, CCL4 und CCL5 in einer verringerten Expression resultiert. Ebenfalls zeigte sich, dass die CCR5 Rezeptordichte im Vergleich zu den beiden anderen Rezeptoren CCR3 und CCR4 doppelt so hoch ist. Die Stimulation mit reinem IL-15 sowie der Kombination aus IL-15 mit den Chemokinen führte bei allen drei Rezeptoren zu einer Abnahme der Rezeptoranzahl pro Zelle (Anhang Abbildung 52). Die Tendenz zur gesteigerten Expression zwischen den nicht stimulierten Zellen und den einzelnen Stimuli ist ebenfalls nach Migration signifikant (Abbildung 33). Ebenfalls entstehen keine Auswirkungen aufgrund des veränderten Sauerstoffpartialdrucks (Abbildung 52 MeFI).

CD62L wird zur Rekrutierung der NK-Zellen zu inflammatorischen Lymphknoten in Anwesenheit von pathogenen Zellen, wie Tumorzellen, benötigt (Gregoire et al., 2007). Es wird deshalb neben den bisher untersuchten Chemokinrezeptoren zur Migration bei systemischen Inflammationen gebraucht. Abbildung 33 zeigt die Expression von CD62L auf migrierten NK-Zellen nach 48 Stunden. Nach der Isolation wiesen NK-

Zellen eine höhere CD62L Expression, als nach 48 stündiger Inkubation, aus. Die der Migration zeigt eine hoch signifikante Reduktion der Expression durch IL-15, IL-12 und IL-18, im Vergleich zu den nicht stimulierten Zellen. Die Interaktion von CD63L durch das Endothel ist nicht von IL-15 abhängig. CD62L geht unter Priming und sekundärer Stimulation verlustig. In der CD62L Expression sind zwischen den Matrigel migrierten Zellen, die durch ein beschichtetes Insert migriert sind, keine Unterschiede zu verzeichnen (Abbildung 52). Der Vergleich der medianen Fluoreszenzintensität zeigt keine signifikanten Veränderungen in der Moleküldichte am Tag 0 und nach 48-stündigem Migrationsassay. Es bestehen jedoch signifikante Veränderungen zwischen Kontrollen und Matrigel. So wiesen NK-Zellen, die durch die unbeschichteten Inserts migriert sind, stets eine höhere Dichte an CD62L auf, als die durch Matrigel migrierten Zellen (Abbildung 33).

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die Chemokinrezeptorexpression sowohl eine Abhängigkeit gegenüber der Zeit als auch eine leichte Korrelation für CCR3 gegenüber den Stimuli besitzt. Eine Abhängigkeit gegenüber dem Sauerstoffpartialdruck oder den Chemokinen besteht nicht. Ebenso zeichnet sich in der Anzahl der exprimierten Moleküle keine Korrelation zu den Stimuli ab, sondern gegenüber der Zeit ab. Somit lässt sich zusammenfassen, dass ein Einfluss des Matrigels auf die Rezeptorexpression von NK-Zellen besteht. Für die Frequenz der Rezeptoren zeigt sich eine Wechselwirkung der NK-Zellen mit dem Matrigel. Die qualitativen Effekte scheinen nicht durch die Zytokine oder Chemokine bedingt, sondern durch das Matrigel. Weitere Analysen zeigen, dass jene Zellen, welche durch die unbeschichteten Inserts migriert sind, eine höhere Dichte an CCR1-, CCR3- und CCR5-Oberflächenrezeptoren aufweisen. Die Rezeptorexpressionen zeigten keine Veränderungen durch das Matrigel. Zusätzlich lässt sich festhalten, dass die CD62L Expression nach 48-stündiger Migration abnimmt. Es zeigt sich kein Einfluss des Matrigels auf die CD62L Expression. Die Dichte der CD62L Moleküle ist nach der Migration durch die Kontrollinserts gegenüber dem Matrigel erhöht.

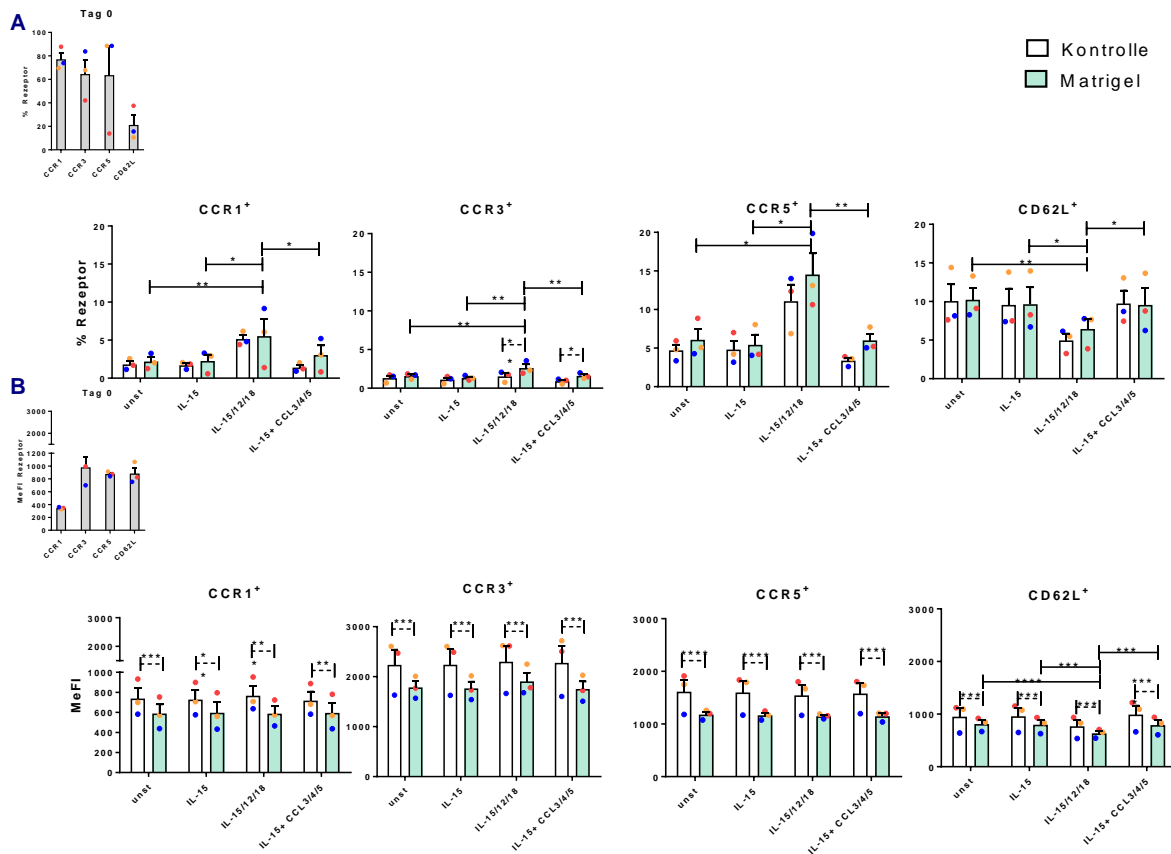


Abbildung 33: Expression der CCR1, CCR3 und CCR5 Rezeptoren sowie des Oberflächenproteins CD62L und die dazugehörigen MeFIs nach Migration.

Die Statistische Auswertung erfolgte mittels Two-Way ANOVA (Varianzanalyse) (n=3). **(A)** Darstellung der Prozent Rezeptorpositiven von CCR1, CCR3, CCR5 und CD62L auf NK-Zellen. **(B)** Mittlere Fluoreszenzintensität von CCR1, CCR3, CCR5 und CD62L auf NK-Zellen. Signifikante Veränderungen zwischen den einzelnen Stimulationsbedingungen sind mit einer durchgezogenen Linie gekennzeichnet. Signifikante Unterschiede zwischen Kontrolle und Matrigel sind mit gestrichelten Linien dargestellt. Es gilt: \*p<0,05; \*\*p<0,01, \*\*\*p<0,001.

### 5.2.11 NK-Zell-Migration ist unabhängig von der Glykolyse

Zur Bestimmung der Zellatmung in lebenden Zellen wird der Mito Fuel Flex Test verwendet. Abbildung 34 verdeutlicht, dass die Stimulation der NK-Zellen mit IL-15, IL-12 und IL-18 zu einer Steigerung der Sauerstoffverbrauchsrate führt. Eine sekundäre Stimulation mit den Chemokinen führte zu keinen Veränderungen.

Darüber hinaus wird zur Messung der glykolytischen Funktion der NK-Zellen der Glykolyse Stress Test eingesetzt. Abbildung 34 C zeigt keine statistisch signifikanten Veränderungen des glykolytischen Flusses durch die verschiedenen Stimuli. Nach IL-15 Priming (sechs Stunden) und anschließender Stimulation mit IL-12 und IL-18 ist eine Tendenz zur Steigerung des glykolytischen Flusses, welche jedoch im Vergleich zu den beiden anderen Konditionen nicht signifikant ist. Ähnliches lässt sich bei der glykolytischen Kapazität (Abbildung 34 D) und der glykolytischen Reserve (Abbildung 34 E) feststellen.



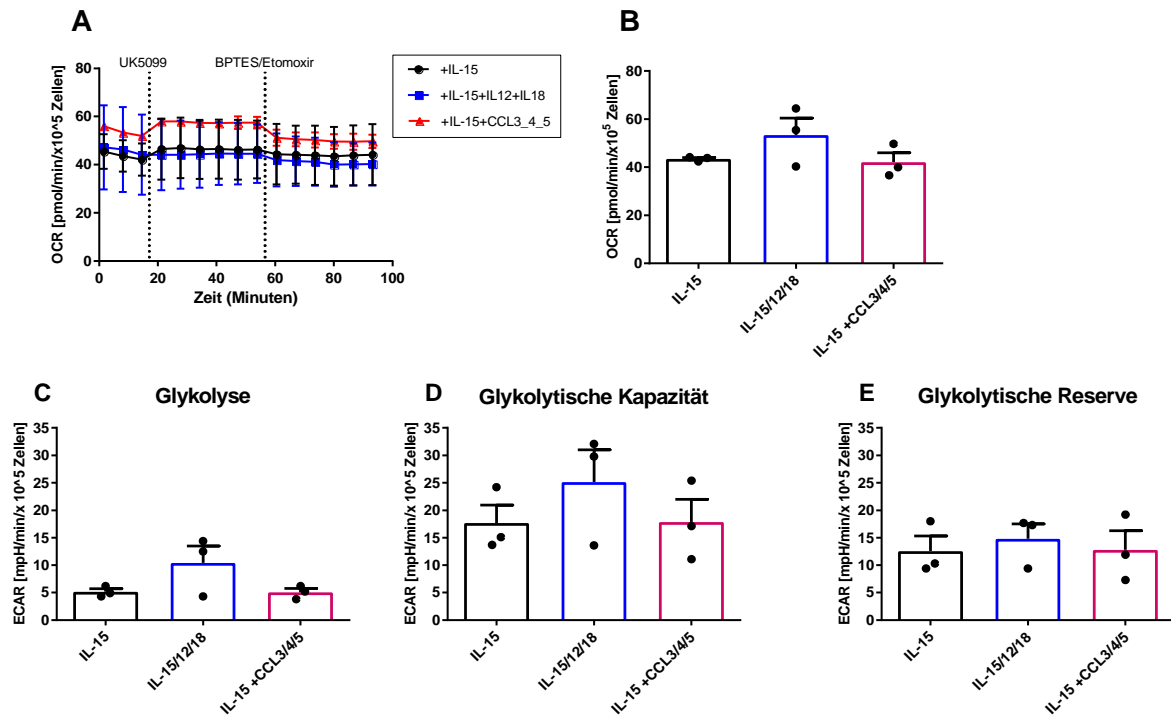


Abbildung 34: Ergebnisse des Mito Fuel Flex Test und Glykolyse Stress Test stimulierter NK-Zellen aus gesunden Probanden.

**(A)** Die Abbildung zeigt exemplarisch die Sauerstoffverbrauchsrate über die Zeit der NK-Zellen eines Probanden. Die gestrichelten Linien verdeutlichen die Injektionen der drei mitochondrialen Inhibitoren. UK5099 blockiert den Pyruvattransport, Etomoxir hemmt die Verstoffwechslung der Fettsäuren und BPTES hemmt die Verstoffwechslung von Glutamin. **(B)** Das Diagramm zeigt die Mittelwerte der OCR Ergebnisse ermittelt aus den drei gesunden Probanden (n=3). Die Diagramme **(C-E)** zeigen die ECAR Mittelwerte im Rahmen des Glykolyse Stress Test. **(C)** Die Rate der Glykolyse unter den drei verschiedenen Stimulationen. **(D)** die Glykolytische Kapazität stellt das zelluläre Maximum der Glykolyse dar, die aus der Injektion des Oligomycin (ATP Synthase Inhibitor) resultiert, welches die Verschiebung der Energieproduktion hin zur Glykolyse bedingt. **(E)** Die Glykolytische Reserve resultiert aus der Differenz von Glykolytischer Kapazität und Glykolytischer Rate. Die statistische Auswertung erfolgte mittels One-way ANOVA (Varianzanalyse).

Zusammenfassend lässt sich somit festhalten, dass die NK-Zellen durch die sekundäre Stimulation mit Chemokinen keine Unterschiede in der mitochondriale Atmung aufweisen. Die Messung des glykolytischen Flusses zeigte keine Abhängigkeit der NK-Zellen nach sekundärer Chemokinstimulation von der Glykolyse. Einzig das Priming mit IL-15 und der sequentiellen Stimulation mit IL-12 und IL-18 deutet eine Tendenz zur Steigerung des glykolytischen Flusses an.

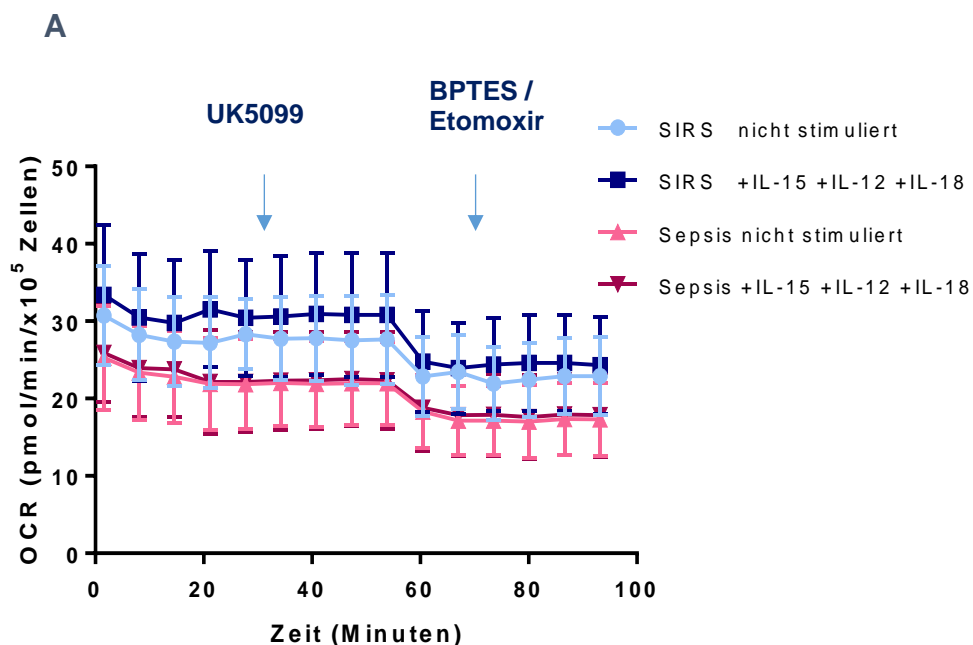
### 5.3 Metabolismus und Funktionen von NK-Zellen aus Patienten mit SIRS und Sepsis

Die Ergebnisse der Transkriptomanalyse (Kapitel 2.6) zeigen, dass die oxidative Phosphorylierung sowie der Zellzyklus signifikant zwischen SIRS und Sepsis trennt. Hinzu kommen die Erkenntnisse aus Probanden, welche zeigen, dass sie unabhängig gegenüber dem aktiven glykolytischen Metabolismus sind und eine inhärente Flexibilität gegenüber der vorherrschenden Kohlenstoffquelle nach IL-15 Priming und sekundärer Stimulation besitzen (Abbildung 3).

### 5.3.1 Metabolismus

Die Abhängigkeit der Kohlenstoffquelle Glukose wurde, sowohl in der Patientengruppe mit SIRS als auch derer mit Sepsis, durch die Verwendung des Mito Fuel Flex Test (Kapitel 2.7.2.3 und 4.10.11.2), untersucht (Abbildung 35). Die OCR der Patienten wurde in nicht stimulierten aber mit IL-15, IL-12 und IL-18 versetzten Zellen gemessen. Hierzu wurden sie sequentiell mit dem mitochondrialen Pyruvatinhibitor UK5099, dem Palmitoyltransferase Inhibitor Etomoxir und Fettsäuremetabolismus Inhibitor BPTES versetzt (Kapitel 4.10.11.2). In der Gruppe der Patienten mit SIRS war die Sauerstoffverbrauchsrate deutlicher stärker als bei Patienten mit Sepsis (Abbildung 35 A) ausgeprägt und konnte durch die Zugabe von proinflammatorischen Zytokinen weiter erhöht werden. Daraus lässt sich ableiten, dass es zu keinem Wechsel der Kohlenstoffquelle, aber zumindest zu einem klaren Abfall des glykolytischen Metabolismus bei Patienten mit Sepsis kommt. Es existiert eine Tendenz zur verminderten Sauerstoffverbrauchsrate bei Sepsis, ohne statistische Signifikanz zu erreichen. Die kumulative Inhibition aller Kohlenstoffquellen führt zu einer konsistenten Reduktion der Zellatmung. Bei zwei Sepsis Patienten zeigt sich in der Einzelanalyse eine höhere OCR als in SIRS Patienten. Dies verstärkt eine mögliche Tendenz (Abbildung 35 B). Folglich ist davon auszugehen, dass NK-Zellen nicht von aerober Glykolyse abhängig sind.

Ein ähnliches Bild ergibt die Analyse der Glut-1 Frequenz im Vollblut und die Frequenzanalyse der 2-NBDG auf PBMC bei Patienten mit SIRS als auch in der Gruppe der Sepsis Patienten zum Zeitpunkt der Intensivaufnahme im Rahmen der Validierungsgruppe. Hierbei lassen sich keine Unterschiede im Metabolismus der Patienten NK-Zellen feststellen (Abbildung 35).



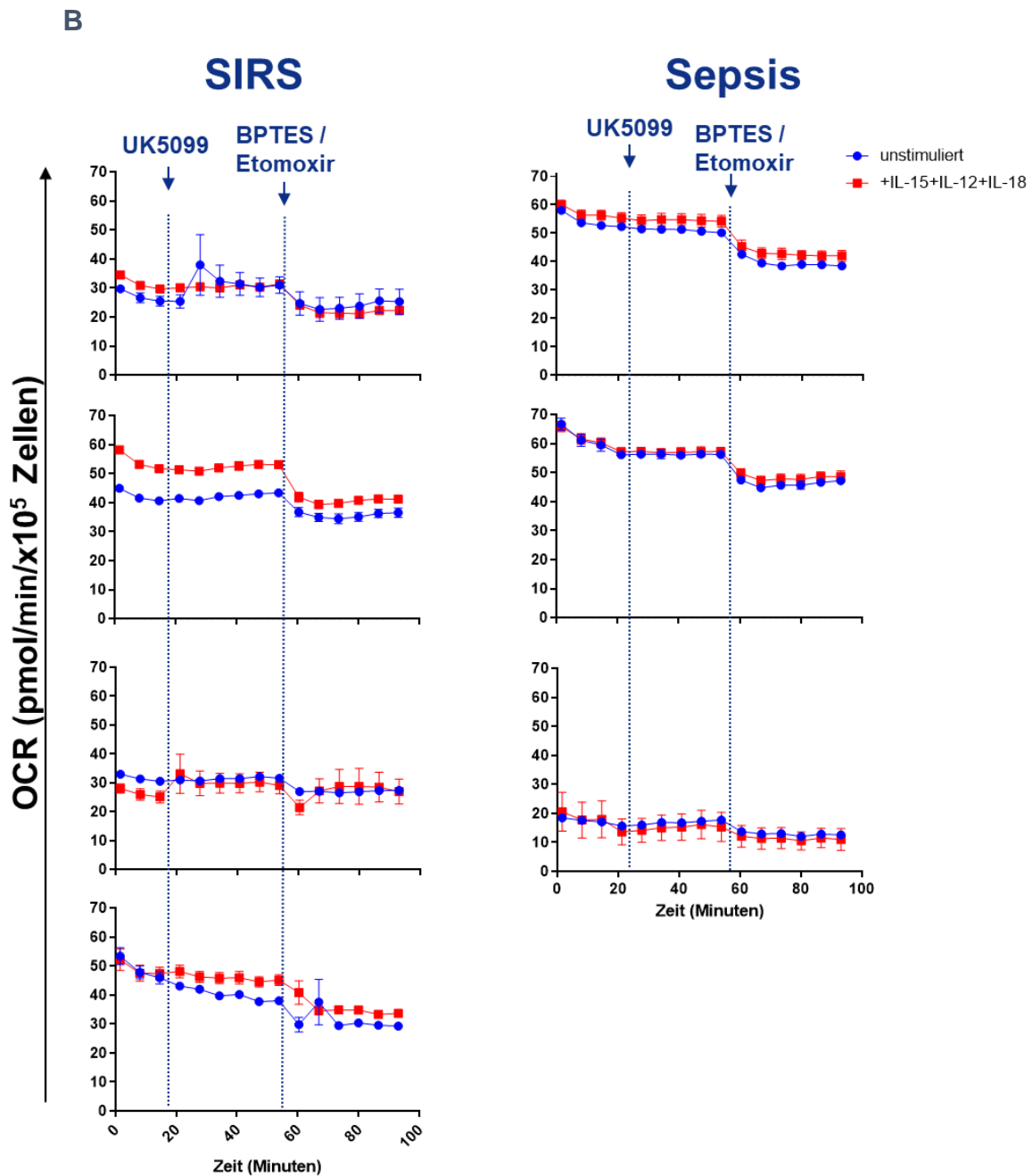


Abbildung 35: Ergebnisse des Mito Fuel Flex Test stimulierter NK-Zellen aus Patienten der Validierungsgruppe

**(A)** Die Abbildung zeigt die mittlere Sauerstoffverbrauchsrate der Patientengruppen über die Zeit. **(B)** zeigt die Einzelanalysen der Patienten mit SIRS und Sepsis. Alle Diagramme sind mit SEM dargestellt. Die Pfeile verdeutlichen die Injektionen der drei mitochondrialen Inhibitoren. UK5099 blockiert den Pyruvattransport, Etomoxir hemmt die Verstoffwechslung der Fettsäuren und BPTES hemmt den Metabolismus von Glutamin. (Sepsis n=3; SIRS n=4). Die statistische Auswertung erfolgte mittels One-way ANOVA (Varianzanalyse).

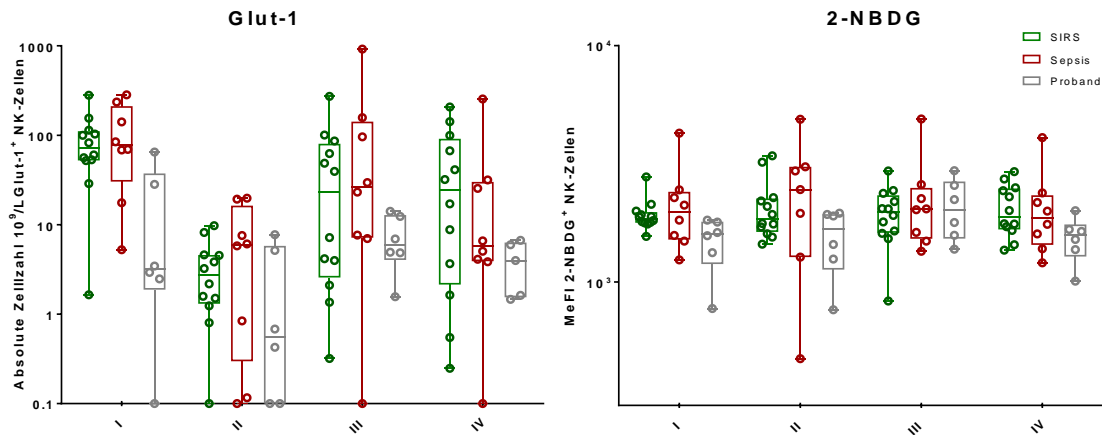


Abbildung 36: Durchflusszytometrische Analyse der absoluten Zellzahl von Glut-1<sup>+</sup> und die Frequenz der 2-NBDG<sup>+</sup> NK-Zellen in Patienten der Validierungsgruppe bei Intensivaufnahme.

Periphere Vollblutanalyse (**Glut-1**) und Analyse der (**2-NBDG**) MeFI aus PBMC bei Patienten mit SIRS und Sepsis im Rahmen der Validierungsgruppe. Den Patienten wurde EDTA-Vollblut bei Intensivaufnahme entnommen. SIRS n=12, Sepsis n=8, Wilcoxon-Rangsummen-Test.

Die Erkenntnisse aus den Probanden sind damit auf die Patienten mit SIRS und Sepsis übertragbar, sodass NK-Zellen bei Patienten zwar eine Tendenz zur gesteigerten Sauerstoffverbrauchsrate aufweisen, aber weiterhin eine hohe metabolische Flexibilität gegenüber der verfügbaren Kohlenstoffquelle besitzen und einen nicht-glykolytischen Metabolismus favorisieren. Somit sind NK-Zellen nicht von aerober Glykolyse abhängig.

### 5.3.2 Zellzyklus, Zellproliferation und Apoptose von NK-Zellen bei Patienten

Wie nach der Pathwayanalyse der Transkriptomdaten (Kapitel 2.6, Abbildung 3) zeigte die Proliferationsanalyse eine durch Zytokine bedingte stärkere Proliferation in Patienten mit Sepsis im Vergleich zu Probanden (Abbildung 37). Dabei wurde der Effekt der einzelnen Stimulation mit IL-15 gegen die Co-Stimulation von IL-15 mit weiteren proinflammatorischen Zytokinen (mit IL-15, IL-12 und IL-18) nach sieben Tagen analysiert. Wie Abbildung 37 zeigt, ist die Proliferation der Patienten mit Sepsis bereits unter reiner IL-15 Zugabe verstärkt. Diese markante Proliferation korreliert mit den bioinformatischen Daten der Vorarbeiten und präsentiert eine klare Trennung zwischen dem Probanden und den Patienten mit Sepsis. Die Zugabe weiterer proinflammatorischer Zytokine verstärkt die Proliferation (Abbildung 37).

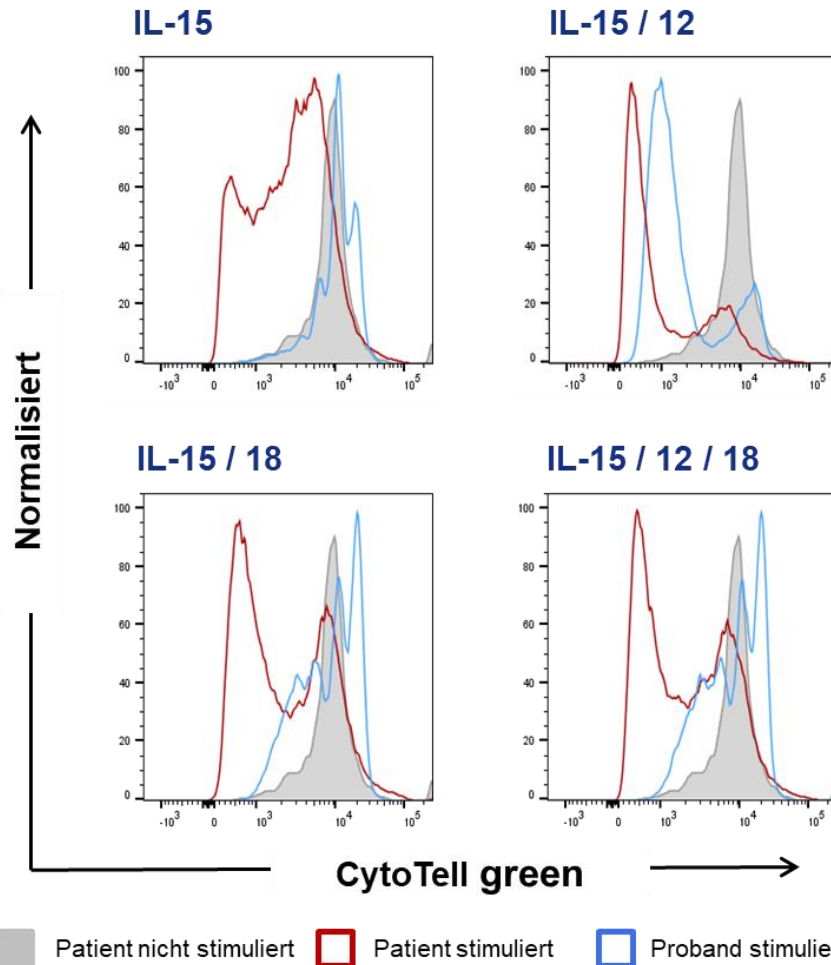


Abbildung 37: NK-Zell Proliferation nach Zytokin Stimulation eines Patienten mit Sepsis im Vergleich zu einem Probanden.

Proliferation von NK-Zellen unter Stimulation oder Co-Stimulation mit IL15 (45 ng/mL), IL-12 (10 ng/mL) und IL-18 (50 ng/mL) nach sieben Tagen im Vergleich zu nicht stimulierten Zellen des Patienten (grau). Proliferationsfarbstoff CytoTell™ green. Die Daten präsentieren als Histogramm der Proliferation die Stimulation in blau den Probanden und in rot den Patienten mit Sepsis.

Repräsentative Analysen von einem SIRS und zwei Sepsis Patienten der Entdeckungsgruppe zeigen eine stärkere Proliferation in Patienten mit Sepsis als mit SIRS nach sieben Tagen. Weiter verstärkt wird die Proliferation nach Kontakt mit proinflammatorischen Zytokinen (IL-15, IL-12 und IL-18; Abbildung 38). Dies ist übereinstimmend mit den zuvor bekannten Ergebnissen der Transkriptomanalyse (Abbildung 3) und wird in der separaten Validierungsgruppe weiter analysiert.

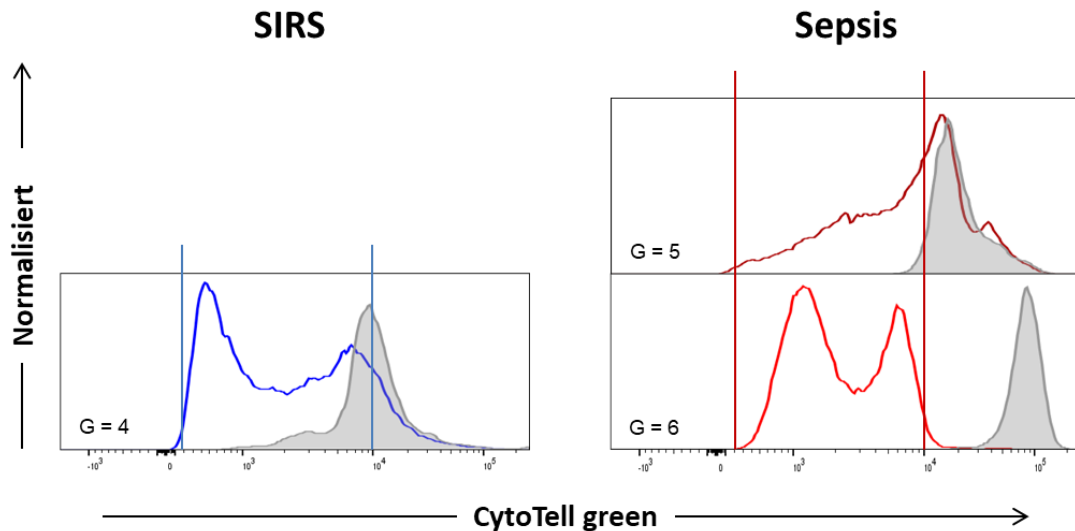


Abbildung 38: NK-Zell Proliferation nach siebentägiger Zytokin Stimulation von Patienten mit Sepsis und SIRS aus der Entdeckungsgruppe im Vergleich.

Proliferation von NK-Zellen nach Co-Stimulation mit IL-15, IL-12 und IL-18 nach sieben Tagen im Vergleich zu nicht stimulierten Zellen des Patienten. Proliferationsfarbstoff CytoT cell™ green. Daten repräsentieren in blau (SIRS; n=1) und in rot (Sepsis; n=2) Histogramme der Proliferation.

Im Rahmen der Validierungsgruppe wurden vier SIRS und drei Sepsis Patienten (siehe Kapitel 4.9.1 und 4.9.2) auf ihre Proliferationseigenschaften hin analysiert. Nach vier Tagen wurde die Proliferation der NK-Zellen vermessen. Frisch isolierte NK-Zellen wurden mit IL-15, IL-12 und IL-18 direkt nach der Isolation einmalig stimuliert. Als Kontrolle dienen NK-Zellen ohne Zusatz von proinflammatorischen Zytokinen. Wie Abbildung 39 zeigt, liegt eine Tendenz zu einer deutlich gesteigerten Proliferation in beiden Patientenkollektiven vor, jedoch ist die Proliferation vor allem in den SIRS Patienten ausgeprägter. Dies passt zu den Erkenntnissen aus Proliferationsanalysen der Entdeckungsgruppe, über sieben Tage. Als Referenz wurden Proliferationsanalysen von vier Probanden durchgeführt. Diese zeigen wie bereits in den Vorarbeiten beschrieben eine deutliche Proliferation unter der kombinierten Stimulation der proinflammatorischen Zytokine IL-15, IL-12 und IL-18 (Abbildung 39). Wie Abbildung 39 verdeutlicht, ist die Proliferation der Probanden nicht so stark wie die Proliferation der beiden Patientenkollektive ausgeprägt.

Tabelle 46 Durchschnittliche Proliferation der stimulierten NK-Zellen

	SIRS (n=4)	Sepsis (n=3)	Probanden (n=4)
Anzahl Generationen ± SD	7,25±0,83	8,3±1,25	7,25±0,43

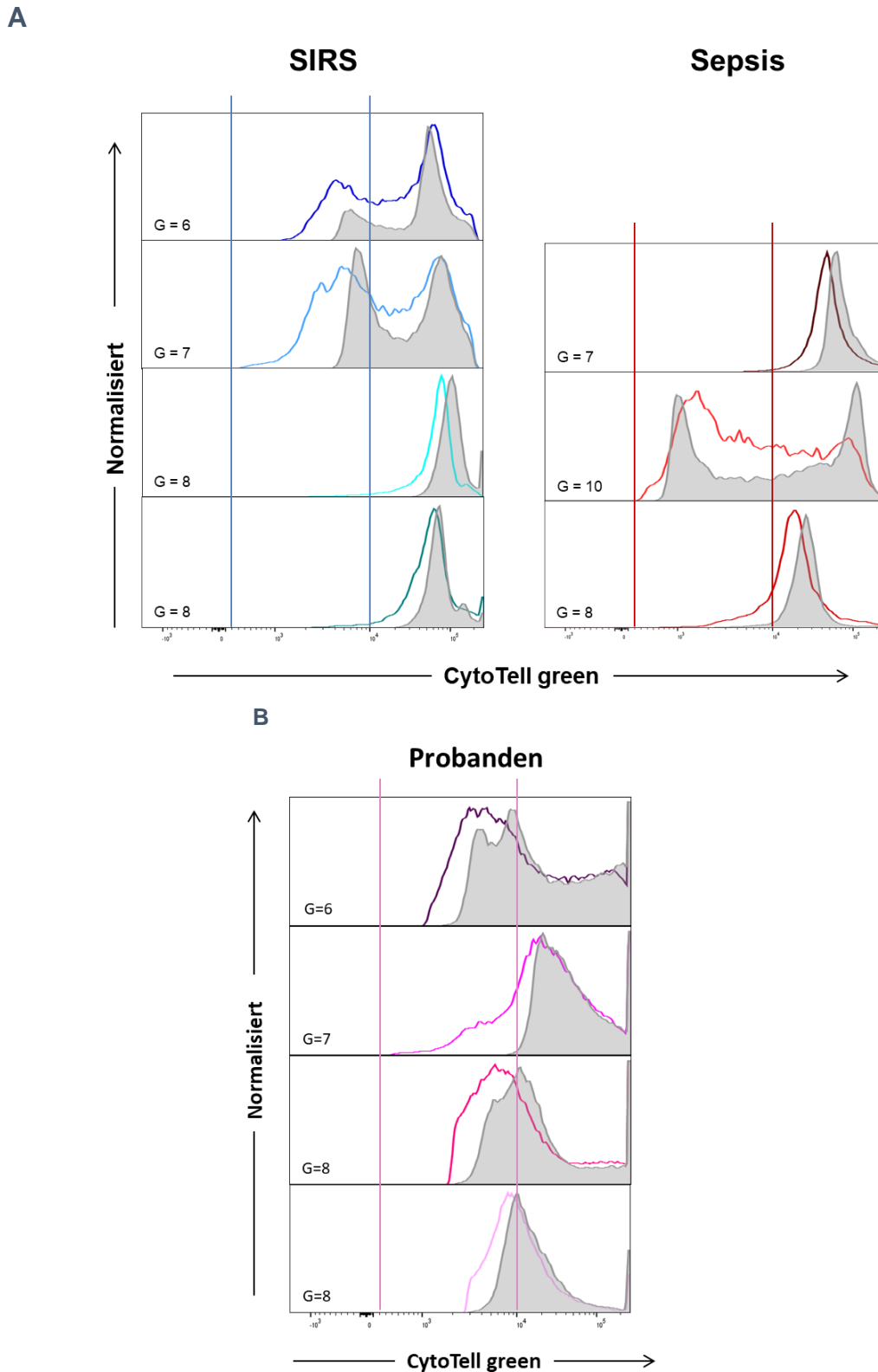


Abbildung 39: Vergleich der NK-Zell Proliferation nach viertägiger Zytokin Stimulation der Patientenkollektive Sepsis und SIRS aus der Validierungsgruppe gegenüber von Probanden.

Proliferation anhand des Proliferationsfarbstoff CytoTell™ green von NK-Zellen nach Co-Stimulation mit IL-15, IL-12 und IL-18 nach vier Tagen im Vergleich zu nicht stimulierten Zellen. **(A)** zeigt Vergleich der Proliferationen von Patienten mit SIRS (blau; n=4) und Sepsis (rot; n=3) im Vergleich zu den nicht stimulierten Zellen des Patienten (grau). **(B)** präsentiert den Vergleich der Proliferation von Probanden (pink; n=4). Die Daten stellen in blau Patienten mit SIRS (n=4), in rot Patienten mit Sepsis (n=3) und in pink Probanden (n=4) als Histogramme der Proliferation. Die Senkrechten stellen Referenzlinien dar.

Bioinformatischen Daten aus Vorarbeiten belegen, dass der Metabolismus und Zellzyklus signifikant zwischen Patienten mit SIRS und Sepsis differenzieren kann. Gleiches gilt auch für die Apoptose (Abbildung 3). Die Proliferationsdaten zeigen ihre stärkste Proliferation unter Zusatz von IL-15, IL-12 und IL-18. Diese Zytokine wurden ebenfalls für die Analyse der Apoptose aus drei gesunden Probanden über sieben Tage verwendet (Abbildung 40). Die Daten scheinen ein Plateau für die Anzahl der Generationen zu erreichen, sodass die Anzahl der Generationen und ihre Apoptosestadien nur bis Tag vier präsentiert sind. Darüber hinaus ist deutlich zu erkennen, dass die jüngste Generation stets die vitalste Generation ist. Die Stimulation mit proinflammatorischen Zytokinen deuten somit daraufhin, dass eine Zytokin-induzierte verstärkte Proliferation mit jungen energiereichen NK-Zellen favorisiert wird.

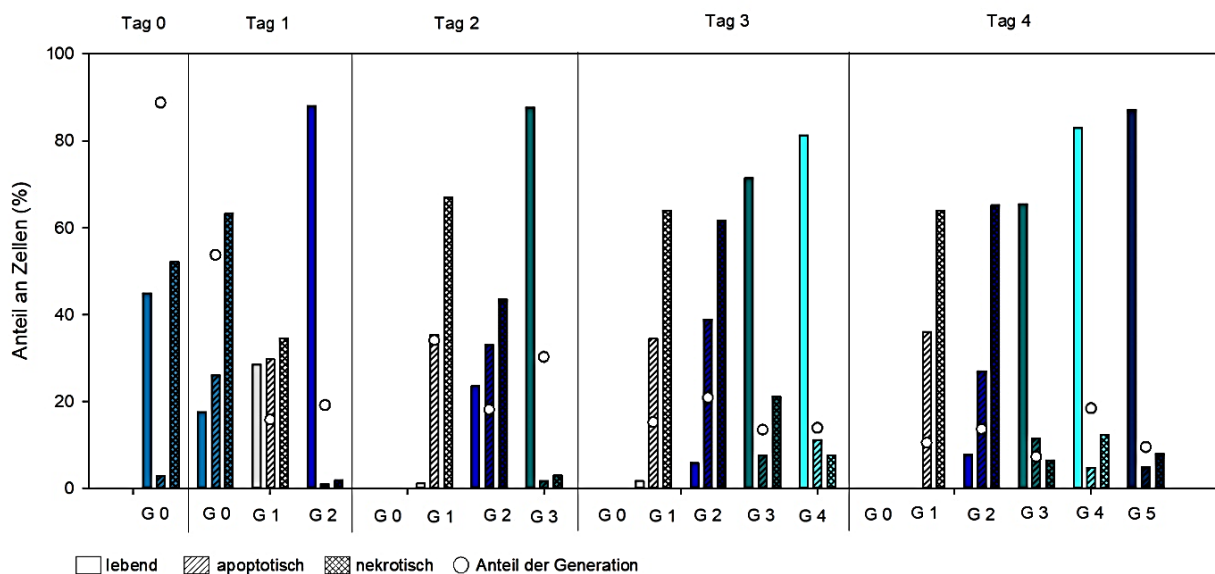


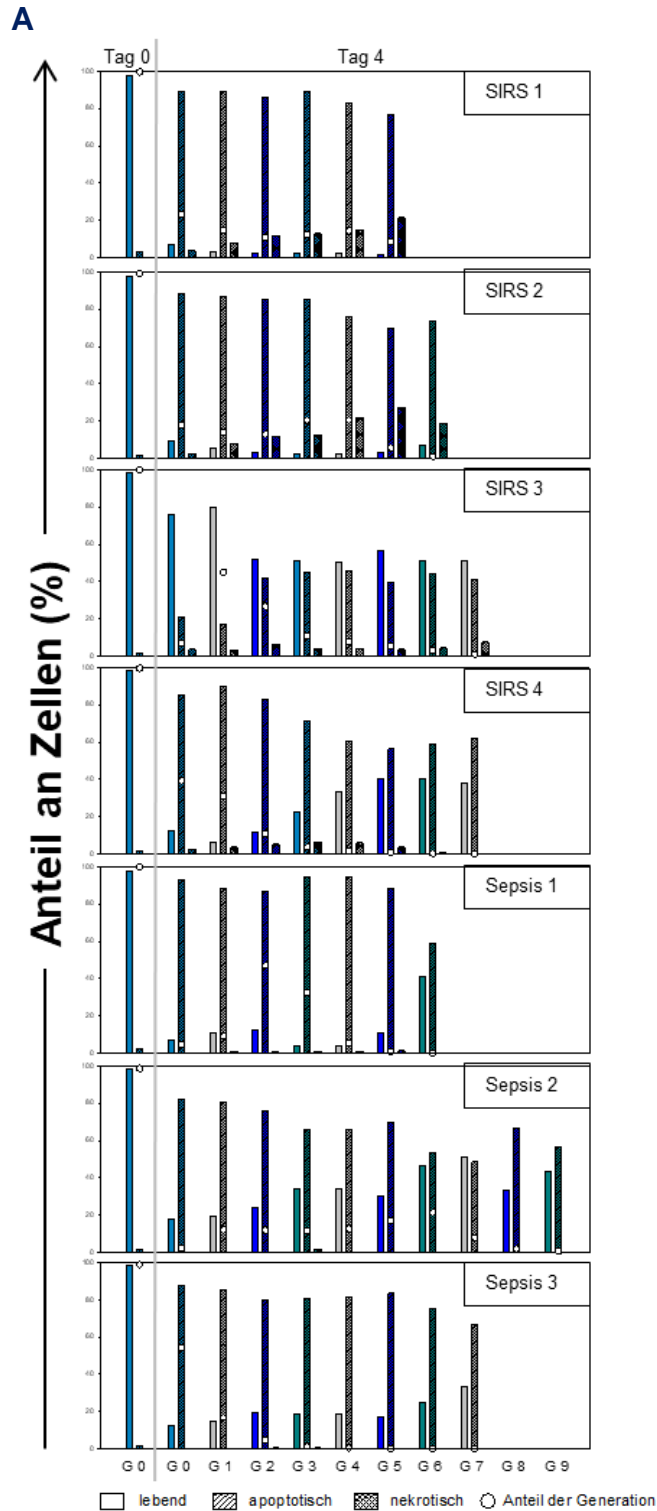
Abbildung 40: Übersicht der Apoptose während der Proliferation im zeitlichen Verlauf von Probanden.

Die NK-Zell Proliferation wurde nach Stimulation mit IL-12, IL-15 und IL-18 anhand von CytoTell™ green nach sieben Tagen gemessen (n=3). Die Abbildung zeigt die Anzahl der Generationen, den Anteil der Zellen je Generation und ihre Apoptose-Stadien nach Stimulation. Früh und spät apoptotische NK-Zellen wurden unter apoptotisch zusammengefasst. Der Apoptose Assay ist mittels 7-AAD und Annexin V vermessen und anhand der Balkendiagramme dargestellt. Die Dot Plots zeigen die medianen Anteile der NK-Zellen pro Generation und die Balkendiagramme der drei unterschiedlichen Apoptose-Stadien (lebend, apoptotisch und nekrotisch).

Nach den Erkenntnissen aus den Probanden wurde die Apoptose nach der Proliferation aus peripherem Patientenblut analysiert. Nach vier Tagen Proliferation zeigt sich eine starke Zunahme der Anzahl der Generationen. Dies deuteten die Histogramme der Proliferationen bereits an Generationen (). Dabei zeigt sich im Vergleich zu den Probanden eine deutliche Zunahme in der Anzahl der Generationen. Von fünf Generationen bei der Kontrollgruppe der Probanden (Abbildung 40) auf sieben Generationen bei Patienten mit SIRS, respektive neun Generationen bei Patienten mit Sepsis (Abbildung 41). Die jüngste Generation besitzt bei den SIRS Patienten gegenüber den Sepsis Patienten einen noch höheren Anteil an lebenden. In dem Kollektiv der Sepsis Patienten existieren keine nekrotischen NK-Zellen, jedoch fanden sich hier fast die Hälfte an apoptotischen Zellen (Abbildung 41 Sepsis). In dem Kollektiv der SIRS Patienten bestätigt sich, dass jeweils die jüngste Generation die



vitalste und energiereichste Generation ist. In der Gruppe der Sepsis Patienten kristallisiert sich die Teilung der Zellen heraus, wobei die jüngste auch die vitalste Generation ist. Folglich kann von einer Proliferation der Sepsis Patienten NK-Zellen ausgegangen werden, wobei zeitgleich ihre vorangegangenen Generationen verenden.



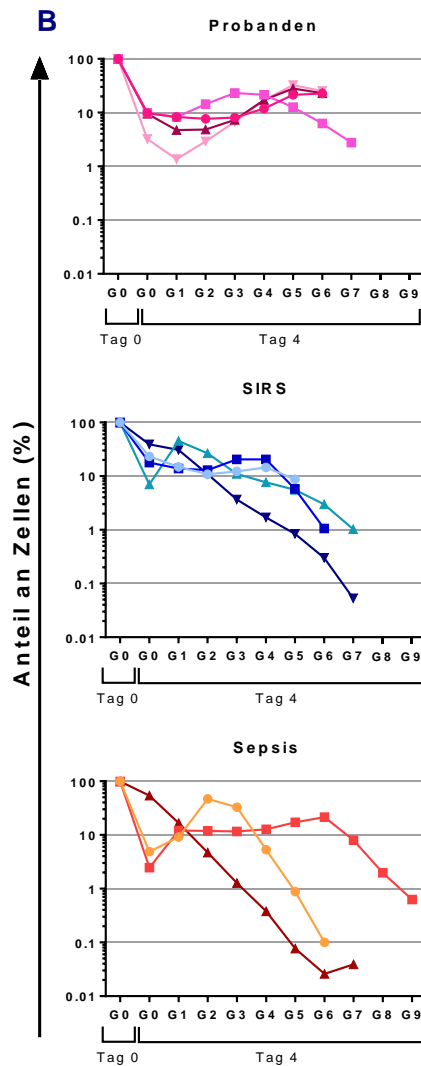


Abbildung 41: Proliferation von Patienten der Validierungsgruppe mit SIRS und Sepsis sowie die Bestimmung der Viabilität und Apoptose.

Die NK-Zell Proliferation wurde nach Stimulation mit IL-12, IL-15 und IL-18 anhand von CytoTell™ green gemessen und der Apoptose Assay wurde mittels 7-AAD und Annexin V vermessen. **(A)** zeigt die Anzahl der Generationen, den Anteil der Zellen je Generation und ihre Apoptose-Stadien nach Stimulation. Die Dot Plots zeigen die medianen Anteile der Zelle pro Generation und die Balkendiagramme die Apoptose-Stadien. **(B)** zeigt den Anteil der Zellen je Generation an Tag 0 und Tag 4, als Dot Plot. Jeder Patient ist in einer einzelnen Farbe dargestellt. SIRS n=4; Sepsis n=3, Probanden n=3.

Zusammenfassend lässt sich somit festhalten, dass proinflammatorische Zytokine (IL-12, IL-15 und IL-18) eine verstärkte Proliferation im Vergleich zur Kontrollgruppe induzieren.

Die Rezeptoranalysen der SIRS und Sepsis Patienten zeigen nach der Proliferation eine signifikant reduzierte CD16 Expression. Dies ist unabhängig von der Zytokinstimulation und in beiden Patientengruppen gleichermaßen verteilt. Ein analoges Bild ergibt sich bei Betrachtung der CD16 MeFl. Die Anzahl der CD16 Moleküle pro Zelle nimmt nach der Proliferation signifikant ab. Für Patienten mit Sepsis

ist diese höchst signifikant. Für beide Patientengruppen zeigt der Transferrin Rezeptor CD71 keine Veränderungen nach der Proliferation und Stimulation. Für die CD71 MeFI deutet sich geringfügige Steigerung der Molekülanzahl pro Zelle nach Stimulation und Proliferation, insbesondere für Sepsis Patienten, ab. Für Ki-67 zeichnet sich ohne Stimulation eine Reduktion der Ki-67 Expression an. Für Patienten mit SIRS ist ein signifikanter Anstieg der der Ki-67 Frequenz nach Proliferation und IL-15, IL-12 und IL-18 Stimulation ab. Für die Patientenkollektive SIRS und Sepsis zeigt sich ebenso geringfügige Steigerung der Ki-67 MeFI nach einer Stimulation und Proliferation (Abbildung 42).

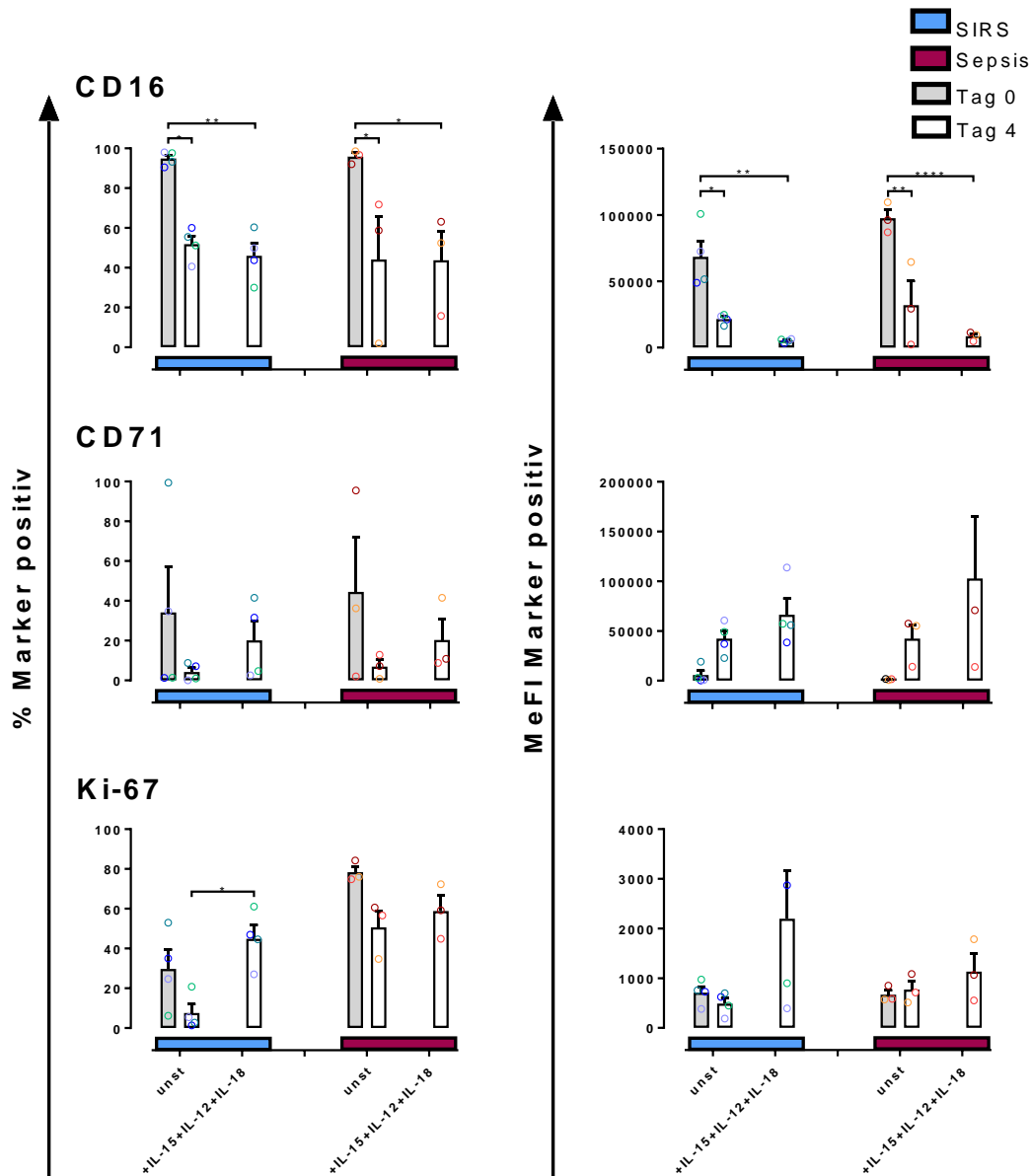


Abbildung 42: Durchflusszytometrische Analyse von mit Proliferation, Wachstum und Zytotoxizität assoziierten Proteinen nach Proliferation bei Patienten mit SIRS und Sepsis der Validierungsgruppe.

Es wurden NK-Zellen aus beiden Patientengruppen isoliert, stimuliert (IL-15, IL-12 und IL-18) und nach vier Tagen auf ihre Proliferationseigenschaft analysiert. **(CD16)** zeigt die mittlere Frequenz und MeFI vor und nach der Proliferation. **(CD71)** präsentiert die mittlere Frequenz und MeFI vor und nach der Proliferation. **(Ki-67)** spiegelt die mittlere Frequenz und MeFI vor und nach der Proliferation. Patienten mit SIRS n=4 und Sepsis n=3. Statistische Analysen mittels TWO-Way ANOVA (Varianzanalyse), es gilt \*p<0,05, \*\*p<0,01, \*\*\*p<0,001, \*\*\*\*p<0,0001.

## 6 DISKUSSION

Diese Arbeit entstand mit dem Ziel auf molekularer Ebene die pathologischen Prozesse im Übergang von SIRS und Sepsis zu untersuchen und den Immunmetabolismus von gesunden NK-Zellen nach Priming weiter aufzuklären. Wichtig war dabei die molekularbiologischen Abläufe während des Krankheitsverlaufes zu verstehen, um Grundlagen zur Entwicklung von potentiellen Biomarkern zu liefern. Analysen haben gezeigt, dass periphere NK-Zellen zum Zeitpunkt oder kurz nach der Diagnose der Sepsis sowie bei Aufnahme auf die Intensivstation in ihrer Anzahl sowie ihrer Aktivität im Vergleich zu Probanden Differenzen aufweisen. Die von uns dargelegten Ergebnisse werfen ein neues Bild auf die Rolle der NK-Zellen, insbesondere auf ihre Homöostase und ihren Metabolismus. Dadurch sollte es zukünftig ermöglicht werden die Diagnose der Sepsis zu beschleunigen um eine frühzeitige, zielgerichtete Therapie einzuleiten.

Basis dieser Arbeit waren Untersuchungen aus Patientenblut gewonnene humane NK-Zellen, die im Übergang von SIRS zu Sepsis standen. Diese im Klinikalltag abgenommenen Laborproben wurden hinsichtlich ihrer funktionellen und metabolischen Eigenschaften untersucht. Als Referenz sowie für weitere *in vitro* Untersuchungen diente das Blut von Probanden sowie Buffy Coats aus der Blutbank des DRK Blutspendedienstes Mannheim.

### 6.1 Inflammatorische Mediatoren, NK-Zell Stadium sowie kontaktabhängige Zytotoxizität unterscheiden Patienten mit SIRS und Sepsis

Viele Erkrankungen lassen sich anhand von Veränderungen des Blutbilds diagnostizieren und mittels Laborkontrollen deren Krankheitsverläufe beobachten. Zusätzlich unterstützen sie mit ihren Laborparametern die Einteilung in Schweregrade im Krankheitsverlauf. Jede Stunde Zeitverzögerung vor Initiation einer antibiotischen Therapie erhöht die Mortalitätsrate der Sepsis um sieben Prozent (Kumar et al., 2006). Daher sind neue Strategien zu einer zeitnahen Diagnostik der Sepsis notwendig. Nutzung von Patienten nahen Checklisten (Bundle) zeigen in der Surviving Sepsis Campaign eine hohe, engmaschige Compliance hinsichtlich der Umsetzung der Leitlinien (Levy et al., 2018). In der vorliegenden Arbeit wurden die NK-Zellen aus dem Vollblut Patienten mit SIRS und Sepsis verglichen. Dies basierte primär auf durchflusszytometrischen, metabolischen Flussanalysen und Magnetic-Bead-Array-Analysen von Plasmaproteinen.

In dieser Arbeit gemessenen NK-Zellstadien lassen sich über die Marker CD11b und CD27 unterscheiden. Dabei existieren signifikante Unterschieden bei den Probanden. Wie im murinen Modell bereits von Guo et al. (2017) beschrieben, kann nach endogener IL-15 Stimulation von NK-Zellen die Anzahl der Stadium II CD11b<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup> und der Stadium III CD11b<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup> NK-Zellen erhöht sein. In der experimentellen Sepsis ist dies mit einem höheren Krankheitsschweregrad, aber nicht mit der Prognose assoziiert (Guo et al., 2017). Dieser Anstieg der prozentualen Frequenz gegenüber den Probanden ist so nicht zu erkennen, jedoch ergibt sich bei Analyse der absoluten Zellzahlen kein Unterschied zwischen SIRS und Sepsis (Abbildung 9C). Besonders in

Verbindung mit CD16 MeFI lassen sich in Stadium IV  $CD11b^+CD27^-$  signifikante Unterschiede zwischen SIRS und Sepsis erkennen. CD11b, CD27 und CD16 können als eventuelle Ergänzung für den bestehenden Interventionskatalog des Surviving Sepsis Campaign Bundles, wie im 6h oder 24h Management, in Betracht gezogen werden. Bundles fördern das Überleben bei SIRS und Sepsis (Barochia et al., 2010) und beruhen vor allem auf der early-goal-directed Therapy (Gao et al., 2005). Die CD16 MeFI zeigen in der Entdeckungsgruppe im Stadium IV der NK-Zellen eine signifikante Trennung zwischen SIRS und Sepsis (Abbildung 10). In der Literatur zu Analysen von pädiatrischen Patienten mit SIRS und Sepsis konnte eine reduzierte Frequenz der  $CD16^+$  NK-Zellen im Vergleich zu Probanden beschrieben werden (Halstead et al., 2013). Dies deutet darauf hin, dass die zytotoxische ADCC NK-Zell Aktivität deutlich abnimmt. Ein Hinweis darauf geben auch die Genexpressionsanalysen der beiden Patientengruppen der Validierungsgruppe (Abbildung 11), die einen geringfügigen Abfall von CD16 (*FCGR3A*) (um rund 15%) in der Sepsis gegenüber SIRS aufzeigen. Es sind unterschiedliche Erklärungen für die vorliegenden Beobachtungen möglich. Zum einen könnten die zytotoxischen NK-Zellen aus dem peripheren Blut zum Fokus der Infektion oder den Lymphknoten gewandert sein. Zum anderen könnten sie sich in ein dysfunktionaler, hoch aktivierte  $CD56^- CD16^+$  Phänotyp entwickeln, wie es bereits bei Patienten mit HIV beschrieben wurde (Alter et al., 2005). Die quantitativen, zytotoxischen Defizite scheinen zum großen Teil auf die reduzierte Frequenz der NK-Zellen im peripheren Vollblut der Patienten mit SIRS und Sepsis zu beruhen. In funktionellen Studien, wurde dazu gezeigt, dass NK-Zellen eine reduzierte zytotoxische Aktivität in Sepsis Patienten (Georgeson et al., 2001; Maturana et al., 1991) und bei Patienten mit SIRS nach thermalen oder traumatischen Verletzungen (Blazar et al., 1986; Klimpel et al., 1986) aufweisen. Die simultan auftretende Neutrophilie wird durch reduzierte Lymphozyten Zahlen begleitet. Die Ergebnisse zeigen die Möglichkeit auf, dass die quantitativen Defizite der CD16 MeFI der NK-Zellen der Ursprung des Krankheitsvorschritts sind. Zur Verifizierung dieser Aussage sind jedoch noch weitere Untersuchungen notwendig.

Gegenüber den in der Literatur beschriebenen Referenzwerten des Blutbildes von Probanden sind die Granulozyten um mehr als das Doppelte bei Patienten mit SIRS und Sepsis (Abbildung 7) erhöht (Sack et al., 2007). Für T-Zellen ist ein deutlicher Abfall zu verzeichnen. Die NK-Zellen befinden sich am unteren Rand des Referenzwertes. Die Lymphopenie bei Patienten mit inflammatorischen Bedingungen und zeitgleicher Granulopoese ist mit erhöhter Mortalität assoziiert (Kreger et al., 1980).

Die Plasmaproteine stellen ein heterogenes Gemisch von mehreren hundert Proteinen dar. Zwischen Synthese und Abbau der Proteine besteht ein dynamisches Gleichgewicht. Störungen dieses Gleichgewichts, wie im Falle der Sepsis, führen zu Veränderungen im Proteinspiegel. In dieser Arbeit wurde NK-Zell Priming mit sekundärer Stimulation unter Hypoxie im *in vitro* Modell verwendet. Hierzu wird eine Konditionierung der NK-Zellen unter Hypoxie mit einem IL-15 Priming über sechs Stunden gefolgt von einer sequenziellen Stimulation mit IL-12 und IL-18 über weitere vier Stunden angewandt. In Analysen des EDTA Plasmas des Patientenkollektivs der Langzeitstudie zeigt sich zwar kein direkter Unterschied in den proinflammatorischen Zytokinen, jedoch ein signifikanter Anstieg des IL-6 Rezeptor  $\alpha$  (Abbildung 12 sIL-6 Rezeptor  $\alpha$ ) nach dem Übergang von SIRS zu Sepsis. Endler et al. berichteten bereits

aus *in vitro* Versuchen von einem deutlichen IL-6 Anstieg nach LPS Stimulation bei Probanden (Endler et al., 2004). Der IL-6 Plasmaspiegel hat seinen Stellenwert als Entzündungsparameter in diversen Studien angedeutet (Calandra et al., 1991; Pierrakos und Vincent, 2010; Schlüter et al., 2002). Die Daten dieser Arbeitsgruppe, zeigen im Gegensatz zu einigen Publikationen keinen Anstieg der IL-6 Spiegel (Abbildung 12) bei zunehmendem Schweregrad im Krankheitsverlauf (Dengler et al., 2008; Nekludov et al., 2007; Spittler et al., 2000). Nicht zu vergessen die Pleiotropie von IL-6, welches sowohl eine inflammatorische als auch antiinflammatorische Wirkung besitzt, sodass man anhand des IL-6 Plasmaspiegels nicht erkennen kann, welche Funktion von IL-6 ausgeht und wie es damit auf den Rezeptor wirkt. Weiterhin ist zu bedenken, dass die Sepsis das Endprodukt multipler Ursachen im Krankheitsverlauf darstellt. Die antiinflammatorischen Zytokine IL-4, IL-10, IL-13 und TNF- $\alpha$  zeigen keinen direkten signifikanten Unterschied beim Übergang zwischen SIRS und Sepsis. NK-Zellen können durch Aktivierung Chemokine sekretieren. Dabei ist ein signifikanter Anstieg des CCL5 Plasmaproteinspiegels zu verzeichnen (Abbildung 12). Diesen signifikanten Anstieg des CCL5 Sekretion und zusätzlich von CCL3 sowie CCL4 sind ebenfalls in Abbildung 22 in unserem *in vitro* Modell unter Normoxie und Hypoxie zu verzeichnen.

Um diese Unterschiede zwischen SIRS und Sepsis Patienten zu verdeutlichen bedarf es eines größeren Patientenkollektivs. Weiter ist zu bedenken, dass die Inzidenz der Sepsis durch verschiedene exogene und endogene Ursachen beeinflusst ist. Das in dieser Studie präsentierte Kollektiv rekrutierte sich heterogen aus Patienten des Aufwachraums, der Intermediate Care und den Intensivstationen. Daher kann der Stimulus multifaktoriell sein. Dieser kann nicht nur durch Malignitäten oder kardiovaskuläre Erkrankungen, sondern auch durch traumatische Ereignisse oder durch allgemeinen Stress bedingt sein (Rhee et al., 2019).

EDTA Plasmaprotein Analysen sind einfach und schnell durchführbar. Dabei kann das Risiko, Isolationsbedinge, artifizielle Messergebnisse zu erhalten auf ein Minimum reduziert werden. Sie zeigen vorrangig die produzierten Plasmaproteinkonzentrationen vom Ort der Entzündung oder den lymphatischen Organen. Es ist jedoch zu beachten, dass im inflammatorischen Mikromilieu das ganze Spektrum der Immunzellen enthalten ist. Besonders bei Patienten mit SIRS und Sepsis sind die Granulozyten deutlich erhöht (Abbildung 7). Weshalb die gemessenen Plasmaproteinkonzentrationen auch von den Immunzellpopulationen beeinflusst sind. Für die Messung der Zytokinantwort konnte bereits gezeigt werden, dass Monozyten für den größten Teil der Gesamt-Zytokinproduktion im Blut verantwortlich sind. Andere Zellpopulationen sind dabei eher vernachlässigbar (Bergmann und Sautner, 2002). In wie weit die detektierten Schwankungen durch die NK-Zellen bedingt sind, muss in weiteren Analysen geklärt werden.

## 6.2 NK-Zellen sind für ihre Effektorfunktionen flexibel gegenüber ihrer Kohlenstoffquelle

Die Erkenntnisse dieser Arbeit liefern ein weiterführendes Verständnis über die Effektorfunktionen und die Stoffwechselwege von NK-Zellen aus Probanden *in vitro*. Die Stoffwechselwege, welche aktivierte NK-Zellen im Zuge ihrer Effektorfunktionen, 120

ihres Metabolismus und der Biosynthese nutzen sind dabei von besonderem Interesse. Infolgedessen wurde der Zusammenhang zwischen der Immunfunktion und dem vorliegenden Metabolismus, insbesondere der Glykolyse und des OXPHOS, untersucht. Zytokine spielen eine wesentliche Rolle für die Regulation der NK-Zell-Aktivierung. Sie sind an der Initiation der Immunantwort beteiligt und sichern dabei die Kommunikation zwischen den Zellen des Immunsystems (Freeman et al., 2015; Zhang und An, 2007). Das bessere Verständnis dieser Mechanismen ist die Grundlage zur Entwicklung geeigneter NK-Zell basierter Biomarker. Für diagnostische Ansätze sind die Veränderungen der Funktion und des Metabolismus der aktivierten NK-Zellen sowie funktionelle Unterschiede in NK-Zell-Subpopulationen von großem Interesse. Aus den unveröffentlichten Vorarbeiten dieser Gruppe ist bekannt, dass die Genexpression der assoziierten Gene bezüglich der zellulärer Atmung, den DNA Reparaturwegen sowie dem Zellzyklus bei Sepsis Patienten deutlich gegenüber den SIRS Patienten erhöht ist (Abbildung 2 und Abbildung 3).

Der Metabolismus ist für eine Reihe zellulärer Funktionen entscheidend und wurde für die Funktion der Immunzellen zunehmend als wichtig erachtet (O'Neill et al., 2016). Einige Lymphozyten verwenden überwiegend die mitochondriale OXPHOS, wobei Sauerstoff benötigt wird um effizient ATP zu erzeugen. Im Gegensatz dazu metabolisieren Effektor-Lymphozyten große Mengen an Glukose durch die aerobe Glykolyse. Diese ist häufig bei proliferativen Zellen anzutreffen, da sie die biosynthetischen Vorläufer für die Synthese von Nukleotiden, Aminosäuren und Lipiden bereitstellt (Keppel und Cooper, 2016). Aktuelle Erkenntnisse zeigen, dass NK-Zellen nach einer Aktivierung durch Zytokine eine metabolische Veränderung erfahren (Finlay, 2015). Bei dieser metabolischen Reprogrammierung wurde eine erhöhte Expression von glykolytischen Genen beobachtet (Velasquez et al., 2016).

Vorarbeiten dieser Arbeitsgruppe zeigen, dass eine kurzfristige Hypoxie mit IL-15 Priming die transkriptionellen und funktionellen, glykolytischen Eigenschaften humaner NK-Zellen fördern und diese zentral im glykolytischen Pathway verankern. Hierbei ist eine Steigerung der Glykolyse deutlich zu erkennen. (Velasquez et al., 2016). Die Hypothese der Notwendigkeit eines sekundären Stimulus zur weiteren Steigerung der Glykolyse, wie auch der OXPHOS, auf metabolischer Ebene wurde im Rahmen dieser Arbeit näher untersucht. Analog zu Velásquez et al. (2016) waren glykolytische Gene (*GAPDH*, *FCGR3A*, *H2AFZ*) sowohl bei SIRS als auch bei Sepsis Patienten mit SIRS und Sepsis differenziell exprimiert. *GAPDH* ist in Patienten mit Sepsis gegenüber Patienten mit SIRS geringfügig erhöht (Abbildung 11). Es besteht Konsens, dass die Glykolyse für die Effektorfunktionen der NK-Zellen ein bedeutendes Verfahren ist (Mah und Cooper, 2016). Der zugrundeliegende Mechanismus identifizierte, dass *GAPDH* an die mRNA von IFN- $\gamma$  bindet und dessen Translation reguliert (Chang et al., 2013). Es ist davon auszugehen, dass aktivierte T-Zellen die Glykolyse hochregulieren und *GAPDH* als glykolytisches Enzym unterstützen. Basierend auf den Vorarbeiten wurde der glykolytische Fluss nach IL-15 Priming und sekundärer Stimulation mit pro- und antiinflammatorischen Zytokinen in NK-Zellen gesunder Probanden weiter analysiert (Abbildung 14 und Abbildung 15). Eine sekundäre Stimulation mit pro- und antiinflammatorischen Zytokinen, führte für IL-15 mit IL-12 plus IL-18, analog Velásquez et al. (2016) mit IL-15 zu einer additiven Steigerung des glykolytischen Flusses. Dieser Anstieg ist unter der Hypoxie stärker ausgeprägt. Trotz Zugabe der antiinflammatorischen Zytokine (IL-4, IL-10, IL-13 und TGF- $\beta$ ) sieht man lediglich einen Effekt durch die Hypoxie und keinen durch die

Zytokine bedingten Anstieg. Studien von Keppel et al. (2015) haben in ruhenden murinen NK-Zellen gezeigt, dass diese nur einen geringen glykolytischen Metabolismus oder OXPHOS aufweisen. Folglich führt eine hypoxische Konditionierung mit sekundärer Stimulation nur zu einer leichten signifikanten Steigerung der Glykolyse.

NK-Zellen können mit geringer Stoffwechselkapazität, nach Priming oder aktivierenden Antikörper, die Produktion von großen Mengen IFN- $\gamma$  induzieren. Jedoch führt eine Hemmung der Glykolyse und OXPHOS zur einer Inhibierung der IFN- $\gamma$  Sekretion (Keppel et al., 2015). Die Daten in Abbildung 16 zeigen dies ebenfalls nach Priming. Daher ist zu mutmaßen, dass die metabolische Aktivität hochreguliert sein muss und diese sich erst im Verlauf abschwächt, bevor ein IFN- $\gamma$  Nachweis überhaupt möglich ist. Darüber hinaus wurde gezeigt, dass die IFN- $\gamma$  Produktion und Granzyme B Expression in murinen NK-Zellen auf einem metabolischen Switch hin zur Glykolyse besteht (Donnelly et al., 2014). Dies wurde deutlich nach der Zytokinstimulation mit IL-2 und IL-12. Die Ergebnisse dieser murinen Daten lassen sich nicht auf humane NK-Zellen übertragen. Aus den erhobenen Daten dieser Arbeit ist kein glykolytischer Switch erkennbar. Analog der Abbildung 17 zeigen auch die Daten von Keating et al. (2016) eine gesteigerte Hochregulation der Glykolyse und der OXPHOS. Untersuchungen der IFN- $\gamma$  Sekretion nach Glukoseentzugs (Abbildung 28) sind ebenfalls konträr zu Donnelly et al. (2014) und unterstützen die hier präsentierten Ergebnisse. Die Analyse der IFN- $\gamma$  Produktion in Antwort auf eine über Nacht Stimulation mit IL-2 oder mit IL-12 und IL-15 zeigte bei Keating et al. (2016) neben der Hochregulation von Glykolyse und OXPHOS auch eine verstärkte IFN- $\gamma$  Sekretion. Besonders deutlich ist diese IFN- $\gamma$  Produktion in den CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen, wie sie auch im Rahmen dieser Arbeit, nach sekundärer Stimulation mit IL-12 und IL-18 nach IL-15 Priming detektiert wurden. Die Summe der IFN- $\gamma$  positiven Signale durch einzelne proinflammatorischen Zytokine ist ungleich des Effekts, welcher durch Priming und anschließender Stimulation mit IL-12 und IL-18 hervorgerufen wird. Deshalb ist von Synergie zu sprechen. Dieser synergistische Effekt von Interleukinen wird auch in der Literatur beschrieben (Nielsen et al., 2016; Romee et al., 2012). In Mäusen wurde bereits erkannt, dass eine Exposition mit proinflammatorischen IL-12, IL-15 und IL-18 eine Differenzierung der NK-Zellen zu einem Zytokin-induziertem Memory-ähnlichen Phänotyp fördert. Diese produzieren nach der Stimulation signifikant mehr IFN- $\gamma$  (Felices et al., 2018; Medzhitov, 2001). Humane NK-Zellen, die präaktiviert und mittels IL-12 und IL-15, oder IL-12 und IL-18 behandelt wurden und im direkten Kontakt zu K-652 leukämischen Zellen standen, bilden ebenfalls einen Memory-ähnlichen Phänotyp aus und zeigen eine verstärkte IFN- $\gamma$  Produktion (Pahl et al., 2018; Romee et al., 2012). Wie auch in dieser Arbeit für Granzyme B (unter Hypoxie) und Perforin (mit DMOG-Behandlung) nach Priming und Kontakt mit K-652 Zielzellen unter Hypoxie detektierbar ist (Abbildung 26). Ni et al. beschrieben, dass IL-12/IL-15/IL-18 präaktivierte NK-Zellen tiefgründige therapeutische Antitumor-Effekte nach einer einzelnen Injektion mit NK-Zellen bei vorangegangenen adaptivem Transfer besitzen (Ni et al., 2012). Die Funktion der zirkulierenden NK-Zellen in kritisch, kranken Patienten wurde bisher jedoch wenig untersucht. Im Gegensatz zu den murinen Daten (Carson et al., 1999; Chiche et al., 2011; Emoto et al., 2002; Etogo et al., 2008), beschreibt Forel et al. unerwarteter Weise eine reduzierte IFN- $\gamma$  Produktion bei Sepsis Patienten. Dies verstärkt sich bei Patienten im septischen Schock (Forel et al., 2012). Wie in der Literatur (Cooper et al., 2001; Farag und Caligiuri, 2006) beschrieben sind lediglich knapp 25% aller CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen CD16<sup>+</sup>, während nahezu alle CD56<sup>dim</sup>



NK-Zellen CD16<sup>+</sup> sind (Abbildung 16). Auch unter physiologischer Hypoxie sind keine Änderungen für CD16 bestimmbar, sodass von keinem Einfluss auf die zytotoxische ADCC ausgegangen werden muss (Abbildung 21). Colucci et al. und Lanier beschreiben dies ausführlich in ihren Arbeiten bei gesunden Probanden (Colucci et al., 2002; Lanier, 2003).

Obwohl NK-Zellen aus gesunden Probanden ihren maximalen, glykolytischen Fluss unter DMOG-Behandlung, bzw. physiologischer Hypoxie (1% O<sub>2</sub>) mit IL-15 Priming und sekundärer Stimulation durch IL-12 und IL-18 aufweisen (Abbildung 15), sehen wir einen negativen Effekt der DMOG-Behandlung auf die IFN- $\gamma$  Sekretion. Ebenso ist die Chemokinsekretion von CCL3, CCL4 und CCL5 unter DMOG-Behandlung negativ beeinflusst (Abbildung 19). Unter physiologischer Hypoxie ist dies nicht zu beobachten. Für Granzyme B und Perforin ergeben sich solch negative Einflüsse nicht (Abbildung 17 und Abbildung 21). Dieser negative Effekt ist bei Kontakt mit K-652 leukämischen Zielzellen nicht zu beobachten, der direkte Kontakt ruft eine synergistische Steigerung der IFN- $\gamma$  Sekretion hervor (Abbildung 26). Es stellt sich die Frage, ob die stark reduzierte IFN- $\gamma$ - und Chemokin- Sekretion nicht eventuell eine indirekte Konsequenz der DMOG-Behandlung ist und dieses direkt die Zytokinproduktion hemmt. Die Steigerung des glykolytischen Flux ist bei nicht maximaler Glut-1 Rezeptorexpression unter sequentiellen Stimulation zu beobachten (Abbildung 20 und Abbildung 23 Keating et al. sehen in diesem Zusammenhang einen Anstieg der Glut-1 Expression nach Stimulation besonders auf CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen. Auf CD56<sup>dim</sup> ist dieser Anstieg geringer ausgeprägt (Keating et al., 2016). Dies kann im Rahmen dieser Arbeit für die MeFI der CD56<sup>bright</sup> gegen CD56<sup>dim</sup> ebenfalls beobachtet werden (Abbildung 44 und Abbildung 48). Nach Kontakt mit leukämischen K-652 Zielzellen bleibt die Glut-1 Frequenz stabil (Abbildung 49). Für die Gesamtpopulation der aktivierten NK-Zellen ist jedoch ein Anstieg nach DMOG-Behandlung zu verzeichnen (Abbildung 20), der sich so unter Hypoxie nicht bestätigen lässt (Abbildung 23). Nach Kontakt mit den Zielzellen zeigt sich ein stabiler Glut-1 Anstieg stabil. Unter DMOG-Behandlung ist der Anstieg signifikant (Abbildung 25), sodass überlegt werden muss in wie weit sich DMOG indirekt auf die Glut-1 Expression auswirkt. Der Effekt der DMOG-Behandlung ist differenziert zu betrachten, da dieser auch die ATP Produktion vermindern und die mitochondriale Atmung hemmen kann (Zhdanov et al., 2015). Es ist dabei zu beachten, dass die gesteigerte Glut-1 Frequenz in keiner dieser Abbildungen zu einer erhöhten Glukoseaufnahme (2-NBDG) führt. Deshalb ist weiter zu prüfen, wie die Hochregulation des Glukose Metabolismus zur Aufrechterhaltung der Effektorfunktionen benötigt wird (Gardiner und Finlay, 2017). Glukose ist eine wichtige, zelluläre Kohlenstoffquelle sowohl für die Energiegewinnung als auch die Generierung von Biomolekülen. In der Literatur wird dies bereits als Hochregulation beschrieben (Rathmell et al., 2000). Dieser Effekt verstärkt sich noch stärker nach Zytokinstimulation (Keppel et al., 2015). Somit lässt sich schlussfolgern, dass die NK-Zell Effektorfunktionen unabhängig von Glykolyse und oxidativer Phosphorylierung und somit flexibel gegenüber der Kohlenstoffquelle sind.

IL-15 geprimte NK-Zellen zeigen im Vergleich zu nicht stimulierten NK-Zellen einen geringen Anstieg der Glykolyse aber einen starken, signifikanten Anstieg der glykolytischen Kapazität (Abbildung 14 und Abbildung 15). Der geringe Einfluss auf den glykolytischen Fluss, aber die deutliche Steigerung der glykolytischen Kapazität sollte hinsichtlich der Stoffwechselwege genauer analysiert werden. Die verstärkte glykolytische Kapazität könnte durch die verstärkte Glut-1 Expression bedingt sein

(Abbildung 23). Zur Überprüfung dieser Unabhängigkeit gegenüber der Glykolyse wurden die Effektorfunktionen anhand der Glut-1 Expression und 2-NBDG Aufnahme nach Zielzell-Kontakt analysiert (Abbildung 25 und Abbildung 26). Der deutlichste glykolytische Flux bei IL-15 Priming mit sekundären Stimuli, ist bei einem drastischen Anstieg für Glut-1 unter DMOG-Behandlung ohne Stimuli zu beobachten. Bei Hypoxie ist nach Priming und Zielzellkontakt ebenfalls ein deutlicher Anstieg zu verzeichnen. Inwiefern der Warburg Effekt mit seiner Verschiebung von OXPHOS hin zur Glykolyse oder Laktat Fermentierung vorliegt, wie es Tumorzellen zeigen, ist weiter zu untersuchen. Änderungen der Glukoseverwertung liefern zusätzlich Energie, um das Tumorwachstum zu fördern. Die Inhibition der Glykolyse führt zu einer reduzierten Proliferation und eines verminderten Tumorwachstums. Jang et al. (2013) postuliert in diesem Zusammenhang den vorteilhaften Effekt, durch die Inhibition der Glykolyse und damit ein positives Resultat, in der onkologischen Therapie. In der hier vorliegenden Arbeit präsentierten die Zellen ohne signifikant gesteigerte Glut-1 Expression oder 2-NBDG Aufnahme einen tendenziellen, beziehungsweise signifikanten Anstieg der IFN- $\gamma$  Sekretion nach IL-15 Priming und dem Kontakt mit leukämischen K-652 Zellen. Das Effektormolekül Granzyme B zeigt ebenfalls nach IL-15 Priming und Co-Inkubation einen Trend zum Anstieg. Diese Daten zeigen, dass es keinen glykolytischen Switch zur verstärkten Rezeptorexpression benötigt, wie er bei Donnelly et al. (2014) beschrieben wird. Auch andere Effektormoleküle sind ebenfalls signifikant nach Zielzell-Kontakt mit K-652 Zellen und IL-15 Priming unter Hypoxie hochreguliert. Folglich ist für NK-Zellen ebenso wie für andere Lymphozyten, weiter zu analysieren wie diese nach Antigen oder Rezeptorstimulation nicht nur die Glykolyse, sondern auch andere Stoffwechselwege, wie die OXPHOS hochregulieren. Für T-Zellen ist ebenso eine Analyse hinsichtlich Glutamin notwendig (Doughty et al., 2006; Loftus und Finlay, 2016). Damit scheinen NK-Zellen flexibel gegenüber der Kohlenstoffquelle zu sein. Im nachfolgenden Schritt führte eine durch Glukoseentzug bedingte Rezeptor-abhängige Glukoseinhibition, nach Zytokinstimulation zu keinen Effekten in den Effektormolekülen. Ebenso bestehen keine signifikanten Unterschiede für die Glut-1 Expression und 2-NBDG Aufnahme. Der beobachtete Effekt geht wie zuvor beschrieben auf die sequentielle Stimulation zurück (Abbildung 27 bis Abbildung 30). Eine Analyse der Sauerstoffverbrauchsrate und Azidifizierungsrate (Abbildung 30) nach IL-15 Priming unter sekundärer Stimulation mit IL-12 und IL-18 zeigt sich, dass NK-Zellen unter 10mM Glukose eine stärkere ECAR und damit Glykolyse besitzen. Ohne Glukose kommt es zu einem raschen Abfall. Dieser höhere glykolytische Flux ist nicht für die Sekretion von Effektormoleküle und für die volle Funktionsfähigkeit der NK-Zellen notwendig. Ähnliches zeigt sich anhand der OCR, die keine signifikanten Änderungen und keinerlei mitochondriale Abhängigkeit gegenüber Pyruvatimport in die Mitochondrien aufweisen. Deshalb ist davon auszugehen, dass aktivierte NK-Zellen unabhängig von OXPHOS sind.

Analysen des Mito Fuel Flex Tests zur Untersuchung der mitochondrialen Atmung der NK-Zellen in Abhängigkeit der Kohlenstoffquellen (Abbildung 31) zeigen eine deutliche Flexibilität gegenüber der verfügbaren Kohlenstoffquelle. Dabei sollte in weiteren Untersuchungen der Einfluss von L-Glutamin überprüft werden. In der aktuellen Literatur ist dies bisher weitestgehend ungeklärt (Loftus et al., 2018; Pfeifer et al., 2018; Singer et al., 2018). Eine starke Inhibition der Sauerstoffverbrauchsrate und der damit einhergehenden mitochondrialen Atmung ist unter Hypoxie und den Inhibitoren für alle Kohlenstoffquellen zu verzeichnen. Die Abhängigkeit gegenüber Fettsäuren deutet daraufhin, dass es hierbei einen leichten Effekt gibt. Die respiratorische Kapazität nach

sequentieller Stimulation und DMOG-Behandlung zeigen einen leichten Anstieg. Damit wird deutlich, dass sich Hypoxie und sequentielle Stimulation vorteilhaft auswirken. Eine Hypoxie und IL-15 Priming sowie eine sekundäre Stimulation haben durchflusszytometrisch keine erkennbaren Auswirkungen auf die Fettsäure MeFI (Abbildung 32). Ferner ist weiter zu überprüfen, ob NK-Zellen für die Ausbildung ihrer vollen Effektorfunktionen Lipide benötigen, wie dies für CD8<sup>+</sup> T-Zellen beschrieben ist (Lochner et al., 2015; Raud et al., 2018). FL C<sub>16</sub> ist lediglich ein Surrogat für Lipide, weshalb in weiteren Analysen im Detail geklärt werden sollte, in wieweit die *in vitro* Bodipy FL C<sub>16</sub> Analysen, die  $\beta$ -Oxidation repräsentiert.

Zur weiteren Analyse der mitochondrialen Abhängigkeit und der damit verbundenen oxidativen Phosphorylierung (Abbildung 32 MeFI ROS) kann ebenfalls nur eine Tendenz zur Abnahme durch sequentielle Stimulation festgestellt werden. Dieser Effekt ist losgelöst vom vorherrschenden Sauerstoffpartialdruck. Dazu wurde in den letzten Jahren festgestellt, dass mitochondriales ROS bei Lymphozytäre Choriomeningitis ansteigt (Bensch et al., 2016). Durch diese Reduktion könnte hypothetisch ein Schutz vor reaktiven Sauerstoffspezies durch das IL-15 Priming mit einer zusätzlichen sekundären Stimulation vorliegen. NK-Zellen scheinen nicht, mit der zellulären, metabolischen Signatur der Immunzellen übereinzustimmen sowie von einem oxidativen Metabolismus für vollumfängliche Effektorfunktionen und einem langfristigen Überleben abzuhängen (Amiel et al., 2014; Cheng et al., 2014). Folglich ist festzuhalten, dass es eine starke Tendenz hin zum Fettsäuremetabolismus bei aktivierten NK-Zellen gibt, aber für anabolen den Stoffwechsel unter Priming ausreichend Reserven für die Aufrechterhaltung aller Effektorfunktionen vorhanden sind.

### 6.3 NK-Zell-Migration, trotz erhöhter Chemokinsekretion, unabhängig von verstärkter CC-Chemokin-Rezeptor Expression

Die Plasmaproteinanalyse in Kapitel 5.1.4 Abbildung 12 zeigt bei Patienten mit einer Sepsis gegenüber SIRS eine signifikante Hochregulation des CCL5 Chemokins. Dieses kann an die Rezeptoren CCR1, CCR3, CCR4 sowie CCR5 binden (Berahovich et al., 2006; Juremalm et al., 2002).

Im Zuge dieser Arbeit wurden *in vitro* Rezeptorexpressionsanalysen von NK-Zellen aus Probanden durchgeführt, um die Effekte der veränderten Rezeptorexpression genauer zu beleuchten. Die Analysen zur sekundären Stimulation mit den Chemokinen und Interleukinen nach *in vitro* Priming zeigen nach hypoxischer Behandlung (1% O<sub>2</sub>) zeigen eine signifikante Steigerung der Chemokinrezeptorexpression, welche jedoch nur eine minimale Reduktion unter Hypoxie gegenüber Normoxie aufweist. Es ist davon auszugehen, dass die sauerstoffarme Umgebung keinen Einfluss auf die Rezeptorexpressionen hat (Abbildung 22).

Des Weiteren zeigt sich ein Einfluss über die Zeit. Mit zunehmender Inkubationsdauer nehmen die Expressionen des CCR3-, des CCR4- und des CCR5-Rezeptors zu. Im Falle des CCR3-Rezeptors fällt diese Zunahme stärker aus als beim CCR5-Rezeptor. Der CCR5 Rezeptor ermöglicht die Chemotaxis der NK-Zellen und fungiert als wichtiger Rezeptor für die Rekrutierung von NK-Zellen im Zuge einer Inflammation

(Bernardini et al., 2012). Auch andere Immunzellen nutzen die CCL5/CCR5 Ligand Rezeptor Achse zur Rekrutierung hin zur Inflammation und können dort, ebenso wie myeloide Suppressorzellen, weitere immunsuppressive Funktionen im Tumormikromilieu auslösen. Dieser Mechanismus bietet breite therapeutische Möglichkeiten (Blattner et al., 2018).

Die CCR1-Rezeptorexpression zeigt über die Zeit ein gegenteiliges Expressionsmuster. Im Falle des CCR1-Rezeptors nimmt die Expression von Tag 1 zum Folgetag (Tag 2) ab (Abbildung 55). Dies deutet daraufhin, dass der CCR1-Rezeptor im Zuge der primären Immunantwort von Bedeutung ist. Mit zunehmender Zeit wird er jedoch nicht mehr von den NK-Zellen exprimiert. Auch Inngjerdinngen et al. (2001) konnten keine CCR1-Rezeptorexpression auf NK-Zellen nachweisen. Die Autoren vermuten wegen der fehlenden Detektion des CCR1-Expression, dass es aufgrund der Sekretion der Liganden (CCL3 und CCL5) zu einer Internalisierung des CCR1-Rezeptors kommt. Da sie auch keine CCR5-Expression auf der Oberfläche der NK-Zellen detektieren konnten, schlussfolgerten sie, dass humane CD56<sup>+</sup> NK-Zellen kein CCR5 exprimieren und daher nicht auf CCL4 reagieren. Sowohl Berahovich et al. (2006), wie auch in dieser Arbeit konnte sowohl die CCR1- als auch die CCR5-Expression auf NK-Zellen detektiert werden.

Des Weiteren zeigen sich bei allen drei Rezeptoren nicht nur eine veränderte Expression über die Zeit, sondern auch zwischen den verschiedenen Stimulationsbedingungen. Die nicht stimulierten NK-Zellen weisen stets die geringste Rezeptorexpression auf. Ein Zytokincocktail aus IL-15, IL-12 und IL-18 fördert bei CCR5 die stärkste Expression (Abbildung 33 und Abbildung 55). Diese proinflammatorischen Zytokine bewirken dabei die Aktivierung der NK-Zellen (Lusty et al., 2017). Durch die Zugabe der Chemokine CCL3, CCL4 und CCL5, welche wäre eine weitere Steigerung der Rezeptorexpression erwartbar gewesen. Durch die Ergänzung dieses Cocktails mit den Chemokinen CCL3, CCL4 und CCL5, kommt es zu einer statistisch signifikanten Steigerung der CCR3-Expression im Vergleich zur Stimulation mit dem Cocktail ohne diese Chemokine (Abbildung 55).

Die, durch extrazelluläre Matrix (Matrigel)-beschichteten und unbeschichteten Inserts, migrierten NK-Zellen zeigen die höchste Rezeptorexpression des CCR1, CCR3 und CCR5-Rezeptors unter Stimulation mit IL-12, IL-15 und IL-18 (Abbildung 57). Dieser Zytokincocktail führt zu einer statistisch signifikanten Steigerung der Rezeptorexpression im Vergleich zu allen anderen Stimulationsbedingungen. Die anderen Stimulationen führen zu keinen Veränderungen in den Rezeptorexpressionen. Velasquez et al. (2016) konnten im 48-stündigen Migrationsassay unter hypoxischen Bedingungen eine Steigerung der Migration durch die Stimulation mit IL-15 nachweisen. Die schwächste Migration durch die proinflammatorischen Zytokine, lässt sich eventuell darauf zurückführen, dass Zytokine die NK-Zellen am Ort der Entzündung aktivieren und ihre Funktion erhalten (Lusty et al., 2017). Bereits eine zusätzliche IL-18 Gabe zur reinen IL-15 Stimulation zeigt diese geringfügige Reduktion. Die Stimulation mit den Chemokinen CCL3, CCL4 und CCL5 zeigen keinen Einfluss auf die Anzahl der migrierten Zellen (Abbildung 33). Guo et al. (2018) beschreibt durch murine Modellanalysen für die Sepsis, dass die Zeitspanne für die Migration der NK-Zellen von sekundären, lymphatischen Organen zur Peritonealhöhle, zwischen vier bis sechs Stunden nach einer intraabdominellen Infektion beträgt. Die Arbeitsgruppen um Maghazachi et al. (1994) und Taub et al.

(1995) überprüften den Einfluss von CCL3, CCL4 und CCL5 auf die Migration humaner NK-Zellen und konnten nach vierstündiger Migration einen Effekt der Chemokine beobachten. Basierend auf diesen Ergebnissen könnte die Zeitdauer der Migrationsassays verringert und mit der Migration von Patienten NK-Zellen verglichen werden. Der CCR5-Rezeptor wird dabei am stärksten und der CCR3-Rezeptor am schwächsten exprimiert. Der CCR5-Rezeptor findet sich, im Vergleich zu den anderen Rezeptoren häufig auf der Zelloberfläche. Dies korreliert mit den Ergebnissen von Bernardini et al. (2012), dass dieser Rezeptor für die Rekrutierung der NK-Zellen während einer Infektion benötigt wird. Dies bestätigt auch die Ergebnisse von Weis et al. (2011), welche mit CCR5-defiziente Mäusen eine reduzierte Zahl an NK-Zellen im Knochenmark, Milz, Blut und der Leber aufwiesen. Der CCL3-abhängige Mechanismus ermöglicht die Chemotaxis der NK-Zellen und ist in die T-Zelldifferenzierung involviert (Bernardini et al., 2012). Ischida et al. (2004) stimulierten die NK-Zellen mit reinem IL-18 und testeten die Migration durch mit Extrazellulären Matrix beschichteten Inserts binnen 24 Stunden. Sie konnten eine gesteigerte Migration durch die Stimulation mit IL-18 feststellen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Expression des CD62L untersucht. Diese nimmt nach 48 stündiger Migration und Co-Stimulation von IL-12, IL-15 und IL-18 auf den NK-Zellen ab (Abbildung 33). Wie Gregoire et al. (2007) mit murinen NK-Zellen nachweisen konnten, wird CD62L für den Eintritt der murinen NK-Zellen in Lymphknoten benötigt. Darüber hinaus ist es für die Rekrutierung der NK-Zellen zu inflammatorischen Lymphknoten in Antwort auf eine subkutane Injektion von Tumorzellen notwendig. Aufgrund der zu Beginn signifikant Steigerung der CD62L Expression und MeFI könnte ein hypothetischer Erklärungsansatz sein, dass die CD62L Expression auf NK-Zellen die Überwindung der endothelialen Barriere erleichtert. Möglicherweise wird die Expression des CD62L dann eingestellt, sobald die Zellen am Ort des Geschehens angekommen sind und die Migration beendet ist. Dies wäre auch konsistent zur Beobachtung, dass die CD62L-Expression nach 48 Stunden abnimmt. Simultan zu der Reduktion der CD62L Expression und MeFI kommt es zu einer verstärkten Chemokinrezeptorexpression auf NK-Zellen. Dies würde mit der vereinfachten Migration entlang des Chemokingradienten hin zum Fokus korrelieren (Abbildung 33). Lima et al. (2015) identifizierten mittels der CD62L-Expression eine weitere Subpopulation der NK-Zellen, die eine Art Übergangstufe zwischen CD56<sup>bright</sup> – und CD56<sup>dim</sup>-NK-Zellen bilden. Sie stellten fest, dass die Prozentzahl an CD62L<sup>+</sup> Zellen in CD56<sup>dim</sup> NK-Zellen signifikant geringer als in den CD56<sup>bright</sup>-Zellen ist. Wie die Ergebnisse dieser Migrationsassays unter Normoxie verdeutlichen, zeigen sich keine signifikanten Auswirkungen der verschiedenen Stimulationsbedingungen auf die Migration und Rezeptorexpression der NK-Zellen.

Im Zuge dieser Arbeit wurden für *in vitro* Priming Analysen der NK-Zellen von Probanden sekundär mit den Chemokinen CCL3, CCL4 und CCL5 stimuliert, um zu überprüfen, ob es zu metabolischen Veränderungen der NK-Zellen kommt. Die hier gezeigten Ergebnisse zeigen Änderungen der Glykolyse durch die Chemokine im Vergleich zu der Co-Stimulation mit proinflammatorischen Zytokinen oder IL-15 alleine. Felices et al. demonstrierten, dass eine kontinuierliche Stimulation mit IL-15 zu einer verminderten Viabilität führt (Felices et al., 2018). Des Weiteren zeigten diese NK-Zellen durch Stimulation mit IL-15 eine reduzierte mitochondriale Atmung, den Zellen vergleicht die nur eine kurzfristige Stimulation mit IL-15 erfuhren. Die andauernde Stimulation mit IL-15 führte zu einer Abnahme der freien Atmungskapazität, welche von der Oxidation der Fettsäuren abhängig ist (Felices et

al., 2018). Velasquez et al. konnten zeigen, dass ein Priming mit IL-15 und die Kultivierung unter Hypoxie keine deutliche Steigerung im glykolytischen Fluss und des Glukoseverbrauchs der NK-Zellen hervorrufen (Velasquez et al., 2016). Im Zuge dieser Arbeit zeigten sich allerdings keine Unterschiede im mitochondrialen Energieverbrauch nach sekundärer Chemokinstimulation. Die Messung des glykolytischen Flusses zeigte ebenfalls keine Abhängigkeit der NK-Zellen von der Glykolyse (Abbildung 34). Deshalb ist davon auszugehen, dass die Migrationsfähigkeit nicht von der metabolischen Aktivität beeinflusst wird.

#### 6.4 Gesteigerte Apoptose und Zellproliferation bei Patienten mit SIRS und Sepsis

Aus den unveröffentlichten Vorarbeiten dieser Gruppe ist bekannt, dass neben den metabolischen Veränderungen zwischen SIRS und Sepsis auch zelluläre Prozesse, wie der Zellzyklus und die Apoptose, signifikant hochreguliert sind. Folglich wurde die metabolische Abhängigkeit der NK-Zellen gegenüber Glukose bei Patienten mit SIRS und Sepsis der Validierungsgruppe vermessen. Dabei ergab sich nach Inhibition des mitochondrialen Pyruvat Carriers und dadurch des Glukose Oxidationssignalwegs keine signifikante Änderung (Abbildung 35). Nach Inhibition der beiden anderen Kohlenstoffquellen, Fettsäuren und L-Glutamin, kam es zu einem deutlichen Abfall der zellulären Atmung. Dieser Trend verdeutlicht sich bei den Analysen von Glut-1 Expression und der 2-NBDG Aufnahme von NK-Zellen (Abbildung 36). Für Patienten mit Sepsis zeigte sich eine leichte Trendsteigerung, jedoch ohne eine statistische Signifikanz zu erreichen. Um diesen Trend zu verfestigen bedarf es eines größeren Patientenkollektivs. Im Gegensatz zu den Lymphozyten bei Malignitäten, scheinen NK-Zellen bei Patienten mit SIRS und Sepsis zur Deckung ihres erhöhten Energiebedarfs, keine Glukose aus der Umgebung aufzunehmen (Nakajima und Van Houten, 2013). Bei Sepsis Patienten ist bekannt, dass eine hohe Hyperglykämie mit einer verstärkten 30-Tage Mortalität assoziiert ist (van Vught et al., 2016b). Im Gegensatz zu Beschreibungen von Stegena et al. (2010) ist dieser Effekt dabei unabhängig von einem vorbestehenden Diabetes mellitus. Die Produktion von proinflammatorischen Mediatoren kann eine Hyperglykämie weiter verstärken. Während einer Sepsis modifizieren diese inflammatorische und immunzelluläre Reaktionen, wie die Produktion der reaktiven Sauerstoffspezies (Orban et al., 2006; Spolarics, 1996; Stevens et al., 2017). Darüber hinaus ist für onkologische Patienten die Überexpression von Glut-1 und ein erhöhter Glukosemetabolismus mit einer schlechten Prognose assoziiert (Kunkel et al., 2003). Für Lymphozyten wurde bereits beschrieben, dass während der akuten, hyperinflammatorischen Phase der Sepsis die transkriptionellen Profile der Leukozyten einen signifikanten Anstieg der glykolytischen Gene zeigen (Haimovich et al., 2010; Liu et al., 2015). Bereits aus den Vorarbeiten unserer Gruppe ist dies für NK-Zellen bekannt. Des Weiteren konnte für Lymphozyten gezeigt werden, dass während des immuntoleranten Status die Genregulation herunterreguliert ist (Cheng et al., 2016; Liu et al., 2015). In weiteren Untersuchungen wäre zu analysieren, in wieweit die hohen Genexpressionsprofile in der frühen Phase der Sepsis zu erklären sind. Weiter wäre zu klären, wie sich dies auf den Glukosespiegel und die Proteinexpression, beziehungsweise auf die Glut-1 Expression auswirkt. Wernly et al. (2016) postulieren hierzu, dass der Glukosespiegel ein Kandidat zur Risikostratifizierung von kritisch kranken Patienten sein könnte.

Zu den signifikant hochregulierten Prozessen während einer Sepsis gehört auch der Zellzyklus, sodass dieser im Verlauf dieser Arbeit bei Patienten mit SIRS und Sepsis hinsichtlich ihrer Apoptose, Proliferation und Expression kontaktabhängiger, zytotoxischer und Proliferations-assoziiertes Moleküle untersucht wurde. Bei Patienten mit einer Sepsis zeigt sich gegenüber SIRS Patienten ein Trend hin zur gesteigerten Proliferation unter Zugabe der proinflammatorischen Zytokine IL-12, IL-15 und IL-18 (Abbildung 38 und Abbildung 39). Diese Zytokine fördern die Aktivierung und Proliferation der NK-Zellen (Ferlazzo et al., 2004). Im Rahmen dessen zeigen sich deutliche Unterschiede vor allem hinsichtlich der Apoptose. Während bei Probanden (Abbildung 40) der größte Teil der Population vitale NK-Zellen sind, reduziert sich dieser Anteil bei Patienten mit SIRS und Sepsis. Gleichzeitig steigt der prozentuale Anteil an nekrotischen Zellen bei den Patienten an (Abbildung 41). Aus Untersuchungen bei chronischem, murinem Tumorwachstum ist bekannt, dass es zu einer funktionellen Inaktivierung von T- und NK-Zellen kommen kann. Die reduzierte Anzahl an NK-Zellen bei Mäusen mit multiplen Tumoren, scheint sich dabei nicht aufgrund der gesteigerten Apoptose oder reduzierten Proliferation zu begründen, sondern ihren Ursprung in der signifikant reduzierten Anzahl an lymphopoetische Vorläuferzellen zu beruhen (Richards et al., 2008). Ein ähnlicher Abfall der murinen NK-Zellen während der Sepsis wurde von Jensen et al. (2018) beobachtet. Sie beschrieben einhergehend mit der reduzierten Anzahl an NK-Zellen und einer schweren Lymphopenie eine verlängerte Immunoparalyse sowie damit assoziierte gesteigerte Mortalität. Dabei erkannten sie, dass der frühe Abfall der NK-Zellzahlen durch Apoptose bedingt sein könnte, da die Anzahl der apoptotischen NK-Zellen signifikant anstieg. Für T-Zellen ist bereits beschrieben, dass sie eine verstärkte Proliferation und Ki-67 Expression während der Sepsis aufweisen. Zusätzlich konnte beobachtet, dass es zeitgleich zu einem signifikanten Anstieg der Apoptose in den T-Zellen von Patienten kommt (Roger et al., 2012). Dabei vermuten Roger et al. (2012) ein Zusammenhang zwischen T-Zell Apoptose und Prognose, wie es bereits für Mausmodelle mit septischen Schock beschrieben wurde (Hotchkiss et al., 2000). Die Ki-67 Expression auf NK-Zellen ist bei Sepsis Patienten generell höher (80%) als bei Patienten mit SIRS (30%) (Abbildung 42). Daher sollte in einem größeren Stichprobenumfang mittels weiteren Analysen untersucht werden, welche epidemiologischen beziehungsweise mikrobiellen Charakteristika Patienten mit einer erhöhten NK-Zell Aktivierung oder NK-Zell Apoptose assoziiert sind. Eventuell ergeben sich hieraus zusätzlich Zusammenhänge zu den Signalwegen, die mit der Balance zwischen Überleben und proapoptischen Signalen für NK-Zellen assoziiert sind.

Frühere Arbeiten zeigten bei Verbrennungen und nicht-thermalen Trauma eine erhöhte CD71 Expression auf Lymphozyten. Die CD71 Expression ist ein Hinweis auf eine frühe Aktivierung, sowie Reifung und reflektiert die Migration von unreifen, metabolisch aktiven Lymphozyten in Richtung der Lymphknoten, Milz oder geschädigten Gewebe (Walsh et al., 2005). Diese Erkenntnisse deuten darauf hin, dass NK-Zellen CD71 und Glut-1 exprimieren, hochregulieren und somit Einfluss auf die Immunsignalwege nehmen können (Keating et al., 2016; Keppel et al., 2015; Salzberger et al., 2018). Wie in Abbildung 42 der gezeigten CD71 Expression hervorgeht, zeigt sich bei Sepsis Patienten ein tendenzieller Abfall gegenüber einer stabilen Frequenz bei SIRS Patienten. Die prozentuale Frequenz von CD71 auf NK-Zellen ist bei Sepsis Patienten generell höher. Die zugrundeliegenden Signalwege sind bis heute noch nicht umfassend geklärt und sollten daher weiter untersucht werden. Die CD71 Expression mit seiner tendenziell differenzierten Expression auf

NK-Zellen von Patienten mit SIRS und Sepsis könnte sich positiv auf die frühe und zuverlässige Diagnose der Sepsis auswirken. Weitere Analyse könnte sich ebenfalls vorteilhaft auf die Prognosestellung von Patienten mit SIRS und Sepsis auswirken.



## 7 ZUSAMMENFASSUNG

Die klassische Definition bezeichnet die Sepsis als Antwort auf eine Infektion nach einer systemischen Entzündungsreaktion (systemisches inflammatorisches Response Syndrom, SIRS). In Deutschland steigt aus unterschiedlichen Gründen die Anzahl der im Krankenhaus mit oder an einer Sepsis verstorbenen Patienten stetig an. Gleichzeitig stellt die frühzeitige und verlässliche Diagnose eine hohe Herausforderung dar. Bisher verfügbare Sepsis-Biomarker, wie CRP oder PCT, weisen jedoch keine ausreichende Trennschärfe (Sensitivität und Spezifität) zwischen SIRS und der häufig letal verlaufenden Sepsis auf.

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). Insbesondere die NK-Zellen im Blut von Patienten mit einem nicht-infektionsbedingten SIRS oder einer Sepsis auf der Intensivstation könnte die Identifikation von Sepsis spezifischen Biomarkern erleichtern.

Eine Analyse biochemischer Pfade (Pathway Analysis) in den Mikroarraydaten der Patienten-NK-Zellen mit der Gene Set Enrichment Methode legt nahe, dass in der Sepsis im Vergleich zum SIRS mit der Aktivierung von oxidativer Phosphorylierung, Zellzyklus und Apoptose assoziiert ist. Andere Vorarbeiten haben eine starke transkriptionelle Aktivierung der glykolytischen Gene in humanen NK-Zellen als Antwort auf IL-15 Priming gezeigt. In dieser Arbeit wurden NK-Zellen aus Probanden mittels Priming und sekundärer Stimulation unter Hypoxie als *in vitro* Modell verwendet. Hieraus ergibt sich die Hypothese, dass es während einer Sepsis zu Änderungen des Phänotyps, der Funktion und des Metabolismus der NK-Zellen kommt. Im Rahmen einer Sepsis sowie unter *in vitro* Priming herrscht eine metabolische Flexibilität gegenüber den verfügbaren Kohlenstoffquellen, welche nicht von der Glykolyse abhängen. Des Weiteren ist die Zellproliferation stärker ausgeprägt. Aus den Ergebnissen der phänotypischen Differenzierung der funktionellen sowie metabolischen Charakterisierung soll in der Zukunft ein konzeptuelles Modell zum Zustand der NK-Zellen bei Probanden sowie Patienten mit SIRS und Sepsis abgeleitet werden. 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 der 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 lassen sich in der Validierungsgruppe nicht replizieren. Die Ergebnisse dieser Arbeit deuten auf eine verstärkte Proliferation und Expression von Ki-67 der NK-Zellen während der Sepsis nach *ex vivo* Zytokinstimulation im Vergleich zu den

Probanden hin. Die Proliferationsfähigkeit sowie die Apoptose der NK-Zellen nehmen höhere Ausmaße in Sepsis- als in SIRS- Patienten an.

Die im Rahmen meiner Dissertation durchgeführten *in vitro* Analysen zeigen, dass unter Priming und Hypoxie die Sekretion von Interferon- $\gamma$ , vor allem auch nach dem Kontakt mit Zielzellen, gesteigert wird. Analysen zeigen überraschender Weise, dass NK-Zellen nach IL-15 Priming und Hypoxie eine kaum gesteigerte Glykolyse nutzen, jedoch die glykolytische Kapazität erhöhen. Die Glykolyse ist nach Kontakt mit einer Tumorzelllinie unverändert. Trotz starker Aktivierung der Expression glykolytischer Gene halten NK-Zellen nach Priming an einem nicht-glykolytischen Metabolismus fest. Die im Vergleich zum SIRS transkriptionell stark auf Zellatmung eingestellten NK-Zellen von Sepsis Patienten zeigen, dass sie von einem nicht-glykolytischen, oxidativen Stoffwechsel abhängen. Dies verdeutlicht sich zusätzlich durch eine lediglich geringe Steigerung der Glut-1 Expression und Glukoseaufnahme bei Sepsis Patienten im Vergleich zu SIRS Patienten. Vermutungen legen nahe, dass es sich hierbei um eine hohe Flexibilität gegenüber der verfügbaren Kohlenstoffquelle handelt.

Letztendliches Ziel dieser Arbeit war es, NK-Zellen bei Patienten mit SIRS und Sepsis sowie unter *in vitro* Priming hinsichtlich ihrer Unterschiede in Differenzierungsphänotyp, Metabolismus und Zellzyklus zu untersuchen. Diese sollen als mechanistisch begründete Biomarker zur frühen Differenzierung einer Sepsis von einem SIRS eingesetzt werden. Die in dieser Arbeit dargelegten Ergebnisse zum Phänotyp und zur Proliferation von NK-Zellen dienen als vielversprechende Indikatoren zur Diagnose der Sepsis. Jedoch ist es erforderlich die bisher gewonnenen Daten in einem größeren Stichprobenumfang zu validieren, bevor die Entwicklungsphase eines Biomarkers eingeleitet werden kann.

## 8 LITERATURVERZEICHNIS

Adam, D., Doerr, H.W., Link, H., and Lode, H. (2004). Die Infektiologie : mit 444 Tabellen (Berlin ; Heidelberg [u.a.]: Springer), pp. XXV, 1486 S.

Adhikari, N.K., Fowler, R.A., Bhagwanjee, S., and Rubenfeld, G.D. (2010). Critical care and the global burden of critical illness in adults. *Lancet* 376, 1339-1346.

Adib-Conquy, M., and Cavaillon, J.M. (2009). Compensatory anti-inflammatory response syndrome. *Thrombosis and haemostasis* 101, 36-47.

Agilent, T. (2017a): Agilent Seahorse XF Glycolysis Stress Test Kit- User Guide. Online:[https://www.agilent.com/cs/library/usermanuals/public/XF\\_Glycolysis\\_Stress\\_Test\\_Kit\\_User\\_Guide.pdf](https://www.agilent.com/cs/library/usermanuals/public/XF_Glycolysis_Stress_Test_Kit_User_Guide.pdf), Stand: 28.03.2019

Agilent, T. (2017b): Agilent Seahorse XF Mito Stress Test Kit- User Guide. Online: <https://www.agilent.com/en/products/cell-analysis/seahorse-xf-consumables/kits-reagents-media/seahorse-xf-cell-mito-stress-test-kit>, Stand: 28.03.2019

Agilent, T. (2017c): Agilent Seahorse XFp Mito Fuel Flex Test Kit- User Manual. Online: [https://www.agilent.com/cs/library/usermanuals/public/XFp\\_Mito\\_Fuel\\_Flex\\_Test\\_Kit\\_User\\_Guide.pdf](https://www.agilent.com/cs/library/usermanuals/public/XFp_Mito_Fuel_Flex_Test_Kit_User_Guide.pdf), Stand: 28.03.2019

AgilentTechnologies (2018): How Agilent Seahorse XF Analyzers Work Online: [https://www.agilent.com/en-us/products/cell-analysis-\(seahorse\)/how-seahorse-xf-analyzers-work](https://www.agilent.com/en-us/products/cell-analysis-(seahorse)/how-seahorse-xf-analyzers-work), Stand: 28.03.2019

Akira, S. (2000). The role of IL-18 in innate immunity. *Current Opinion in Immunology* 12, 59-63.

Alam, R. (1997). Chemokines in allergic inflammation. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 99, 273-277.

Alam, R., Stafford, S., Forsythe, P., Harrison, R., Faubion, D., Lett-Brown, M.A., and Grant, J.A. (1993). RANTES is a chemotactic and activating factor for human eosinophils. *The Journal of Immunology* 150, 3442-3448.

Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Morgan, D., Raff, M., Roberts, K., and Walter, P. (2017). *Molekularbiologie der Zelle*, 6. Auflage edn (Weinheim: Wiley-VCH).

Alter, G., Teigen, N., Davis, B.T., Addo, M.M., Suscovich, T.J., Waring, M.T., Streeck, H., Johnston, M.N., Staller, K.D., Zaman, M.T., *et al.* (2005). Sequential deregulation of NK cell subset distribution and function starting in acute HIV-1 infection. *Blood* 106, 3366-3369.

Amakata, Y., Fujiyama, Y., Andoh, A., Hodohara, K., and Bamba, T. (2001). Mechanism of NK cell activation induced by coculture with dendritic cells derived from peripheral blood monocytes. *Clinical & Experimental Immunology* 124, 214-222.

Amiel, E., Everts, B., Fritz, D., Beauchamp, S., Ge, B., Pearce, E.L., and Pearce, E.J. (2014). Mechanistic Target of Rapamycin Inhibition Extends Cellular Lifespan in

Dendritic Cells by Preserving Mitochondrial Function. *The Journal of Immunology* 193, 2821-2830.

Angus, D.C., and van der Poll, T. (2013). Severe sepsis and septic shock. *N Engl J Med* 369, 2063.

Baker, E., Sayers, T.J., Sutherland, G.R., and Smyth, M.J. (1994). The genes encoding NK cell granule serine proteases, human tryptase-2 (TRYP2) and human granzyme A (HFSP), both map to chromosome 5q11-q12 and define a new locus for cytotoxic lymphocyte granule tryptases. *Immunogenetics* 40, 235-237.

Balsamo, M., Manzini, C., Pietra, G., Raggi, F., Blengio, F., Mingari, M.C., Varesio, L., Moretta, L., Bosco, M.C., and Vitale, M. (2013). Hypoxia downregulates the expression of activating receptors involved in NK-cell-mediated target cell killing without affecting ADCC. *European Journal of Immunology* 43, 2756-2764.

Barkholt, L., Alici, E., Conrad, R., Sutlu, T., Gilljam, M., Stellan, B., Christensson, B., Guven, H., Björkström, N.K., Söderdahl, G., *et al.* (2009). Safety analysis of ex vivo-expanded NK and NK-like T cells administered to cancer patients: a Phase I clinical study. *Immunotherapy* 1, 753-764.

Barochia, A.V., Cui, X., Vitberg, D., Suffredini, A.F., O'Grady, N.P., Banks, S.M., Minneci, P., Kern, S.J., Danner, R.L., Natanson, C., *et al.* (2010). Bundled care for septic shock: An analysis of clinical trials\*. *Critical Care Medicine* 38, 668-678.

Bastian, M., Braun, T., Bruns, H., Röllinghoff, M., and Stenger, S. (2008). Mycobacterial Lipopeptides Elicit CD4<sup>+</sup> CTLs in *Mycobacterium tuberculosis*-Infected Humans. *The Journal of Immunology* 180, 3436-3446.

Bates, D.O. (2010). Vascular endothelial growth factors and vascular permeability. *Cardiovascular Research* 87, 262-271.

Bensch, B., Johnson, A.L., Kurachi, M., Odorizzi, P.M., Pauken, K.E., Attanasio, J., Stelekati, E., McLane, L.M., Paley, M.A., Delgoffe, G.M., *et al.* (2016). Bioenergetic Insufficiencies Due to Metabolic Alterations Regulated by the Inhibitory Receptor PD-1 Are an Early Driver of CD8<sup>+</sup> T Cell Exhaustion. *Immunity* 45, 358-373.

Berahovich, R.D., Lai, N.L., Wei, Z., Lanier, L.L., and Schall, T.J. (2006). Evidence for NK Cell Subsets Based on Chemokine Receptor Expression. *The Journal of Immunology* 177, 7833-7840.

Beresford, P.J., Xia, Z., Greenberg, A.H., and Lieberman, J. (1999). Granzyme A Loading Induces Rapid Cytolysis and a Novel Form of DNA Damage Independently of Caspase Activation. *Immunity* 10, 585-595.

Berg, J.M., Tymoczko, J.L., Gatto jr, G.J., and Stryer, L. (2018). *Stryer Biochemie*, 8. Aufl. 2018 edn (Berlin, Heidelberg: Springer Spektrum).

Bergmann, M., and Sautner, T. (2002). Immunomodulatory effects of vasoactive catecholamines. *Wiener Klinische Wochenschrift* 114, 752-761.

Bernardini, G., Gismondi, A., and Santoni, A. (2012). Chemokines and NK cells: regulators of development, trafficking and functions. *Immunol Lett* 145, 39-46.

Blattner, C., Fleming, V., Weber, R., Himmelhan, B., Altevogt, P., Gebhardt, C., Schulze, T.J., Razon, H., Hawila, E., Wildbaum, G., *et al.* (2018). CCR5<sup>+</sup> Myeloid-Derived Suppressor Cells Are Enriched and Activated in Melanoma Lesions. *Cancer Research* 78, 157-167.

Blazar, B. A., Rodrick, M. L., O'Mahony, J. B., Wood, J. J., Bessey, P. Q., Wilmore, D. W., & Mannick, J. A. (1986). Suppression of natural killer-cell function in humans following thermal and traumatic injury. *Journal of clinical immunology*, 6(1), 26-36.

Blobe, G.C., Schieman, W.P., and Lodish, H.F. (2000). Role of Transforming Growth Factor  $\beta$  in Human Disease. *New England Journal of Medicine* 342, 1350-1358.

Bluman, E.M., Bartynski, K.J., Avalos, B.R., and Caligiuri, M.A. (1996). Human natural killer cells produce abundant macrophage inflammatory protein-1 alpha in response to monocyte-derived cytokines. *J Clin Invest* 97, 2722-2727.

Bode-Boger, S.M., Boger, R.H., Kienke, S., Junker, W., and Frolich, J.C. (1996). Elevated L-arginine/dimethylarginine ratio contributes to enhanced systemic NO production by dietary L-arginine in hypercholesterolemic rabbits. *Biochem Biophys Res Commun* 219.

Bode-Böger, S.M., Scalera, F., Kielstein, J.T., Martens-Lobenhoffer, J., Breithardt, G., Fobker, M., and Reinecke, H. (2006). Symmetrical Dimethylarginine: A New Combined Parameter for Renal Function and Extent of Coronary Artery Disease. *Journal of the American Society of Nephrology* 17, 1128-1134.

Bone, R.C., Balk, R.A., Cerra, F.B., Dellinger, R.P., Fein, A.M., Knaus, W.A., Schein, R.M., and Sibbald, W.J. (1992a). Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine. *Chest* 101, 1644-1655.

Bone, R.C., Balk, R.A., Cerra, F.B., Dellinger, R.P., Fein, A.M., Knaus, W.A., Schein, R.M.H., and Sibbald, W.J. (1992b). Definitions for Sepsis and Organ Failure and Guidelines for the Use of Innovative Therapies in Sepsis. *Chest* 101, 1644-1655.

Borsig, L., Wolf, M.J., Roblek, M., Lorentzen, A., and Heikenwalder, M. (2014). Inflammatory chemokines and metastasis--tracing the accessory. *Oncogene* 33, 3217-3224.

Bossi, G., Trambas, C., Booth, S., Clark, R., Stinchcombe, J., and Griffiths, G.M. (2002). The secretory synapse: the secrets of a serial killer. *Immunological Reviews* 189, 152-160.

Bruhn, H.D., Fölsch, U.R., and H., S., eds. (2008). *LaborMedizin : Indikationen, Methodik und Laborwerte ; Pathophysiologie und Klinik ; mit ... 71 Tabellen*, 2. Aufl. edn (Stuttgart [u.a.]: Schattauer).

Brunkhorst, F.M. (2006). Epidemiologie, Ökonomie und Praxis - Ergebnisse der deutschen Prävalenzstudie des Kompetenznetzwerkes Sepsis (SepNet). *Anästhesiol Intensivmed Notfallmed Schmerzther* 41, 43-44.

Buck, M.D., Sowell, R.T., Kaech, S.M., and Pearce, E.L. (2017). Metabolic Instruction of Immunity. *Cell* 169, 570-586.

Bullwinkel, J., Baron-Lühr, B., Lüdemann, A., Wohlenberg, C., Gerdes, J., and Scholzen, T. (2006). Ki-67 protein is associated with ribosomal RNA transcription in quiescent and proliferating cells. *Journal of Cellular Physiology* 206, 624-635.

Bulut, K., Pennartz, C., Felderbauer, P., Ansorge, N., Schmitz, F., Schmidt, W.E., and Hoffmann, P. (2004). Vascular endothelial growth factor verbessert die intestinale Epithelzellrestitution in vitro: Beweis für einen TGF-beta-vermittelten Mechanismus. *Z Gastroenterol* 42, P102.

Burns, L.J., Weisdorf, D.J., DeFor, T.E., Vesole, D.H., Repka, T.L., Blazar, B.R., Burger, S.R., Panoskaltzis-Mortari, A., Keever-Taylor, C.A., Zhang, M.J., *et al.* (2003). IL-2-based immunotherapy after autologous transplantation for lymphoma and breast cancer induces immune activation and cytokine release: a phase I/II trial. *Bone Marrow Transplantation* 32, 177.

Cabrera, C.P., Manson, J., Shepherd, J.M., Torrance, H.D., Watson, D., Longhi, M.P., Hoti, M., Patel, M.B., O'Dwyer, M., Nourshargh, S., *et al.* (2017). Signatures of inflammation and impending multiple organ dysfunction in the hyperacute phase of trauma: A prospective cohort study. *PLoS medicine* 14, e1002352.

Calandra, T., Gerain, J., Heumann, D., Baumgartner, J.-D., and Glauser, M.P. (1991). High circulating levels of interleukin-6 in patients with septic shock: Evolution during sepsis, prognostic value, and interplay with other cytokines. *The American Journal of Medicine* 91, 23-29.

Cardenes, N., Corey, C., Geary, L., Jain, S., Zharikov, S., Barge, S., Novelli, E.M., and Shiva, S. (2014). Platelet bioenergetic screen in sickle cell patients reveals mitochondrial complex V inhibition, which contributes to platelet activation. *Blood* 123, 2864-2872.

Carlsten, M., and Childs, R.W. (2015). Genetic Manipulation of NK Cells for Cancer Immunotherapy: Techniques and Clinical Implications. *Frontiers in immunology* 6, 266.

Carson, W.E., Fehniger, T.A., and Caligiuri, M.A. (1997). CD56bright natural killer cell subsets: Characterization of distinct functional responses to interleukin-2 and the c-kit ligand. *European Journal of Immunology* 27, 354-360.

Carson, W.E., Yu, H., Dierksheide, J., Pfeffer, K., Bouchard, P., Clark, R., Durbin, J., Baldwin, A.S., Peschon, J., Johnson, P.R., *et al.* (1999). A Fatal Cytokine-Induced Systemic Inflammatory Response Reveals a Critical Role for NK Cells. *The Journal of Immunology* 162, 4943-4951.

Cavaillon, J.-M., and Adib-Conquy, M. (2006). Bench-to-bedside review: Endotoxin tolerance as a model of leukocyte reprogramming in sepsis. *Critical Care* 10, 233.

Cavaillon, J.M. (2001). Pro- versus anti-inflammatory cytokines: myth or reality. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* 47, 695-702.

Cerwenka, A., and Lanier, L.L. (2001). Ligands for natural killer cell receptors: redundancy or specificity. *Immunol Rev* 181, 158-169.

Chan, J.K., Roth, J., Oppenheim, J.J., Tracey, K.J., Vogl, T., Feldmann, M., Horwood, N., and Nanchahal, J. (2012). Alarmins: awaiting a clinical response. *J Clin Invest* 122, 2711-2719.

Chang, C.-H., Curtis, Jonathan D., Maggi, Leonard B., Faubert, B., Villarino, Alejandro V., O'Sullivan, D., Huang, Stanley C.-C., van der Windt, Gerritje J.W., Blagih, J., Qiu, J., *et al.* (2013). Posttranscriptional Control of T Cell Effector Function by Aerobic Glycolysis. *Cell* 153, 1239-1251.

Chaplin, D.D. (2010). Overview of the immune response. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 125, S3-S23.

Cheent, K., and Khakoo, S.I. (2009). Natural killer cells: integrating diversity with function. *Immunology* 126, 449-457.

Cheng, S.-C., Quintin, J., Cramer, R.A., Shephardson, K.M., Saeed, S., Kumar, V., Giamarellos-Bourboulis, E.J., Martens, J.H.A., Rao, N.A., Aghajani-refah, A., *et al.* (2014). mTOR- and HIF-1 $\alpha$ -mediated aerobic glycolysis as metabolic basis for trained immunity. *Science* 345, 1250684.

Cheng, S.C., Scicluna, B.P., Arts, R.J., Gresnigt, M.S., Lachmandas, E., Giamarellos-Bourboulis, E.J., Kox, M., Manjeri, G.R., Wagenaars, J.A., Cremer, O.L., *et al.* (2016). Broad defects in the energy metabolism of leukocytes underlie immunoparalysis in sepsis. *Nature immunology* 17, 406-413.

Chiche, L., Forel, J.M., Thomas, G., Farnarier, C., Vely, F., Blery, M., Papazian, L., and Vivier, E. (2011). The role of natural killer cells in sepsis. *J Biomed Biotechnol* 2011, 986491.

Chiossone, L., Chaix, J., Fuseri, N., Roth, C., Vivier, E., and Walzer, T. (2009). Maturation of mouse NK cells is a 4-stage developmental program. *Blood* 113, 5488-5496.

Colucci, F., Caligiuri, M.A., and Di Santo, J.P. (2003). What does it take to make a natural killer? *Nature Reviews Immunology* 3, 413.

Colucci, F., Di Santo, J.P., and Leibson, P.J. (2002). Natural killer cell activation in mice and men: different triggers for similar weapons? *Nature immunology* 3, 807.

Cook, D.N. (1996). The role of MIP-1 $\alpha$  in Inflammation and hematopoiesis. *Journal of Leukocyte Biology* 59, 61-66.

Cooper, M.A., Bush, J.E., Fehniger, T.A., VanDeusen, J.B., Waite, R.E., Liu, Y., Aguila, H.L., and Caligiuri, M.A. (2002). In vivo evidence for a dependence on interleukin 15 for survival of natural killer cells. *Blood* 100, 3633-3638.

Cooper, M.A., Fehniger, T.A., and Caligiuri, M.A. (2001). The biology of human natural killer-cell subsets. *Trends Immunol* 22, 633-640.

Corning (2019): Corning Matrigel Matrix. Online: <https://ecatalog.corning.com/life-sciences/b2c/DE/en/Surfaces/Extracellular-Matrices-ECMs/Corning®-Matrigel®-Matrix/p/corningMatrigelMatrix>, Stand:

Coulibaly, A., Velásquez, S.Y., Sticht, C., Figueiredo, A.S., Himmelhan, B.S., Schulte, J., Sturm, T., Centner, F.-S., Schöttler, J.J., Thiel, M., *et al.* (2019). AKIRIN1: A Potential New Reference Gene in Human Natural Killer Cells and Granulocytes in Sepsis. *International Journal of Molecular Sciences* 20, 2290.

D'Ignazio, L., Bandarra, D., and Rocha, S. (2016). NF- $\kappa$ B and HIF crosstalk in immune responses. *The FEBS Journal* 283, 413-424.

da Silva, J.M., Moreira Dos Santos, T.P., Sobral, L.M., Queiroz-Junior, C.M., Rachid, M.A., Proudfoot, A.E.I., Garlet, G.P., Batista, A.C., Teixeira, M.M., Leopoldino, A.M., *et al.* (2017). Relevance of CCL3/CCR5 axis in oral carcinogenesis. *Oncotarget* 8, 51024-51036.

Davenport, E.E., Burnham, K.L., Radhakrishnan, J., Humburg, P., Hutton, P., Mills, T.C., Rautanen, A., Gordon, A.C., Garrard, C., Hill, A.V., *et al.* (2016). Genomic landscape of the individual host response and outcomes in sepsis: a prospective cohort study. *The Lancet Respiratory medicine*.

De Colvenaer, V., Taveirne, S., Delforche, M., De Smedt, M., Vandekerckhove, B., Taghon, T., Boon, L., Plum, J., and Leclercq, G. (2011). CD27-deficient mice show normal NK-cell differentiation but impaired function upon stimulation. *Immunology & Cell Biology* 89, 803-811.

De Maria, A., Bozzano, F., Cantoni, C., and Moretta, L. (2011). Revisiting human natural killer cell subset function revealed cytolytic CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>+</sup> NK cells as rapid producers of abundant IFN- $\gamma$  on activation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108, 728-732.

Degli-Esposti, M.A., and Smyth, M.J. (2005). Close encounters of different kinds: Dendritic cells and NK cells take centre stage. *Nature Reviews Immunology* 5, 112.

DeLaBarre, B., Gross, S., Fang, C., Gao, Y., Jha, A., Jiang, F., Song J, J., Wei, W., and Hurov, J.B. (2011). Full-Length Human Glutaminase in Complex with an Allosteric Inhibitor. *Biochemistry* 50, 10764-10770.

Delves, P.J., Martin, S.J., Burton, D.R., and Roitt, I.M. (2017). *Roitt's essential immunology*, Thirteenth edition edn (New York: Wiley Blackwell).

Dengler, J., Schefold, J.C., Graetz, D., Meisel, C., Splettstößer, G., Volk, H.-D., and Schlosser, H.-G. (2008). Point-of-care testing for interleukin-6 in cerebro spinal fluid (CSF) after subarachnoid haemorrhage. *Medical Science Monitor* 14, BR265-BR268.

Di Santo, J.P. (2006). NATURAL KILLER CELL DEVELOPMENTAL PATHWAYS: A Question of Balance. *Annual review of immunology* 24, 257-286.



Dietz, I., Jerchel, S., Szaszák, M., Shima, K., and Rupp, J. (2012). When oxygen runs short: the microenvironment drives host–pathogen interactions. *Microbes and Infection* 14, 311-316.

Domagała-Kulawik, J., Maskey-Warzęchowska, M., Kraszewska, I., and Chazan, R. (2003). The Cellular Composition and Macrophage Phenotype in Induced Sputum in Smokers and Ex-Smokers With COPD. *Chest* 123, 1054-1059.

Donnelly, R.P., Loftus, R.M., Keating, S.E., Liou, K.T., Biron, C.A., Gardiner, C.M., and Finlay, D.K. (2014). mTORC1-dependent metabolic reprogramming is a prerequisite for Natural Killer cell effector function. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)* 193, 4477-4484.

Doughty, C.A., Bleiman, B.F., Wagner, D.J., Dufort, F.J., Mataraza, J.M., Roberts, M.F., and Chiles, T.C. (2006). Antigen receptor–mediated changes in glucose metabolism in B lymphocytes: role of phosphatidylinositol 3-kinase signaling in the glycolytic control of growth. *Blood* 107, 4458-4465.

Dvorak, H.F. (2002). Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor: a critical cytokine in tumor angiogenesis and a potential target for diagnosis and therapy. *Journal of clinical oncology* 20, 4368-4380.

Ellis, L.M., and Hicklin, D.J. (2008). VEGF-targeted therapy: mechanisms of anti-tumour activity. *Nature Reviews Cancer* 8, 579.

Elvidge, G.P., Glenny, L., Appelhoff, R.J., Ratcliffe, P.J., Ragoussis, J., and Gleadle, J.M. (2006). Concordant Regulation of Gene Expression by Hypoxia and 2-Oxoglutarate-dependent Dioxygenase Inhibition: THE ROLE OF HIF-1 $\alpha$ , HIF-2 $\alpha$ , AND OTHER PATHWAYS. *Journal of Biological Chemistry* 281, 15215-15226.

Emoto, M., Miyamoto, M., Yoshizawa, I., Emoto, Y., Schaible, U.E., Kita, E., and Kaufmann, S.H.E. (2002). Critical Role of NK Cells Rather Than V $\alpha$ 14<sup>+</sup>NKT Cells in Lipopolysaccharide-Induced Lethal Shock in Mice. *The Journal of Immunology* 169, 1426-1432.

Enari, M., Talanian, R.V., Wong, W.W., and Nagata, S. (1996). Sequential activation of ICE-like and CPP32-like proteases during Fas-mediated apoptosis. *Nature* 380, 723-726.

Endler, G., Marsik, C., Joukhadar, C., Marculescu, R., Mayr, F., Mannhalter, C., Wagner, O.F., and Jilma, B. (2004). The Interleukin-6 G(-174)C Promoter Polymorphism Does Not Determine Plasma Interleukin-6 Concentrations in Experimental Endotoxemia in Humans. *Clinical Chemistry* 50, 195-200.

Endt, J., McCann, F.E., Almeida, C.R., Urlaub, D., Leung, R., Pende, D., Davis, D.M., and Watzl, C. (2007). Inhibitory Receptor Signals Suppress Ligation-Induced Recruitment of NKG2D to GM1-Rich Membrane Domains at the Human NK Cell Immune Synapse. *The Journal of Immunology* 178, 5606-5611.

Etogo, A.O., Nunez, J., Lin, C.Y., Toliver-Kinsky, T.E., and Sherwood, E.R. (2008). NK but Not CD1-Restricted NKT Cells Facilitate Systemic Inflammation during Polymicrobial Intra-Abdominal Sepsis. *The Journal of Immunology* 180, 6334-6345.

Fabbi, M., Carbotti, G., and Ferrini, S. (2015). Context-dependent role of IL-18 in cancer biology and counter-regulation by IL-18BP. *J Leukoc Biol* 97, 665-675.

Fábián, Z., Taylor, C.T., and Nguyen, L.K. (2016). Understanding complexity in the HIF signaling pathway using systems biology and mathematical modeling. *Journal of Molecular Medicine* 94, 377-390.

Fan, Z., Beresford, P.J., Zhang, D., Xu, Z., Novina, C.D., Yoshida, A., Pommier, Y., and Lieberman, J. (2003). Cleaving the oxidative repair protein Ape1 enhances cell death mediated by granzyme A. *Nature immunology* 4, 145.

Fang, F.C. (1997). Perspectives series: host/pathogen interactions. Mechanisms of nitric oxide-related antimicrobial activity. *The Journal of Clinical Investigation* 99, 2818-2825.

Farag, S.S., and Caligiuri, M.A. (2006). Human natural killer cell development and biology. *Blood Reviews* 20, 123-137.

Farquhar, I., Martin, C.M., Lam, C., Potter, R., Ellis, C.G., and Sibbald, W.J. (1996). Decreased Capillary Density in Vivoin Bowel Mucosa of Rats with Normotensive Sepsis. *Journal of Surgical Research* 61, 190-196.

Fauriat, C., Long, E.O., Ljunggren, H.-G., and Bryceson, Y.T. (2010). Regulation of human NK-cell cytokine and chemokine production by target cell recognition. *Blood* 115, 2167-2176.

Fearon, D.T., and Locksley, R.M. (1996). The Instructive Role of Innate Immunity in the Acquired Immune Response. *Science* 272, 50-54.

Fehniger, T.A., Cai, S.F., Cao, X., Bredemeyer, A.J., Presti, R.M., French, Anthony R., and Ley, T.J. (2007). Acquisition of Murine NK Cell Cytotoxicity Requires the Translation of a Pre-existing Pool of Granzyme B and Perforin mRNAs. *Immunity* 26, 798-811.

Fehniger, T.A., Cooper, M.A., Nuovo, G.J., Cella, M., Facchetti, F., Colonna, M., and Caligiuri, M.A. (2003). CD56<sup>bright</sup> natural killer cells are present in human lymph nodes and are activated by T cell-derived IL-2: a potential new link between adaptive and innate immunity. *Blood* 101, 3052-3057.

Felices, M., Lenvik, A.J., McElmurry, R., Chu, S., Hinderlie, P., Bendzick, L., Geller, M.A., Tolar, J., Blazar, B.R., and Miller, J.S. (2018). Continuous treatment with IL-15 exhausts human NK cells via a metabolic defect. *JCI Insight* 3.

Ferlazzo, G., Morandi, B., D'Agostino, A., Meazza, R., Melioli, G., Moretta, A., and Moretta, L. (2003). The interaction between NK cells and dendritic cells in bacterial infections results in rapid induction of NK cell activation and in the lysis of uninfected dendritic cells. *European Journal of Immunology* 33, 306-313.

Ferlazzo, G., Pack, M., Thomas, D., Paludan, C., Schmid, D., Strowig, T., Bougras, G., Muller, W.A., Moretta, L., and Münz, C. (2004). Distinct roles of IL-12 and IL-15 in human natural killer cell activation by dendritic cells from secondary lymphoid organs.

Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *101*, 16606-16611.

Fern, R. (2003). Variations in spare electron transport chain capacity: The answer to an old riddle? *J Neurosci Res* *71*, 759-762.

Ferrick, D.A., Neilson, A., and Beeson, C. (2008). Advances in measuring cellular bioenergetics using extracellular flux. *Drug Discovery Today* *13*, 268-274.

Figueiredo, A.S., Killian, D., Schulte, J., Sticht, C., and Lindner, H.A. (2017). Whole transcriptome data of primary human NK cells under hypoxia and interleukin 15 priming: A 2x2 factorial design experiment. *Data in Brief* *14*, 77-83.

Finlay, David K. (2015). Metabolic regulation of natural killer cells. *Biochemical Society Transactions* *43*, 758-762.

Fisher, N.C., Neil, D.A., Williams, A., and Adams, D.H. (1999). Serum concentrations and peripheral secretion of the beta chemokines monocyte chemoattractant protein 1 and macrophage inflammatory protein 1alpha in alcoholic liver disease. *Gut* *45*, 416-420.

Fleischmann, C., Scherag, A., Adhikari, N.K.J., Hartog, C.S., Tsaganos, T., Schlattmann, P., Angus, D.C., and Reinhart, K. (2016a). Assessment of Global Incidence and Mortality of Hospital-treated Sepsis. Current Estimates and Limitations. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* *193*, 259-272.

Fleischmann, C., Thomas-Rueddel, D.O., Hartmann, M., Hartog, C.S., Welte, T., Heublein, S., Dennler, U., and Reinhart, K. (2016b). Fallzahlen und Sterblichkeitsraten von Sepsis-Patienten im Krankenhaus. *Dtsch Arztebl International* *113*, 159-166.

Forel, J.M., Chiche, L., Thomas, G., Mancini, J., Farnarier, C., Cognet, C., Guervilly, C., Daumas, A., Vely, F., Xeridat, F., *et al.* (2012). Phenotype and functions of natural killer cells in critically-ill septic patients. *PLoS One* *7*, e50446.

Fortin, C.F., McDonald, P.P., Fülöp, T., and Lesur, O. (2010). SEPSIS, LEUKOCYTES, AND NITRIC OXIDE (NO): AN INTRICATE AFFAIR. *Shock* *33*, 344-352.

Freeman, B.E., Raué, H.-P., Hill, A.B., and Slifka, M.K. (2015). Cytokine-Mediated Activation of NK Cells during Viral Infection. *Journal of Virology* *89*, 7922-7931.

Freud, A.G., Yokohama, A., Becknell, B., Lee, M.T., Mao, H.C., Ferketich, A.K., and Caligiuri, M.A. (2006). Evidence for discrete stages of human natural killer cell differentiation in vivo. *The Journal of Experimental Medicine* *203*, 1033-1043.

Fu, B., Tian, Z., and Wei, H. (2014). Subsets of human natural killer cells and their regulatory effects. *Immunology* *141*, 483-489.

Fu, B., Wang, F., Sun, R., Ling, B., Tian, Z., and Wei, H. (2011). CD11b and CD27 reflect distinct population and functional specialization in human natural killer cells. *Immunology* *133*, 350-359.

Furukawa, H., Yabe, T., Watanabe, K., Miyamoto, R., Miki, A., Akaza, T., Tadokoro, K., Tohma, S., Inoue, T., Yamamoto, K., *et al.* (1999). Tolerance of NK and LAK activity for HLA class I-deficient targets in a TAP1-deficient patient (bare lymphocyte syndrome type I). *Human Immunology* 60, 32-40.

Gao, F., Melody, T., Daniels, D.F., Giles, S., and Fox, S. (2005). The impact of compliance with 6-hour and 24-hour sepsis bundles on hospital mortality in patients with severe sepsis: a prospective observational study. *Critical Care* 9, R764.

Gardiner, C.M., and Finlay, D.K. (2017). What Fuels Natural Killers? Metabolism and NK Cell Responses. *Frontiers in immunology* 8, 367-367.

Garrido, F., and Algarra, I. (2001). MHC antigens and tumor escape from immune surveillance. *Adv Cancer Res* 83, 117-158.

Georgeson, G. D., Szóny, B. J., Streitman, K., Kovács, A., Kovács, L., & László, A. (2001). Natural killer cell cytotoxicity is deficient in newborns with sepsis and recurrent infections. *European journal of pediatrics*, 160(8), 478-482.

Gerdes, J., Lemke, H., Baisch, H., Wacker, H.H., Schwab, U., and Stein, H. (1984). Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67. *The Journal of Immunology* 133, 1710-1715.

Gerdes, J., Schwab, U., Lemke, H., and Stein, H. (1983). Production of a mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation. *International Journal of Cancer* 31, 13-20.

Giamarellos-Bourboulis, E.J., Tsaganos, T., Spyridaki, E., Mouktaroudi, M., Plachouras, D., Vaki, I., Karagianni, V., Antonopoulou, A., Veloni, V., and Giamarellou, H. (2006). Early changes of CD4-positive lymphocytes and NK cells in patients with severe Gram-negative sepsis. *Crit Care* 10, R166.

Gilbert, K.M., Thoman, M., Bauche, K., Pham, T., and Weigle, W.O. (1997). Transforming growth factor- $\beta$ 1 induces antigen-specific unresponsiveness in naive T cells. *Immunological Investigations* 26, 459-472.

Gismondi, A., Jacobelli, J., Strippoli, R., Mainiero, F., Soriani, A., Cifaldi, L., Piccoli, M., Frati, L., and Santoni, A. (2003). Proline-Rich Tyrosine Kinase 2 and Rac Activation by Chemokine and Integrin Receptors Controls NK Cell Transendothelial Migration. *The Journal of Immunology* 170, 3065-3073.

Glas, R., Franksson, L., Une, C., Eloranta, M.L., Ohlén, C., Orn, A., and Kärre, K. (2000). Recruitment and activation of natural killer (NK) cells in vivo determined by the target cell phenotype. An adaptive component of NK cell-mediated responses. *The Journal of experimental medicine* 191, 129-138.

González, S., Groh, V., and Spies, T. (2006). Immunobiology of Human NKG2D and Its Ligands. In *Immunobiology of Natural Killer Cell Receptors*, R.W. Compans, M.D. Cooper, T. Honjo, H. Koprowski, F. Melchers, M.B.A. Oldstone, S. Olsnes, M. Potter, P.K. Vogt, H. Wagner, *et al.*, eds. (Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg), pp. 121-138.

Gregoire, C., Chasson, L., Luci, C., Tomasello, E., Geissmann, F., Vivier, E., and Walzer, T. (2007). The trafficking of natural killer cells. *Immunol Rev* 220, 169-182.

Grütz, G. (2005). New insights into the molecular mechanism of interleukin-10-mediated immunosuppression. *Journal of Leukocyte Biology* 77, 3-15.

Guo, Y., Luan, L., Patil, N.K., Wang, J., Bohannon, J.K., Rabacal, W., Fensterheim, B.A., Hernandez, A., and Sherwood, E.R. (2017). IL-15 Enables Septic Shock by Maintaining NK Cell Integrity and Function. *The Journal of Immunology* 198, 1320-1333.

Guo, Y., Patil, N.K., Luan, L., Bohannon, J.K., and Sherwood, E.R. (2018). The biology of natural killer cells during sepsis. *Immunology* 153, 190-202.

Haimovich, B., Reddell, M.T., Calvano, J.E., Calvano, S.E., Macor, M.A., Coyle, S.M., and Lowry, S.F. (2010). A novel model of common Toll-like receptor 4- and injury-induced transcriptional themes in human leukocytes. *Critical Care* 14, R177.

Halestrap, A.P. (1975). The mitochondrial pyruvate carrier. Kinetics and specificity for substrates and inhibitors. *The Biochemical journal* 148, 85-96.

Hallbach, J. (2011). *Klinische Chemie und Hämatologie : biomedizinische Analytik für MTLA und Studium; 154 Tab, 3., überarb. Aufl. edn* (Stuttgart [u.a.]: Thieme).

Halstead, E.S., Carcillo, J.A., Schilling, B., Greiner, R.J., and Whiteside, T.L. (2013). Reduced frequency of CD56dim CD16pos natural killer cells in pediatric systemic inflammatory response syndrome/sepsis patients. *Pediatric Research* 74, 427.

Hatch, C.L., and Bonner, W.M. (1990). The human histone H2A.Z gene. Sequence and regulation. *Journal of Biological Chemistry* 265, 15211-15218.

Hayakawa, Y., Huntington, N.D., Nutt, S.L., and Smyth, M.J. (2006). Functional subsets of mouse natural killer cells. *Immunol Rev* 214, 47-55.

Held, W., Jeevan-Raj, B., and Charmoy, M. (2018). Transcriptional regulation of murine natural killer cell development, differentiation and maturation. *Cellular and Molecular Life Sciences* 75, 3371-3379.

Herdegen, T., and Böhm, R. (2014). *Kurzlehrbuch Pharmakologie und Toxikologie, 3., vollständig überarb. und erw. Aufl. / unter Mitarb. von Ruwen Böhm ... edn* (Stuttgart ; New York: Thieme).

Hicklin, D.J., and Ellis, L.M. (2005). Role of the Vascular Endothelial Growth Factor Pathway in Tumor Growth and Angiogenesis. *Journal of Clinical Oncology* 23, 1011-1027.

Hof, H., and Dörries, R. (2017). *Medizinische Mikrobiologie, 6. unveränderte Auflage edn* (Stuttgart: Thieme).

Holub, M., Kluckova, Z., Helcl, M., Prihodov, J., Rokyta, R., and Beran, O. (2003). Lymphocyte subset numbers depend on the bacterial origin of sepsis. *Clin Microbiol Infect* 9, 202-211.

Hoppe, J., Scriba, P., and Klüter, H. (2014). Querschnitts-Leitlinien (BÄK) zur Therapie mit Blutkomponenten und Plasmaderivaten–4. In: (Deutscher Ärzte-Verlag).

Horn, F. (2018). Biochemie des Menschen : das Lehrbuch für das Medizinstudium, 7., korrigierte Auflage edn (Stuttgart ; New York: Thieme).

Hotchkiss, R.S., Chang, K.C., Swanson, P.E., Tinsley, K.W., Hui, J.J., Klender, P., Xanthoudakis, S., Roy, S., Black, C., Grimm, E., *et al.* (2000). Caspase inhibitors improve survival in sepsis: a critical role of the lymphocyte. *Nature immunology* 1, 496-501.

Hume, D.A., Radik, J.L., Ferber, E., and Weidemann, M.J. (1978). Aerobic glycolysis and lymphocyte transformation. *Biochemical Journal* 174, 703-709.

Huntington, N.D., Legrand, N., Alves, N.L., Jaron, B., Weijer, K., Plet, A., Corcuff, E., Mortier, E., Jacques, Y., Spits, H., *et al.* (2009). IL-15 trans-presentation promotes human NK cell development and differentiation in vivo. *J Exp Med* 206, 25-34.

Ignarro, L.J. (1990). Nitric oxide. A novel signal transduction mechanism for transcellular communication. *Hypertension* 16, 477-483.

Iliopoulou, E.G., Kountourakis, P., Karamouzis, M.V., Doufexis, D., Ardavanis, A., Baxevanis, C.N., Rigatos, G., Papamichail, M., and Perez, S.A. (2010). A phase I trial of adoptive transfer of allogeneic natural killer cells in patients with advanced non-small cell lung cancer. *Cancer Immunology, Immunotherapy* 59, 1781-1789.

Inngjerdigen, M., Damaj, B., and Maghazachi, A.A. (2001). Expression and regulation of chemokine receptors in human natural killer cells. *Blood* 97, 367-375.

Ishida, Y., Migita, K., Izumi, Y., Nakao, K., Ida, H., Kawakami, A., Abiru, S., Ishibashi, H., Eguchi, K., and Ishii, N. (2004). The role of IL-18 in the modulation of matrix metalloproteinases and migration of human natural killer (NK) cells. *FEBS Lett* 569, 156-160.

Jang, M., Kim, S.S., and Lee, J. (2013). Cancer cell metabolism: implications for therapeutic targets. *Experimental & Molecular Medicine* 45, e45.

Jensen, I.J., Winborn, C.S., Fosdick, M.G., Shao, P., Tremblay, M.M., Shan, Q., Tripathy, S.K., Snyder, C.M., Xue, H.-H., Griffith, T.S., *et al.* (2018). Polymicrobial sepsis influences NK-cell-mediated immunity by diminishing NK-cell-intrinsic receptor-mediated effector responses to viral ligands or infections. *PLOS Pathogens* 14, e1007405.

Juremalm, M., Olsson, N., and Nilsson, G. (2002). Selective CCL5/RANTES-induced mast cell migration through interactions with chemokine receptors CCR1 and CCR4. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 297, 480-485.

Karo, Jenny M., Schatz, David G., and Sun, Joseph C. (2014). The RAG Recombinase Dictates Functional Heterogeneity and Cellular Fitness in Natural Killer Cells. *Cell* 159, 94-107.

Karow, T. (2015). Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie : vorlesungsorientierte Darstellung und klinischer Leitfaden für Studium und Praxis : 2016, 24. Auflage edn (Pulheim: Thomas Karow).

Karre, K., Ljunggren, H.G., Piontek, G., and Kiessling, R. (1986). Selective rejection of H-2-deficient lymphoma variants suggests alternative immune defence strategy. *Nature* 319, 675-678.

Keating, S.E., Zaiatz-Bittencourt, V., Loftus, R.M., Keane, C., Brennan, K., Finlay, D.K., and Gardiner, C.M. (2016). Metabolic Reprogramming Supports IFN-gamma Production by CD56bright NK Cells. *J Immunol* 196, 2552-2560.

Keppel, M.P., and Cooper, M.A. (2016). Assessment of NK Cell Metabolism. In *Natural Killer Cells: Methods and Protocols*, S.S. Somanchi, ed. (New York, NY: Springer New York), pp. 27-42.

Keppel, M.P., Saucier, N., Mah, A.Y., Vogel, T.P., and Cooper, M.A. (2015). Activation-specific metabolic requirements for NK Cell IFN-gamma production. *J Immunol* 194, 1954-1962.

Kilbourn, R.G., Gross, S.S., Jubran, A., Adams, J., Griffith, O.W., Levi, R., and Lodato, R.F. (1990). NG-methyl-L-arginine inhibits tumor necrosis factor-induced hypotension: implications for the involvement of nitric oxide. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 87, 3629-3632.

Kim, S., Iizuka, K., Kang, H.-S.P., Dokun, A., French, A.R., Greco, S., and Yokoyama, W.M. (2002). In vivo developmental stages in murine natural killer cell maturation. *Nature immunology* 3, 523.

Kiniwa, T., Enomoto, Y., Terazawa, N., Omi, A., Miyata, N., Ishiwata, K., and Miyajima, A. (2016). NK cells activated by Interleukin-4 in cooperation with Interleukin-15 exhibit distinctive characteristics. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 113, 10139-10144.

Klimpel, G. R., Herndon, D. N., Fons, M., Albrecht, T., Asuncion, M. T., Chin, R., & Stein, M. D. (1986). Defective NK cell activity following thermal injury. *Clinical and experimental immunology*, 66(2), 384.

Kowanetz, M., and Ferrara, N. (2006). Vascular Endothelial Growth Factor Signaling Pathways: Therapeutic Perspective. *Clinical Cancer Research* 12, 5018-5022.

Kramer, P.A., and Darley-Usmar, V.M. (2015). The emerging theme of redox bioenergetics in health and disease. *Biomed J* 38, 294-300.

Kreger, B.E., Craven, D.E., and McCabe, W.R. (1980). Gram-negative bacteremia: IV. Re-evaluation of clinical features and treatment in 612 patients. *The American Journal of Medicine* 68, 344-355.

Krzywinska, E., Allende-Vega, N., Cornillon, A., Vo, D.-N., Cayrefourcq, L., Panabieres, C., Vilches, C., Déchanet-Merville, J., Hicheri, Y., Rossi, J.-F., *et al.* (2015). Identification of Anti-tumor Cells Carrying Natural Killer (NK) Cell Antigens in Patients With Hematological Cancers. *EBioMedicine* 2, 1364-1376.

Krzywinska, E., Kantari-Mimoun, C., Kerdiles, Y., Sobecki, M., Isagawa, T., Gotthardt, D., Castells, M., Haubold, J., Millien, C., Viel, T., *et al.* (2017). Loss of HIF-1 $\alpha$  in natural killer cells inhibits tumour growth by stimulating non-productive angiogenesis. *Nature communications* 8, 1597-1597.

Ku, D.D., Zaleski, J.K., Liu, S., and Brock, T.A. (1993). Vascular endothelial growth factor induces EDRF-dependent relaxation in coronary arteries. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* 265, H586-H592.

Kumar, A., Kumar, A., Paladugu, B., Mensing, J., and Parrillo, J.E. (2007). Transforming growth factor- $\beta$ 1 blocks in vitro cardiac myocyte depression induced by tumor necrosis factor- $\alpha$ , interleukin-1 $\beta$ , and human septic shock serum. *Critical Care Medicine* 35, 358-364.

Kumar, A., Roberts, D., Wood, K.E., Light, B., Parrillo, J.E., Sharma, S., Suppes, R., Feinstein, D., Zanotti, S., Taiberg, L., *et al.* (2006). Duration of hypotension before initiation of effective antimicrobial therapy is the critical determinant of survival in human septic shock. *Crit Care Med* 34, 1589-1596.

Kunkel, M., Reichert, T.E., Benz, P., Lehr, H.-A., Jeong, J.-H., Wieand, S., Bartenstein, P., Wagner, W., and Whiteside, T.L. (2003). Overexpression of Glut-1 and increased glucose metabolism in tumors are associated with a poor prognosis in patients with oral squamous cell carcinoma. *Cancer* 97, 1015-1024.

Lam, C., Tyml, K., Martin, C., and Sibbald, W. (1994). Microvascular perfusion is impaired in a rat model of normotensive sepsis. *The Journal of Clinical Investigation* 94, 2077-2083.

Lanier, L.L. (1998). NK cell receptors. *Annual review of immunology* 16, 359-393.

Lanier, L.L. (2003). Natural killer cell receptor signaling. *Current Opinion in Immunology* 15, 308-314.

Lanier, L.L. (2008). Up on the tightrope: natural killer cell activation and inhibition. *Nature immunology* 9, 495-502.

Leibson, P.J. (1997). Signal Transduction during Natural Killer Cell Activation: Inside the Mind of a Killer. *Immunity* 6, 655-661.

Leone, A., Moncada, S., Vallance, P., Calver, A., and Collier, J. (1992). Accumulation of an endogenous inhibitor of nitric oxide synthesis in chronic renal failure. *The Lancet* 339, 572-575.

Leong, J., Chase, J., Romee, R., Schneider, S., Sullivan, R., and Fehniger, T. (2013). Cytokine activation induces CD25 expression and a functional high-affinity IL-2 receptor on CD56dim human NK Cells (P4349). *The Journal of Immunology* 190, 183.110-183.110.

Levy, M.M., Evans, L.E., and Rhodes, A. (2018). The Surviving Sepsis Campaign Bundle: 2018 update. *Intensive Care Medicine* 44, 925-928.



Levy, M.M., Fink, M.P., Marshall, J.C., Abraham, E., Angus, D., Cook, D., Cohen, J., Opal, S.M., Vincent, J.-L., Ramsay, G., *et al.* (2003). 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference. *Intensive Care Medicine* 29, 530-538.

Li, K., Gordon, A.C., Zheng, L., Li, W., Guo, Y., Sun, J., Zhang, G., Han, G., Larson, A.C., and Zhang, Z. (2015). Clinically applicable magnetic-labeling of natural killer cells for MRI of transcatheter delivery to liver tumors: preclinical validation for clinical translation. *Nanomedicine* 10, 1761-1774.

Liao, J., Zhao, Q., Wu, Y., and Diwu, Z. (2013). Multiplexing analysis of cell proliferation and cellular functions using a new multicolor panel of fluorescent cell proliferation dyes (P1290). *The Journal of Immunology* 190, 119.114-119.114.

Lima, M., Leander, M., Santos, M., Santos, A.H., Lau, C., Queiros, M.L., Goncalves, M., Fonseca, S., Moura, J., Teixeira Mdos, A., *et al.* (2015). Chemokine Receptor Expression on Normal Blood CD56(+) NK-Cells Elucidates Cell Partners That Comigrate during the Innate and Adaptive Immune Responses and Identifies a Transitional NK-Cell Population. *J Immunol Res* 2015, 839684.

Linares, E., Giorgio, S., Mortara, R.A., Santos, C.X.C., Yamada, A.T., and Augusto, O. (2001). Role of peroxynitrite in macrophage microbicidal mechanisms in vivo revealed by protein nitration and hydroxylation. *Free Radical Biology and Medicine* 30, 1234-1242.

Liu, T.F., Vachharajani, V., Millet, P., Bharadwaj, M.S., Molina, A.J., and McCall, C.E. (2015). Sequential Actions of SIRT1-RELB-SIRT3 Coordinate Nuclear-Mitochondrial Communication during Immunometabolic Adaptation to Acute Inflammation and Sepsis. *Journal of Biological Chemistry* 290, 396-408.

Ljunggren, H.-G., and Kärre, K. (1990). In search of the 'missing self': MHC molecules and NK cell recognition. *Immunology Today* 11, 237-244.

Lloyd, C.M., Delaney, T., Nguyen, T., Tian, J., Martinez-A, C., Coyle, A.J., and Gutierrez-Ramos, J.-C. (2000). Cc Chemokine Receptor (Ccr)3/Eotaxin Is Followed by Ccr4/Monocyte-Derived Chemokine in Mediating Pulmonary T Helper Lymphocyte Type 2 Recruitment after Serial Antigen Challenge in Vivo. *The Journal of Experimental Medicine* 191, 265-274.

Lochner, M., Berod, L., and Sparwasser, T. (2015). Fatty acid metabolism in the regulation of T cell function. *Trends in Immunology* 36, 81-91.

Loftus, R.M., Assmann, N., Kedia-Mehta, N., O'Brien, K.L., Garcia, A., Gillespie, C., Hukelmann, J.L., Oefner, P.J., Lamond, A.I., Gardiner, C.M., *et al.* (2018). Amino acid-dependent cMyc expression is essential for NK cell metabolic and functional responses in mice. *Nature Communications* 9, 2341.

Loftus, R.M., and Finlay, D.K. (2016). Immunometabolism: Cellular Metabolism Turns Immune Regulator. *Journal of Biological Chemistry* 291, 1-10.

López, A., Lorente, J.A., Steingrub, J., Bakker, J., McLuckie, A., Willatts, S., Brockway, M., Anzueto, A., Holzapfel, L., Breen, D., *et al.* (2004). Multiple-center, randomized,  
147

placebo-controlled, double-blind study of the nitric oxide synthase inhibitor 546C88: Effect on survival in patients with septic shock\*. *Critical Care Medicine* 32, 21-30.

Loux, T.J., Lotze, M.T., and Zeh, H.J. (2010). Chapter Fourteen - NK cells as recipients of cytokine signals. In *Natural Killer Cells*, M.T. Lotze, and A.W. Thomson, eds. (San Diego: Academic Press), pp. 189-201.

Lusty, E., Poznanski, S.M., Kwofie, K., Mandur, T.S., Lee, D.A., Richards, C.D., and Ashkar, A.A. (2017). IL-18/IL-15/IL-12 synergy induces elevated and prolonged IFN-gamma production by ex vivo expanded NK cells which is not due to enhanced STAT4 activation. *Mol Immunol* 88, 138-147.

Luttmann, W., Bratke, K., Küpper, M., and Myrtek, D. (2014). *Der Experimentator: Immunologie*, 4., vollst. überarb. u. korr. Aufl. 2014 edn (Berlin, Heidelberg: Springer Spektrum).

Ma, A., Koka, R., and Burkett, P. (2006). DIVERSE FUNCTIONS OF IL-2, IL-15, AND IL-7 IN LYMPHOID HOMEOSTASIS. *Annual review of immunology* 24, 657-679.

Macintyre, Andrew N., Gerriets, Valerie A., Nichols, Amanda G., Michalek, Ryan D., Rudolph, Michael C., Deoliveira, D., Anderson, Steven M., Abel, E.D., Chen, Benny J., Hale, Laura P., *et al.* (2014). The Glucose Transporter Glut1 Is Selectively Essential for CD4 T Cell Activation and Effector Function. *Cell Metabolism* 20, 61-72.

Maghazachi, A.A., al-Aoukaty, A., and Schall, T.J. (1994). C-C chemokines induce the chemotaxis of NK and IL-2-activated NK cells. Role for G proteins. *J Immunol* 153, 4969-4977.

Mah , A.Y., and Cooper, M.A. (2016). Metabolic Regulation of Natural Killer Cell IFN- $\gamma$  Production. 36, 131-147.

Mailliard, R.B., Alber, S.M., Shen, H., Watkins, S.C., Kirkwood, J.M., Herberman, R.B., and Kalinski, P. (2005). IL-18-induced CD83+CCR7+ NK helper cells. *J Exp Med* 202, 941-953.

Maloy, K.J., and Powrie, F. (2001). Regulatory T cells in the control of immune pathology. *Nature immunology* 2, 816.

Mandal, A., and Viswanathan, C. (2015). Natural killer cells: In health and disease. *Hematology/Oncology and Stem Cell Therapy* 8, 47-55.

Marcais, A., Cherfils-Vicini, J., Viant, C., Degouve, S., Viel, S., Fenis, A., Rabilloud, J., Mayol, K., Tavares, A., Biennvenu, J., *et al.* (2014). The metabolic checkpoint kinase mTOR is essential for IL-15 signaling during the development and activation of NK cells. *Nature immunology* 15, 749-757.

Marcenaro, E., Chiesa, M.D., Bellora, F., Parolini, S., Millo, R., Moretta, L., and Moretta, A. (2005). IL-12 or IL-4 Prime Human NK Cells to Mediate Functionally Divergent Interactions with Dendritic Cells or Tumors. *The Journal of Immunology* 174, 3992-3998.

Marie, C., Cavaillon, J.-M., and Losser, M.-R. (1996). Elevated levels of circulating transforming growth factor- $\beta$  1 in patients with the sepsis syndrome. *Annals of internal medicine* 125, 520-521.

Maslove, D.M., and Wong, H.R. (2014). Gene expression profiling in sepsis: timing, tissue, and translational considerations. *Trends in Molecular Medicine* 20, 204-213.

Maturana, P., Puente, J., Miranda, D., Sepulveda, C., Wolf, M. E., & Mosnaim, A. D. (1991). Natural killer cell activity in patients with septic shock. *Journal of Critical Care*, 6(1), 42-45.

Maurer, M., and von Stebut, E. (2004). Macrophage inflammatory protein-1. *Int J Biochem Cell Biol* 36, 1882-1886.

Mauri, C., and Bosma, A. (2012). Immune Regulatory Function of B Cells. *Annual review of immunology* 30, 221-241.

Mavilio, D., Lombardo, G., Benjamin, J., Kim, D., Follman, D., Marcenaro, E., O'Shea, M.A., Kinter, A., Kovacs, C., Moretta, A., *et al.* (2005). Characterization of CD56<sup>+</sup>/CD16<sup>+</sup> natural killer (NK) cells: A highly dysfunctional NK subset expanded in HIV-infected viremic individuals. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102, 2886-2891.

McHugh, L., Seldon, T.A., Brandon, R.A., Kirk, J.T., Rapisarda, A., Sutherland, A.J., Presneill, J.J., Venter, D.J., Lipman, J., Thomas, M.R., *et al.* (2015). A Molecular Host Response Assay to Discriminate Between Sepsis and Infection-Negative Systemic Inflammation in Critically Ill Patients: Discovery and Validation in Independent Cohorts. *PLoS medicine* 12, e1001916.

Medzhitov, R. (2001). Toll-like receptors and innate immunity. *Nature Reviews Immunology* 1, 135.

Medzhitov, R., and Janeway, C.A. (1997). Innate Immunity: The Virtues of a Nonclonal System of Recognition. *Cell* 91, 295-298.

Menten, P., Wuyts, A., and Van Damme, J. (2002). Macrophage inflammatory protein-1. *Cytokine Growth Factor Rev* 13, 455-481.

Metkar, S.S., Wang, B., Aguilar-Santelises, M., Raja, S.M., Uhlin-Hansen, L., Podack, E., Trapani, J.A., and Froelich, C.J. (2002). Cytotoxic Cell Granule-Mediated Apoptosis: Perforin Delivers Granzyme B-Serglycin Complexes into Target Cells without Plasma Membrane Pore Formation. *Immunity* 16, 417-428.

Meyer, J., Traber, L.D., Nelson, S., Lentz, C.W., Nakazawa, H., Herndon, D.N., Noda, H., and Traber, D.L. (1992). Reversal of hyperdynamic response to continuous endotoxin administration by inhibition of NO synthesis. *Journal of Applied Physiology* 73, 324-328.

Michalek, R.D., Gerriets, V.A., Jacobs, S.R., Macintyre, A.N., MacIver, N.J., Mason, E.F., Sullivan, S.A., Nichols, A.G., and Rathmell, J.C. (2011). Cutting edge: distinct glycolytic and lipid oxidative metabolic programs are essential for effector and

regulatory CD4+ T cell subsets. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)* 186, 3299-3303.

Miller, J.S., Soignier, Y., Panoskaltzis-Mortari, A., McNearney, S.A., Yun, G.H., Fautsch, S.K., McKenna, D., Le, C., Defor, T.E., Burns, L.J., *et al.* (2005). Successful adoptive transfer and in vivo expansion of human haploidentical NK cells in patients with cancer. *Blood* 105, 3051-3057.

Mocellin, S., Panelli, M., Wang, E., Rossi, C.R., Pilati, P., Nitti, D., Lise, M., and Marincola, F.M. (2004). IL-10 stimulatory effects on human NK cells explored by gene profile analysis. *Genes And Immunity* 5, 621.

Moncada, S., and Higgs, A. (1993). The L-Arginine-Nitric Oxide Pathway. *New England Journal of Medicine* 329, 2002-2012.

Moncada, S., Higgs, E.A., Hodson, H.F., Knowles, R.G., Lopez-Jaramillo, P., McCall, T., Palmer, R.M.J., Radomski, M.W., Rees, D.D., and Schulz, R. (1991). The L-Arginine: Nitric Oxide Pathway. *Journal of Cardiovascular Pharmacology* 17, S1-S9.

Moore, K.W., Malefyt, R.d.W., Coffman, R.L., and O'Garra, A. (2001). Interleukin-10 and the Interleukin-10 Receptor. *Annual review of immunology* 19, 683-765.

Moretta, A. (2002). Natural killer cells and dendritic cells: rendezvous in abused tissues. *Nature Reviews Immunology* 2, 957.

Moretta, A., Bottino, C., Vitale, M., Pende, D., Biassoni, R., Mingari, M.C., and Moretta, L. (1996). RECEPTORS FOR HLA CLASS-I MOLECULES IN HUMAN NATURAL KILLER CELLS. *Annual review of immunology* 14, 619-648.

Moretta, A., Marcenaro, E., Parolini, S., Ferlazzo, G., and Moretta, L. (2007). NK cells at the interface between innate and adaptive immunity. *Cell Death And Differentiation* 15, 226.

Mortier, E., Woo, T., Advincula, R., Gozalo, S., and Ma, A. (2008). IL-15R $\alpha$  chaperones IL-15 to stable dendritic cell membrane complexes that activate NK cells via trans presentation. *The Journal of Experimental Medicine* 205, 1213-1225.

Mrozek, E., Anderson, P., and Caligiuri, M. (1996). Role of interleukin-15 in the development of human CD56+ natural killer cells from CD34+ hematopoietic progenitor cells. *Blood* 87, 2632-2640.

Munder, M., Mallo, M., Eichmann, K., and Modolell, M. (2001). Direct stimulation of macrophages by IL-12 and IL-18 — a bridge built on solid ground. *Immunology Letters* 75, 159-160.

Murphy, K., and Weaver, C. (2018). *Janeway Immunologie*, 9. Aufl. 2018 edn (Berlin, Heidelberg: Springer Spektrum).

Nakajima, E.C., and Van Houten, B. (2013). Metabolic symbiosis in cancer: Refocusing the Warburg lens. *Molecular Carcinogenesis* 52, 329-337.

Nekludov, M., Antovic, J., Bredbacka, S., and Blombäck, M. (2007). Coagulation Abnormalities Associated with Severe Isolated Traumatic Brain Injury: Cerebral Arterio-Venous Differences in Coagulation and Inflammatory Markers. *Journal of Neurotrauma* 24, 174-180.

Nelson, D.L., and Cox, M.M. (2009). *Lehninger Biochemie : mit 131 Tabellen, 4., vollst. überarb. und erw. Aufl., Übers. der 5. amerikan. Aufl. edn* (Berlin ; Heidelberg: Springer).

Nguyen, L.K., Cavadas, M.A.S., Scholz, C.C., Fitzpatrick, S.F., Bruning, U., Cummins, E.P., Tambuwala, M.M., Manresa, M.C., Kholodenko, B.N., Taylor, C.T., *et al.* (2013). A dynamic model of the hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ) network. *Journal of Cell Science* 126, 1454-1463.

Ni, J., Miller, M., Stojanovic, A., Garbi, N., and Cerwenka, A. (2012). Sustained effector function of IL-12/15/18–preactivated NK cells against established tumors. *The Journal of Experimental Medicine* 209, 2351-2365.

Nicholson, L.B. (2016). The immune system. *Essays Biochem* 60, 275-301.

Nielsen, C.M., Wolf, A.-S., Goodier, M.R., and Riley, E.M. (2016). Synergy between Common  $\gamma$  Chain Family Cytokines and IL-18 Potentiates Innate and Adaptive Pathways of NK Cell Activation. *Frontiers in immunology* 7, 101.

O'Connell, G.C., Treadway, M.B., Tennant, C.S., Lucke-Wold, N., Chantler, P.D., and Barr, T.L. (2019). Shifts in Leukocyte Counts Drive the Differential Expression of Transcriptional Stroke Biomarkers in Whole Blood. *Translational stroke research* 10, 26-35.

O'Neill, L.A.J., Kishton, R.J., and Rathmell, J. (2016). A guide to immunometabolism for immunologists. *Nature Reviews Immunology* 16, 553.

O'Connell, G.C., Treadway, M.B., Petrone, A.B., Tennant, C.S., Lucke-Wold, N., Chantler, P.D., and Barr, T.L. (2017). Leukocyte Dynamics Influence Reference Gene Stability in Whole Blood: Data-Driven qRT-PCR Normalization Is a Robust Alternative for Measurement of Transcriptional Biomarkers. *Laboratory Medicine* 48, 346-356.

O'Connor, R.S., Guo, L., Ghassemi, S., Snyder, N.W., Worth, A.J., Weng, L., Kam, Y., Philipson, B., Trefely, S., Nunez-Cruz, S., *et al.* (2018). The CPT1a inhibitor, etomoxir induces severe oxidative stress at commonly used concentrations. *Scientific Reports* 8, 6289.

Orban, J.C., Deroche, D., and Ichai, C. (2006). Sepsis sévère : le contrôle glycémique. *Annales Françaises d'Anesthésie et de Réanimation* 25, 275-279.

Paganin, C., Matteucci, C., Cenzuales, S., Mantovani, A., and Allavena, P. (1994). IL-4 inhibits binding and cytotoxicity of NK cells to vascular endothelium. *Cytokine* 6, 135-140.

Pahl, J.H.W., Cerwenka, A., and Ni, J. (2018). Memory-Like NK Cells: Remembering a Previous Activation by Cytokines and NK Cell Receptors. *Frontiers in immunology* 9.

Palazon, A., Goldrath, A.W., Nizet, V., and Johnson, R.S. (2014). HIF transcription factors, inflammation, and immunity. *Immunity* 41, 518-528.

Palomino, D.C.T., and Marti, L.C. (2015). Chemokines and immunity. *Einstein (Sao Paulo, Brazil)* 13, 469-473.

Pardridge, W.M., Boado, R.J., and Farrell, C.R. (1990). Brain-type glucose transporter (GLUT-1) is selectively localized to the blood-brain barrier. Studies with quantitative western blotting and in situ hybridization. *The Journal of biological chemistry* 265, 18035-18040.

Parodi, M., Raggi, F., Cangelosi, D., Manzini, C., Balsamo, M., Blengio, F., Eva, A., Varesio, L., Pietra, G., Moretta, L., *et al.* (2018). Hypoxia Modifies the Transcriptome of Human NK Cells, Modulates Their Immunoregulatory Profile, and Influences NK Cell Subset Migration. *Frontiers in immunology* 9, 2358-2358.

Patidar, M., Yadav, N., and Dalai, S.K. (2016). Interleukin 15: A key cytokine for immunotherapy. *Cytokine Growth Factor Rev* 31, 49-59.

Patowary, A., Sarkar, M., Garg, M., Singh, M., Alam, M.P., Purkanti, R., Bargaje, R., Gupta, S., Sivasubbu, S., Ali, T., *et al.* (2012). Proximity of H2A.Z containing nucleosome to the transcription start site influences gene expression levels in the mammalian liver and brain. *Nucleic Acids Research* 40, 8965-8978.

Pearce, E.L., and Pearce, E.J. (2013). Metabolic pathways in immune cell activation and quiescence. *Immunity* 38, 633-643.

Peltan, I.D., Brown, S.M., Bledsoe, J.R., Sorensen, J., Samore, M.H., Allen, T.L., and Hough, C.L. (2019). ED Door-to-Antibiotic Time and Long-term Mortality in Sepsis. *CHEST*.

Peltan, I.D., Mitchell, K.H., Rudd, K.E., Mann, B.A., Carlbom, D.J., Hough, C.L., Rea, T.D., and Brown, S.M. (2017). Physician Variation in Time to Antimicrobial Treatment for Septic Patients Presenting to the Emergency Department. *Critical Care Medicine* 45, 1011-1018.

Perrella, M.A., Hsieh, C.M., Lee, W.S., Shieh, S., Tsai, J.C., Patterson, C., Lowenstein, C.J., Long, N.C., Haber, E., Shore, S., *et al.* (1996). Arrest of endotoxin-induced hypotension by transforming growth factor beta1. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 93, 2054-2059.

Pfeifer, C., Highton, A.J., Peine, S., Sauter, J., Schmidt, A.H., Bunders, M.J., Altfeld, M., and Körner, C. (2018). Natural Killer Cell Education Is Associated With a Distinct Glycolytic Profile. *Frontiers in immunology* 9.

Pfeiffer, T., Schuster, S., and Bonhoeffer, S. (2001). Cooperation and Competition in the Evolution of ATP-Producing Pathways. *Science* 292, 504-507.

Pierrakos, C., and Vincent, J.-L. (2010). Sepsis biomarkers: a review. *Critical Care* 14, R15.

- Poli, A., Michel, T., Thérésine, M., Andrès, E., Hentges, F., and Zimmer, J. (2009). CD56bright natural killer (NK) cells: an important NK cell subset. *Immunology* 126, 458-465.
- Rafii, S., Lyden, D., Benezra, R., Hattori, K., and Heissig, B. (2002). Vascular and haematopoietic stem cells: novel targets for anti-angiogenesis therapy? *Nature Reviews Cancer* 2, 826.
- Rathmell, J.C., Heiden, M.G.V., Harris, M.H., Frauwirth, K.A., and Thompson, C.B. (2000). In the Absence of Extrinsic Signals, Nutrient Utilization by Lymphocytes Is Insufficient to Maintain Either Cell Size or Viability. *Molecular Cell* 6, 683-692.
- Raud, B., McGuire, P.J., Jones, R.G., Sparwasser, T., and Berod, L. (2018). Fatty acid metabolism in CD8+ T cell memory: Challenging current concepts. *Immunological Reviews* 283, 213-231.
- Raulet, D.H. (2003). Roles of the NKG2D immunoreceptor and its ligands. *Nature Reviews Immunology* 3, 781.
- Raulet, D.H. (2004). Interplay of natural killer cells and their receptors with the adaptive immune response. *Nature immunology* 5, 996.
- Raulet, D.H. (2006). Missing self recognition and self tolerance of natural killer (NK) cells. *Seminars in immunology* 18, 145-150.
- Reinhard, E., Dingermann, T., Kreis, W., Nieber, K., Rimpler, H., and Zündorf, I. (2016). *Pharmazeutische Biologie : Grundlagen und Humanbiologie*, 8. völlig neu bearbeitete und erweiterte Auflage edn (Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft).
- Richards, J., McNally, B., Fang, X., Caligiuri, M.A., Zheng, P., and Liu, Y. (2008). Tumor Growth Decreases NK and B Cells as well as Common Lymphoid Progenitor. *PLOS ONE* 3, e3180.
- Robertson, M.J. (2002). Role of chemokines in the biology of natural killer cells. *J Leukoc Biol* 71, 173-183.
- Roger, P.-M., Hyvernât, H., Ticchioni, M., Kumar, G., Dellamonica, J., and Bernardin, G. (2012). The early phase of human sepsis is characterized by a combination of apoptosis and proliferation of T cells. *Journal of Critical Care* 27, 384-393.
- Romee, R., Rosario, M., Berrien-Elliott, M.M., Wagner, J.A., Jewell, B.A., Schappe, T., Leong, J.W., Abdel-Latif, S., Schneider, S.E., Willey, S., *et al.* (2016). Cytokine-induced memory-like natural killer cells exhibit enhanced responses against myeloid leukemia. *Science Translational Medicine* 8, 357ra123-357ra123.
- Romee, R., Schneider, S.E., Leong, J.W., Chase, J.M., Keppel, C.R., Sullivan, R.P., Cooper, M.A., and Fehniger, T.A. (2012). Cytokine activation induces human memory-like NK cells. *Blood* 120, 4751-4760.
- Romero, C.R., Herzig, D.S., Etogo, A., Nunez, J., Mahmoudizad, R., Fang, G., Murphey, E.D., Toliver-Kinsky, T., and Sherwood, E.R. (2010). The role of interferon-

γ in the pathogenesis of acute intra-abdominal sepsis. *Journal of Leukocyte Biology* 88, 725-735.

Rosenberg, S.A., Lotze, M.T., Muul, L.M., Chang, A.E., Avis, F.P., Leitman, S., Linehan, W.M., Robertson, C.N., Lee, R.E., Rubin, J.T., *et al.* (1987). A Progress Report on the Treatment of 157 Patients with Advanced Cancer Using Lymphokine-Activated Killer Cells and Interleukin-2 or High-Dose Interleukin-2 Alone. *New England Journal of Medicine* 316, 889-897.

S2-Leitlinie-Sepsis (2010): Langfassung der Leitlinie "Sepsis - Prävention, Diagnose, Therapie und Nachsorge". Online: <http://www.awmf.org/leitlinien/detail/ll/079-001.html>, Stand:

Sack, U. (2016). *Zelluläre Diagnostik und Therapie* (Berlin: De Gruyter).

Sack, U., Tarnok, A., and Rothe, G. (2007). *Zelluläre Diagnostik: Grundlagen, Methoden und klinische Anwendungen der Durchflusszytometrie; 163 Tabellen* (Karger Medical and Scientific Publishers).

Salzberger, W., Martrus, G., Bachmann, K., Goebels, H., Heß, L., Koch, M., Langeneckert, A., Lunemann, S., Oldhafer, K.J., Pfeifer, C., *et al.* (2018). Tissue-resident NK cells differ in their expression profile of the nutrient transporters Glut1, CD98 and CD71. *PLOS ONE* 13, e0201170.

Schall, T.J., Bacon, K., Camp, R.D., Kaspari, J.W., and Goeddel, D.V. (1993). Human macrophage inflammatory protein alpha (MIP-1 alpha) and MIP-1 beta chemokines attract distinct populations of lymphocytes. *J Exp Med* 177, 1821-1826.

Schall, T.J., Bacon, K., Toy, K.J., and Goeddel, D.V. (1990). Selective attraction of monocytes and T lymphocytes of the memory phenotype by cytokine RANTES. *Nature* 347, 669-671.

Schlüter, B., Raufhake, C., Erren, M., Schotte, H., Kipp, F., Rust, S., Van Aken, H., Assmann, G., and Berendes, E. (2002). Effect of the interleukin-6 promoter polymorphism (-174 G/C) on the incidence and outcome of sepsis. *Critical Care Medicine* 30, 32-37.

Scholzen, T., and Gerdes, J. (2000). The Ki-67 protein: From the known and the unknown. *Journal of Cellular Physiology* 182, 311-322.

Schütt, C., and Bröker, B. (2011). *Grundwissen Immunologie*, 3 edn (Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag).

Schwartz, R. (1993). Little missed markers and Ki-67. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* 68, 597.

Scicluna, B.P., Klouwenberg, P.M.C.K., Vught, L.A.v., Wiewel, M.A., Ong, D.S.Y., Zwinderman, A.H., Franitza, M., Toliat, M.R., Nürnberg, P., Hoogendijk, A.J., *et al.* (2015). A Molecular Biomarker to Diagnose Community-acquired Pneumonia on Intensive Care Unit Admission. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 192, 826-835.



Semenza, G.L. (2011). Oxygen Sensing, Homeostasis, and Disease. *New England Journal of Medicine* 365, 537-547.

Semenza, G.L. (2014). Hypoxia-Inducible Factor 1 and Cardiovascular Disease. *Annual Review of Physiology* 76, 39-56.

Sengupta, S., Peterson, T.R., and Sabatini, D.M. (2010). Regulation of the mTOR complex 1 pathway by nutrients, growth factors, and stress. *Molecular cell* 40, 310-322.

Seymour, C.W., Liu, V.X., Iwashyna, T.J., Brunkhorst, F.M., Rea, T.D., and Scherag, A. (2016). Assessment of clinical criteria for sepsis: for the third international consensus definitions for sepsis and septic shock (Sepsis-3). *JAMA* 315.

Sherry, B., Tekamp-Olson, P., Gallegos, C., Bauer, D., Davatelis, G., Wolpe, S.D., Masiarz, F., Coit, D., and Cerami, A. (1988). Resolution of the two components of macrophage inflammatory protein 1, and cloning and characterization of one of those components, macrophage inflammatory protein 1 beta. *The Journal of Experimental Medicine* 168, 2251-2259.

Shi, L., Kam, C.M., Powers, J.C., Aebersold, R., and Greenberg, A.H. (1992). Purification of three cytotoxic lymphocyte granule serine proteases that induce apoptosis through distinct substrate and target cell interactions. *The Journal of Experimental Medicine* 176, 1521-1529.

Singer, K., Cheng, W.-C., Kreutz, M., Ho, P.-C., and Siska, P.J. (2018). Immunometabolism in cancer at a glance. *Disease Models & Mechanisms* 11, dmm034272.

Singer, M. (2016). The new sepsis consensus definitions (Sepsis-3): the good, the not-so-bad, and the actually-quite-pretty. *Intensive Care Medicine* 42, 2027-2029.

Singer, M., Deutschman, C.S., Seymour, C.W., Shankar-Hari, M., Annane, D., and Bauer, M. (2016). The third international consensus definitions for sepsis and septic shock (Sepsis-3). *JAMA* 315.

Sinha, M., Jupe, J., Mack, H., Coleman, T.P., Lawrence, S.M., and Fraley, S.I. (2018). Emerging Technologies for Molecular Diagnosis of Sepsis. *Clinical Microbiology Reviews* 31, e00089-00017.

Sivina, M., Hartmann, E., Kipps, T.J., Rassenti, L., Krupnik, D., Lerner, S., LaPushin, R., Xiao, L., Huang, X., Werner, L., *et al.* (2011). CCL3 (MIP-1 $\alpha$ ) plasma levels and the risk for disease progression in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 117, 1662-1669.

Sivori, S., Falco, M., Chiesa, M.D., Carlomagno, S., Vitale, M., Moretta, L., and Moretta, A. (2004). CpG and double-stranded RNA trigger human NK cells by Toll-like receptors: Induction of cytokine release and cytotoxicity against tumors and dendritic cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101, 10116-10121.

Smyth, M.J., Cretney, E., Kelly, J.M., Westwood, J.A., Street, S.E.A., Yagita, H., Takeda, K., Dommelen, S.L.H.v., Degli-Esposti, M.A., and Hayakawa, Y. (2005). Activation of NK cell cytotoxicity. *Molecular Immunology* 42, 501-510.

Smyth, M.J., Hayakawa, Y., Takeda, K., and Yagita, H. (2002). New aspects of natural-killer-cell surveillance and therapy of cancer. *Nature Reviews Cancer* 2, 850.

Smyth, M.J., Kelly, J.M., Sutton, V.R., Davis, J.E., Browne, K.A., Sayers, T.J., and Trapani, J.A. (2001). Unlocking the secrets of cytotoxic granule proteins. *Journal of Leukocyte Biology* 70, 18-29.

Souza-Fonseca-Guimaraes, F., Cavaillon, J.M., and Adib-Conquy, M. (2013). Bench-to-bedside review: Natural killer cells in sepsis - guilty or not guilty? *Crit Care* 17, 235.

Souza-Fonseca-Guimaraes, F., Parlato, M., Philippart, F., Misset, B., Cavaillon, J.-M., Adib-Conquy, M., and group, t.C.s. (2012). Toll-like receptors expression and interferon- $\gamma$  production by NK cells in human sepsis. *Critical Care* 16, R206.

Spittler, A., Razenberger, M., Kupper, H., Kaul, M., Hackl, W., Boltz-Nitulescu, G., Függer, R., and Roth, E. (2000). Relationship Between Interleukin-6 Plasma Concentration in Patients with Sepsis, Monocyte Phenotype, Monocyte Phagocytic Properties, and Cytokine Production. *Clinical Infectious Diseases* 31, 1338-1342.

Spolarics, Z. (1996). Endotoxin stimulates gene expression of ROS-eliminating pathways in rat hepatic endothelial and Kupffer cells. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* 270, G660-G666.

Sporn, M.B., and Roberts, A.B. (1989). Transforming Growth Factor— $\beta$ : Multiple Actions and Potential Clinical Applications. *JAMA* 262, 938-941.

Staversky, R.J., Byun, D.K., Georger, M.A., Zaffuto, B.J., Goodman, A., Becker, M.W., Calvi, L.M., and Frisch, B.J. (2018). The Chemokine CCL3 Regulates Myeloid Differentiation and Hematopoietic Stem Cell Numbers. *Scientific Reports* 8, 14691.

Stegenga, M.E., Vincent, J.-L., Vail, G.M., Xie, J., Haney, D.J., Williams, M.D., Bernard, G.R., and van der Poll, T. (2010). Diabetes does not alter mortality or hemostatic and inflammatory responses in patients with severe sepsis\*. *Critical Care Medicine* 38, 539-545.

Stevens, J.R., McMillan, R.P., Resendes, J.T., Lloyd, S.K., Ali, M.M., Frisard, M.I., Hargett, S., Keller, S.R., and Hulver, M.W. (2017). Acute Low-Dose Endotoxin Treatment Results in Improved Whole-Body Glucose Homeostasis in Mice. *Metabolism: clinical and experimental* 68, 150-162.

Stevenson, E.K., Rubenstein, A.R., Radin, G.T., Wiener, R.S., and Walkey, A.J. (2014). Two Decades of Mortality Trends among Patients with Severe Sepsis: A Comparative Meta-analysis. *Critical care medicine* 42, 625-631.

Strohmeier, J.-C., Blume, C., Meisel, C., Doecke, W.-D., Hummel, M., Hoefflich, C., Thiele, K., Unbehauen, A., Hetzer, R., and Volk, H.-D. (2003). Standardized immune monitoring for the prediction of infections after cardiopulmonary bypass surgery in risk patients. *Cytometry Part B: Clinical Cytometry* 53B, 54-62.

Strowig, T., Brilot, F., and Münz, C. (2008). Noncytotoxic functions of NK cells: direct pathogen restriction and assistance to adaptive immunity. *Journal of immunology* (Baltimore, Md : 1950) *180*, 7785-7791.

Su, C.F., Yang, F.L., and Chen, H.I. (2007). INHIBITION OF INDUCIBLE NITRIC OXIDE SYNTHASE ATTENUATES ACUTE ENDOTOXIN-INDUCED LUNG INJURY IN RATS. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* *34*, 339-346.

Sun, J.C. (2016). Transcriptional Control of NK Cells. In *Natural Killer Cells*, E. Vivier, J. Di Santo, and A. Moretta, eds. (Cham: Springer International Publishing), pp. 1-36.

Sweeney, T.E., Shidham, A., Wong, H.R., and Khatri, P. (2015). A comprehensive time-course-based multicohort analysis of sepsis and sterile inflammation reveals a robust diagnostic gene set. *Science Translational Medicine* *7*, 287ra271-287ra271.

Szablewski, L. (2013). Expression of glucose transporters in cancers. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer* *1835*, 164-169.

Tak, T., van Groenendael, R., Pickkers, P., and Koenderman, L. (2017). Monocyte Subsets Are Differentially Lost from the Circulation during Acute Inflammation Induced by Human Experimental Endotoxemia. *Journal of Innate Immunity* *9*, 464-474.

Taub, D.D., Sayers, T.J., Carter, C.R., and Ortaldo, J.R. (1995). Alpha and beta chemokines induce NK cell migration and enhance NK-mediated cytotoxicity. *J Immunol* *155*, 3877-3888.

Thangavelu, K., Pan, C.Q., Karlberg, T., Balaji, G., Uttamchandani, M., Suresh, V., Schüler, H., Low, B.C., and Sivaraman, J. (2012). Structural basis for the allosteric inhibitory mechanism of human kidney-type glutaminase (KGA) and its regulation by Raf-Mek-Erk signaling in cancer cell metabolism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *109*, 7705-7710.

Thomas, A.G., Rojas, C., Tanega, C., Shen, M., Simeonov, A., Boxer, M.B., Auld, D.S., Ferraris, D.V., Tsukamoto, T., and Slusher, B.S. (2013). Kinetic characterization of ebselen, chelerythrine and apomorphine as glutaminase inhibitors. *Biochemical and biophysical research communications* *438*, 243-248.

Trambas, C.M., and Griffiths, G.M. (2003). Delivering the kiss of death. *Nature immunology* *4*, 399.

Trapani, J.A., Browne, K.A., Smyth, M.J., and Jans, D.A. (1996). Localization of Granzyme B in the Nucleus: A PUTATIVE ROLE IN THE MECHANISM OF CYTOTOXIC LYMPHOCYTE-MEDIATED APOPTOSIS (\*). *Journal of Biological Chemistry* *271*, 4127-4133.

Trapani, J.A., Davis, J., Sutton, V.R., and Smyth, M.J. (2000). Proapoptotic functions of cytotoxic lymphocyte granule constituents in vitro and in vivo. *Current Opinion in Immunology* *12*, 323-329.

Trapani, J.A., and Smyth, M.J. (2002). Functional significance of the perforin/granzyme cell death pathway. *Nature Reviews Immunology* *2*, 735.

Trifilo, M.J., Bergmann, C.C., Kuziel, W.A., and Lane, T.E. (2003). CC Chemokine Ligand 3 (CCL3) Regulates CD8(+)-T-Cell Effector Function and Migration following Viral Infection. *Journal of Virology* 77, 4004-4014.

Trinchieri, G. (1989). Biology of natural killer cells. *Adv Immunol* 47.

Trinchieri, G. (2003). Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol* 3, 133-146.

Tymf, K., Wang, X., Lidington, D., and Ouellette, Y. (2001). Lipopolysaccharide reduces intercellular coupling in vitro and arteriolar conducted response in vivo. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* 281, H1397-H1406.

van Engelen, T.S.R., Wiersinga, W.J., Scicluna, B.P., and van der Poll, T. (2018). Biomarkers in Sepsis. *Critical Care Clinics* 34, 139-152.

van Vught, L.A., Klein Klouwenberg, P.C., Spitoni, C., and et al. (2016a). Incidence, risk factors, and attributable mortality of secondary infections in the intensive care unit after admission for sepsis. *JAMA* 315, 1469-1479.

van Vught, L.A., Wiewel, M.A., Klein Klouwenberg, P.M.C., Hoogendijk, A.J., Scicluna, B.P., Ong, D.S.Y., Cremer, O.L., Horn, J., Bonten, M.M.J., Schultz, M.J., et al. (2016b). Admission Hyperglycemia in Critically Ill Sepsis Patients: Association With Outcome and Host Response\*. *Critical Care Medicine* 44, 1338-1346.

Vander Heiden, M.G., Cantley, L.C., and Thompson, C.B. (2009). Understanding the Warburg Effect: The Metabolic Requirements of Cell Proliferation. *Science* 324, 1029-1033.

Vary, T.C., Drnevich, D., Jurasinski, C., and Brennan, W.A., Jr. (1995). Mechanisms regulating skeletal muscle glucose metabolism in sepsis. *Shock* 3, 403-410.

Vasques-Nóvoa, F., Laundos, T.L., Cerqueira, R.J., Quina-Rodrigues, C., Soares-dos-Reis, R., Baganha, F., Ribeiro, S., Mendonça, L., Gonçalves, F., Reguenga, C., et al. (2018). MicroRNA-155 Amplifies Nitric Oxide/cGMP Signaling and Impairs Vascular Angiotensin II Reactivity in Septic Shock. *Critical Care Medicine* 46, e945-e954.

Velasquez, S.Y., Killian, D., Schulte, J., Sticht, C., Thiel, M., and Lindner, H.A. (2016). Short-term hypoxia synergizes with interleukin 15 priming in driving glycolytic gene transcription and supports human natural killer cell activities. *The Journal of biological chemistry*.

Viel, S., Marçais, A., Guimaraes, F.S.-F., Loftus, R., Rabilloud, J., Grau, M., Degouve, S., Djebali, S., Sanlaville, A., Charrier, E., et al. (2016). TGF- $\beta$  inhibits the activation and functions of NK cells by repressing the mTOR pathway. *Science Signaling* 9, ra19-ra19.

Vincent, J.L., Moreno, R., Takala, J., Willatts, S., De Mendonca, A., Bruining, H., Reinhart, C.K., Suter, P.M., and Thijs, L.G. (1996). The SOFA (Sepsis-related Organ Failure Assessment) score to describe organ dysfunction/failure. On behalf of the Working Group on Sepsis-Related Problems of the European Society of Intensive Care Medicine. *Intensive Care Med* 22, 707-710.

- Vivier, E., Raulet, D.H., Moretta, A., Caligiuri, M.A., Zitvogel, L., Lanier, L.L., Yokoyama, W.M., and Ugolini, S. (2011). Innate or Adaptive Immunity? The Example of Natural Killer Cells. *Science* (New York, NY) *331*, 44-49.
- Vivier, E., Tomasello, E., Baratin, M., Walzer, T., and Ugolini, S. (2008). Functions of natural killer cells. *Nature immunology* *9*, 503.
- Vossen, M.T.M., Matmati, M., Hertoghs, K.M.L., Baars, P.A., Gent, M.-R., Leclercq, G., Hamann, J., Kuijpers, T.W., and van Lier, R.A.W. (2008). CD27 Defines Phenotypically and Functionally Different Human NK Cell Subsets. *The Journal of Immunology* *180*, 3739-3745.
- Walsh, D.S., Thavichaigarn, P., Pattanapanyasat, K., Siritongtaworn, P., Kongcharoen, P., Tongtawe, P., Yongvanitchit, K., Jiarakul, N., Dheeradhada, C., Pearce, F.J., *et al.* (2005). Characterization of Circulating Monocytes Expressing HLA-DR or CD71 and Related Soluble Factors for 2 Weeks after Severe, Non-Thermal Injury<sup>1,2</sup>. *Journal of Surgical Research* *129*, 221-230.
- Walzer, T., Dalod, M., Robbins, S.H., Zitvogel, L., and Vivier, E. (2005). Natural-killer cells and dendritic cells: "l'union fait la force". *Blood* *106*, 2252-2258.
- Wan, Y.Y., and Flavell, R.A. (2008). TGF- $\beta$  and Regulatory T Cell in Immunity and Autoimmunity. *Journal of Clinical Immunology* *28*, 647-659.
- Wang, D., Wang, Q., Yan, G., Qiao, Y., Zhu, B., Liu, B., and Tang, C. (2018). Hypoxia induces lactate secretion and glycolytic efflux by downregulating mitochondrial pyruvate carrier levels in human umbilical vein endothelial cells. *Mol Med Rep* *18*, 1710-1717.
- Wang, J., and Pantopoulos, K. (2011). Regulation of cellular iron metabolism. *Biochemical Journal* *434*, 365-381.
- Wang, L., and Hoffman, R.A. (2017). Standardization, Calibration, and Control in Flow Cytometry. *Current Protocols in Cytometry* *79*, 1.3.1-1.3.27.
- Wang, T., Marquardt, C., and Foker, J. (1976). Aerobic glycolysis during lymphocyte proliferation. *Nature* *261*, 702.
- Warburg, O., Wind, F., and Negelein, E. (1927). The metabolism of tumors in the body. *J Gen Physiol* *8*.
- Watford, W.T., Moriguchi, M., Morinobu, A., and O'Shea, J.J. (2003). The biology of IL-12: coordinating innate and adaptive immune responses. *Cytokine Growth Factor Rev* *14*, 361-368.
- Watzl, C. (2003). The NKG2D receptor and its ligands—recognition beyond the "missing self"? *Microbes and Infection* *5*, 31-37.
- Wawrocki, S., Druszczynska, M., Kowalewicz-Kulbat, M., and Rudnicka, W. (2016). Interleukin 18 (IL-18) as a target for immune intervention. *Acta Biochim Pol* *63*, 59-63.

- Weiss, I.D., Shoham, H., Wald, O., Wald, H., Beider, K., Abraham, M., Barashi, N., Galun, E., Nagler, A., and Peled, A. (2011). Ccr5 deficiency regulates the proliferation and trafficking of natural killer cells under physiological conditions. *Cytokine* 54, 249-257.
- Wernly, B., Lichtenauer, M., Hoppe, U.C., and Jung, C. (2016). Hyperglycemia in septic patients: an essential stress survival response in all, a robust marker for risk stratification in some, to be messed with in none. *Journal of Thoracic Disease* 8, E621-E624.
- Whiles, B.B., Deis, A.S., and Simpson, S.Q. (2017). Increased Time to Initial Antimicrobial Administration Is Associated With Progression to Septic Shock in Severe Sepsis Patients. *Critical Care Medicine* 45, 623-629.
- Winkler, M.S., Kluge, S., Holzmann, M., Moritz, E., Robbe, L., Bauer, A., Zahrte, C., Priefler, M., Schwedhelm, E., Böger, R.H., *et al.* (2017). Markers of nitric oxide are associated with sepsis severity: an observational study. *Critical Care* 21, 189.
- Wu, F., Tyml, K., and Wilson, J.X. (2008). iNOS expression requires NADPH oxidase-dependent redox signaling in microvascular endothelial cells. *Journal of Cellular Physiology* 217, 207-214.
- Yagita, H., Takeda, K., Kobayashi, K., Okumura, K., Van Kaer, L., Atsuta, M., Ito, M., Hong, S., and Hayakawa, Y. (2000). Relative contribution of NK and NKT cells to the anti-metastatic activities of IL-12. *International Immunology* 12, 909-914.
- Yokoyama, W.M., Kim, S., and French, A.R. (2004). The Dynamic Life of Natural Killer Cells. *Annual review of immunology* 22, 405-429.
- Yu, J., Wei, M., Becknell, B., Trotta, R., Liu, S., Boyd, Z., Jaung, M.S., Blaser, B.W., Sun, J., Benson, D.M., Jr., *et al.* (2006). Pro- and Antiinflammatory Cytokine Signaling: Reciprocal Antagonism Regulates Interferon-gamma Production by Human Natural Killer Cells. *Immunity* 24, 575-590.
- Zanotti, S., Kumar, A., and Kumar, A. (2002). Cytokine modulation in sepsis and septic shock. *Expert Opinion on Investigational Drugs* 11, 1061-1075.
- Zhang, J.-M., and An, J. (2007). Cytokines, Inflammation and Pain. *International anesthesiology clinics* 45, 27-37.
- Zhang, Q.-F., Yin, W.-W., Xia, Y., Yi, Y.-Y., He, Q.-F., Wang, X., Ren, H., and Zhang, D.-Z. (2016). Liver-infiltrating CD11b-CD27- NK subsets account for NK-cell dysfunction in patients with hepatocellular carcinoma and are associated with tumor progression. *Cellular And Molecular Immunology* 14, 819.
- Zhao, E., Xu, H., Wang, L., Kryczek, I., Wu, K., Hu, Y., Wang, G., and Zou, W. (2012). Bone marrow and the control of immunity. *Cellular & molecular immunology* 9, 11-19.
- Blazar, B.A., Rodrick, M.L., O'Mahony, J.B., Wood, J.J., Bessey, P.Q., Wilmore, D.W., and Mannick, J.A. (1986). Suppression of natural killer-cell function in humans following thermal and traumatic injury. *Journal of Clinical Immunology* 6, 26-36.

- Bone, R.C., Balk, R.A., Cerra, F.B., Dellinger, R.P., Fein, A.M., Knaus, W.A., Schein, R.M., and Sibbald, W.J. (1992). Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine. *Chest* 101, 1644-1655.
- Klimpel, G., Herndon, D., Fons, M., Albrecht, T., Asuncion, M., Chin, R., and Stein, M. (1986). Defective NK cell activity following thermal injury. *Clinical and experimental immunology* 66, 384.
- Levy, M.M., Fink, M.P., Marshall, J.C., Abraham, E., Angus, D., and Cook, D. (2003). 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference. *Intensive Care Med* 29.
- Rhee, C., Jones, T.M., Hamad, Y., Pande, A., Varon, J., O'Brien, C., Anderson, D.J., Warren, D.K., Dantes, R.B., Epstein, L., *et al.* (2019). Prevalence, Underlying Causes, and Preventability of Sepsis-Associated Mortality in US Acute Care Hospitals. *JAMA Network Open* 2, e187571-e187571.
- Singer, M., Deutschman, C.S., Seymour, C.W., Shankar-Hari, M., Annane, D., and Bauer, M. (2016). The third international consensus definitions for sepsis and septic shock (Sepsis-3). *JAMA* 315.
- Zhdanov, A.V., Okkelman, I.A., Collins, F.W.J., Melgar, S., and Papkovsky, D.B. (2015). A novel effect of DMOG on cell metabolism: direct inhibition of mitochondrial function precedes HIF target gene expression. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 1847, 1254-1266.
- Zinman, B., Wanner, C., Lachin, J.M., Fitchett, D., Bluhmki, E., Hantel, S., Mattheus, M., Devins, T., Johansen, O.E., Woerle, H.J., *et al.* (2015). Empagliflozin, Cardiovascular Outcomes, and Mortality in Type 2 Diabetes. *New England Journal of Medicine* 373, 2117-2128.
- Zou, C., Wang, Y., and Shen, Z. (2005). 2-NBDG as a fluorescent indicator for direct glucose uptake measurement. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 64, 207-215.
- Zwirner, N.W., and Ziblat, A. (2017). Regulation of NK Cell Activation and Effector Functions by the IL-12 Family of Cytokines: The Case of IL-27. *Frontiers in immunology* 8, 25-25.

9 TABELLARISCHER ANHANG

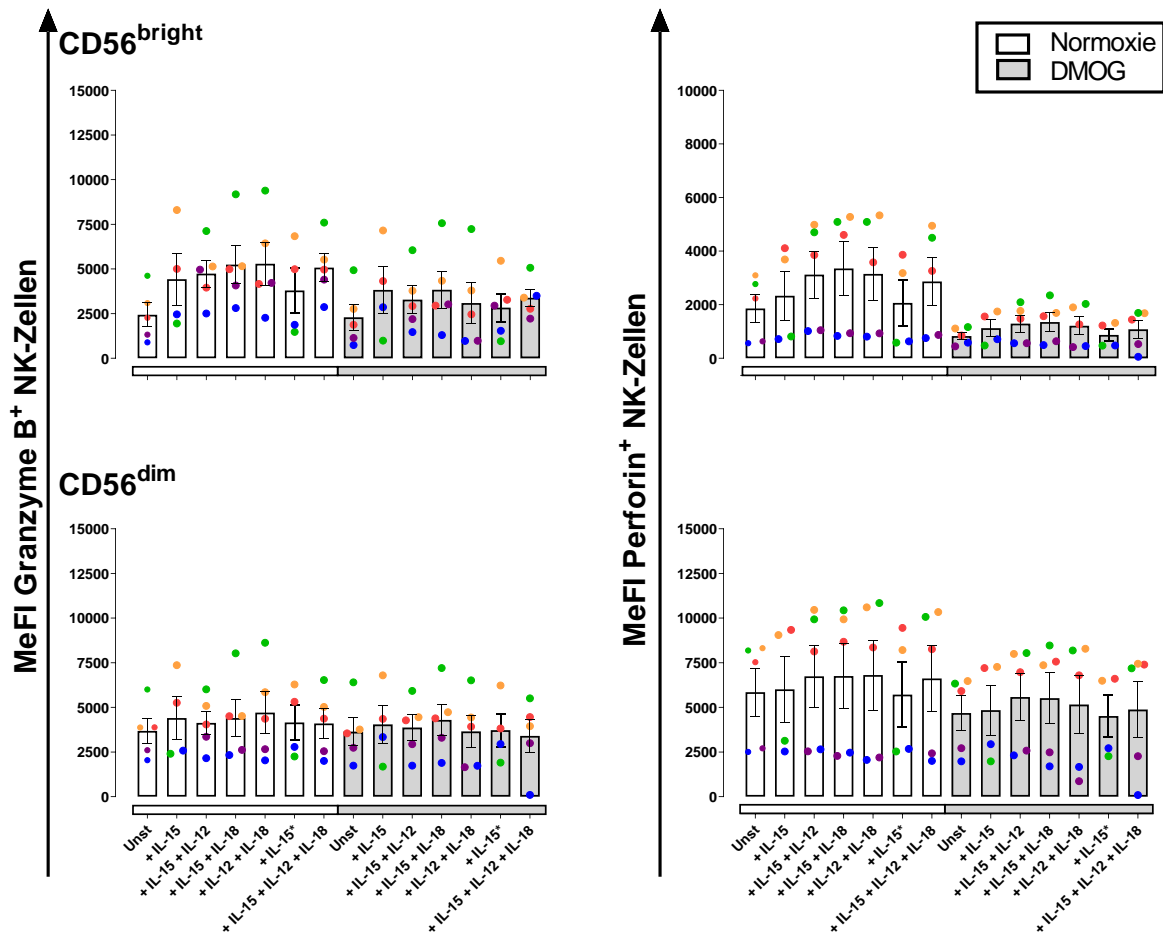


Abbildung 43: Anzahl der Granzyme B und Perforin Moleküle pro NK-Zelle unter Normoxie und DMOG-Behandlung.

Das Experiment ist unter Normoxie und DMOG mit gleichen Stimulationsbedingungen durchgeführt worden (n=6). Hierfür sind NK-Zellen präkonditioniert und anschließend für 10h alleine oder sequenziell stimuliert worden. Eine Ausnahme hiervon bildet +IL-15\*, diese Zellen sind für 6h mit IL-15 inkubiert. **(CD56<sup>bright</sup>)** MeFI von Granzyme B und Perforin Molekülen pro CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen. **(CD56<sup>dim</sup>)** MeFI von Granzyme B und Perforin Molekülen pro NK-Zellen. Die statistischen Auswertungen erfolgen mittels Kruskal-Wallis-Test. Für signifikante Veränderungen zwischen Normoxie und DMOG gilt \*p < 0,05; \*\*p < 0,01.



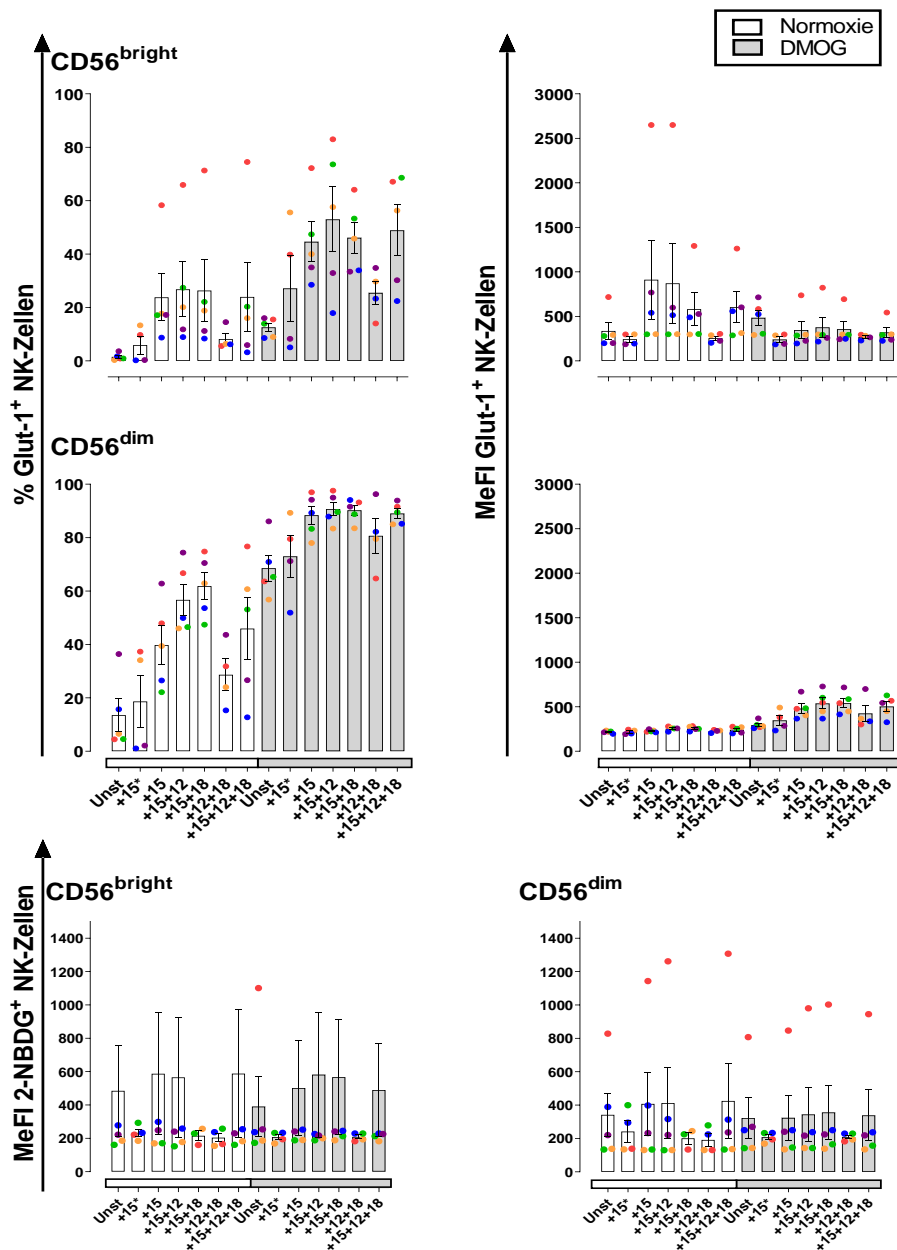


Abbildung 44: Frequenz und MeFI Glut-1<sup>+</sup> NK-Zellen unter Normoxie und DMOG.

Der Versuch ist unter Normoxie und DMOG mit gleichen Stimulationsbedingungen durchgeführt worden (n=5). Die NK-Zellen sind präkonditioniert und anschließend für 10h alleine oder sequenziell stimuliert worden. Eine Ausnahme hiervon bildet +IL-15\*, diese sind für 6h mit IL-15 inkubiert. (**CD56<sup>bright</sup>**) Prozentuale Anteile der Glut-1<sup>+</sup> CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen und deren MeFI sowie 2-NBDG MeFI pro CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen. (**CD56<sup>dim</sup>**) Prozentuale Anteile der Glut-1<sup>+</sup> CD56<sup>dim</sup> NK-Zellen und deren MeFI sowie 2-NBDG MeFI. Die statistischen Auswertungen erfolgen anhand des Kruskal-Kruskal-Wallis-Tests. Für signifikante Veränderungen zwischen Normoxie und DMOG gilt \*p < 0,05; \*\*p < 0,01.

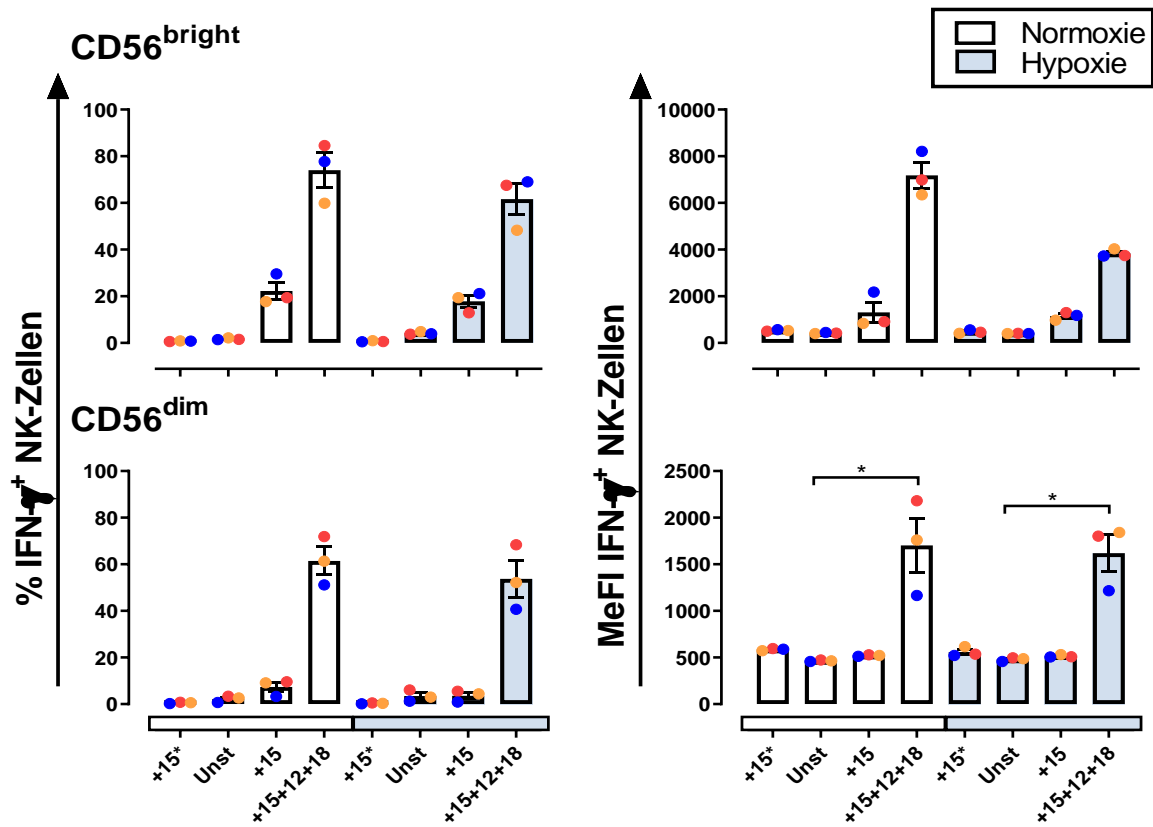


Abbildung 45: Frequenz und MeFI der IFN- $\gamma$  produzier-enden NK-Zellen unter Normoxie und Hypoxie. Der Versuch ist unter Normoxie und Hypoxie mit gleichen Stimulationsbedingungen durchgeführt worden (n=3). Die NK-Zellen sind präkonditioniert und anschließend für 10h alleine oder sequenziell stimuliert worden. Eine Ausnahme hiervon bildet +IL-15\*, diese sind für 6h mit IL-15 inkubiert. **(CD56<sup>bright</sup>)** Prozentuale Anteile der IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen und deren MeFI. **(CD56<sup>dim</sup>)** Prozentuale Anteile der IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> CD56<sup>dim</sup> NK-Zellen und deren MeFI. Die statistischen Auswertungen erfolgt mittels des Kruskal-Wallis-Tests. Für signifikante Veränderungen zwischen Normoxie und DMOG gilt \*p < 0,05.

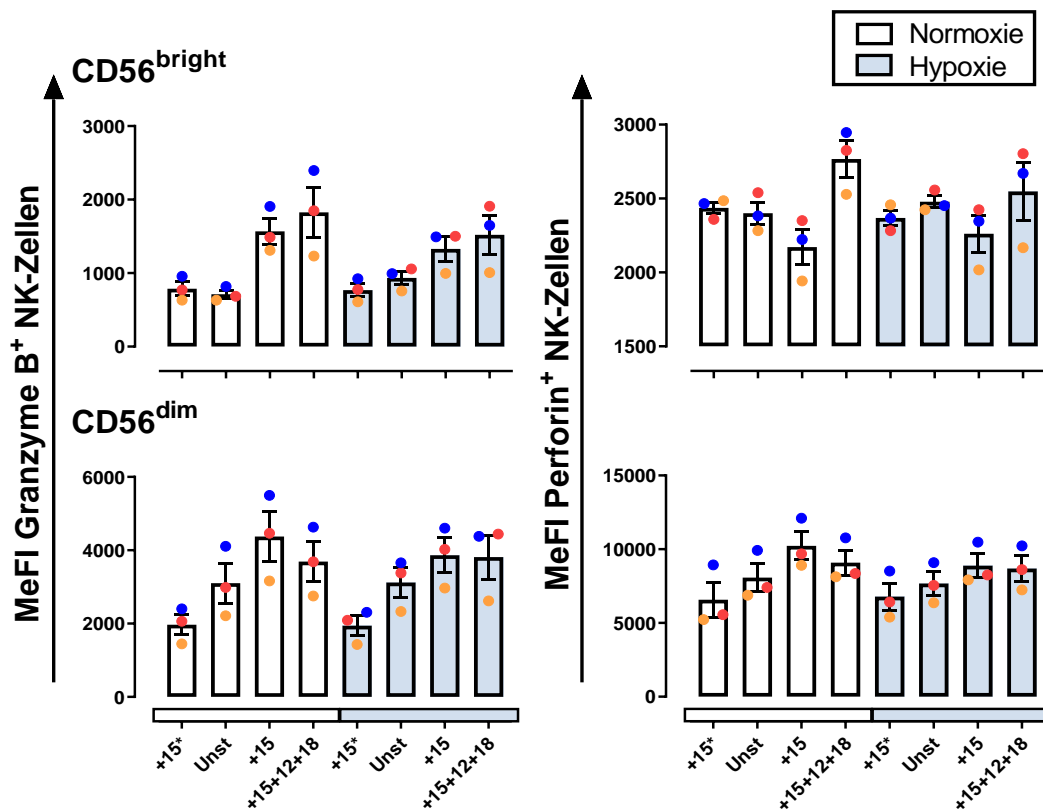


Abbildung 46: Anzahl der Granzyme B und Perforin Moleküle pro NK-Zelle unter Normoxie und Hypoxie. Das Experiment ist unter Normoxie und Hypoxie mit gleichen Stimulationsbedingungen durchgeführt worden (n=3). Hierfür sind NK-Zellen präkonditioniert und anschließend für 10h alleine oder sequenziell stimuliert worden. Eine Ausnahme hiervon bildet +IL-15\*, diese Zellen sind für 6h mit IL-15 inkubiert. **(CD56<sup>bright</sup>)** MeFI von Granzyme B und Perforin pro CD56<sup>bright</sup> NK-Zelle. **(CD56<sup>dim</sup>)** MeFI von Granzyme B und Perforin pro CD56<sup>dim</sup> NK-Zelle. Für signifikante Veränderungen zwischen Normoxie und DMOG wurde der Kruskal-Wallis-Test verwendet.

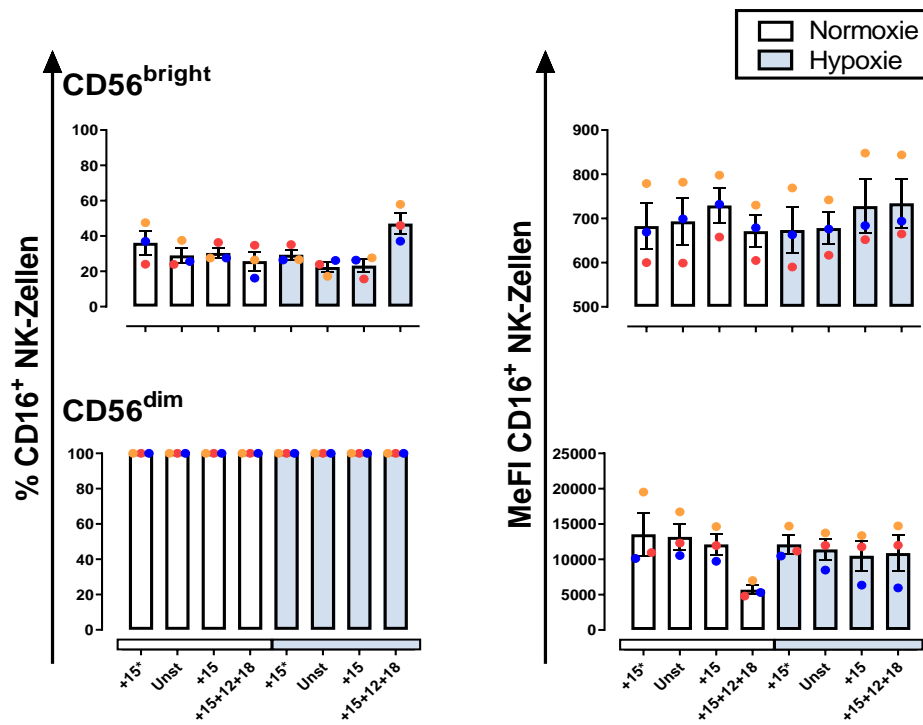


Abbildung 47: Frequenz und MeFI von CD16 auf NK-Zellen unter Normoxie und Hypoxie.

Der Versuch ist unter Normoxie und physiologischer Hypoxie mit identischen Stimulationsbedingungen durchgeführt worden (n=3). Hierfür sind NK-Zellen präkonditioniert und anschließend für 10h alleine oder sequenziell stimuliert worden. Eine Ausnahme bildet hierzu +IL-15\*, diese sind für lediglich 6h mit IL-15 inkubiert. **(CD56<sup>bright</sup>)** Anzahl an CD16<sup>+</sup> Moleküle pro NK-Zelle sowie deren MeFI. **(CD56<sup>dim</sup>)** Anzahl an CD16<sup>+</sup> Moleküle pro NK-Zelle sowie deren MeFI. Die statistischen Auswertungen erfolgt mittels Kruskal-Wallis-Test. Für signifikante Veränderungen zwischen Normoxie und Hypoxie gilt \*p < 0,05.

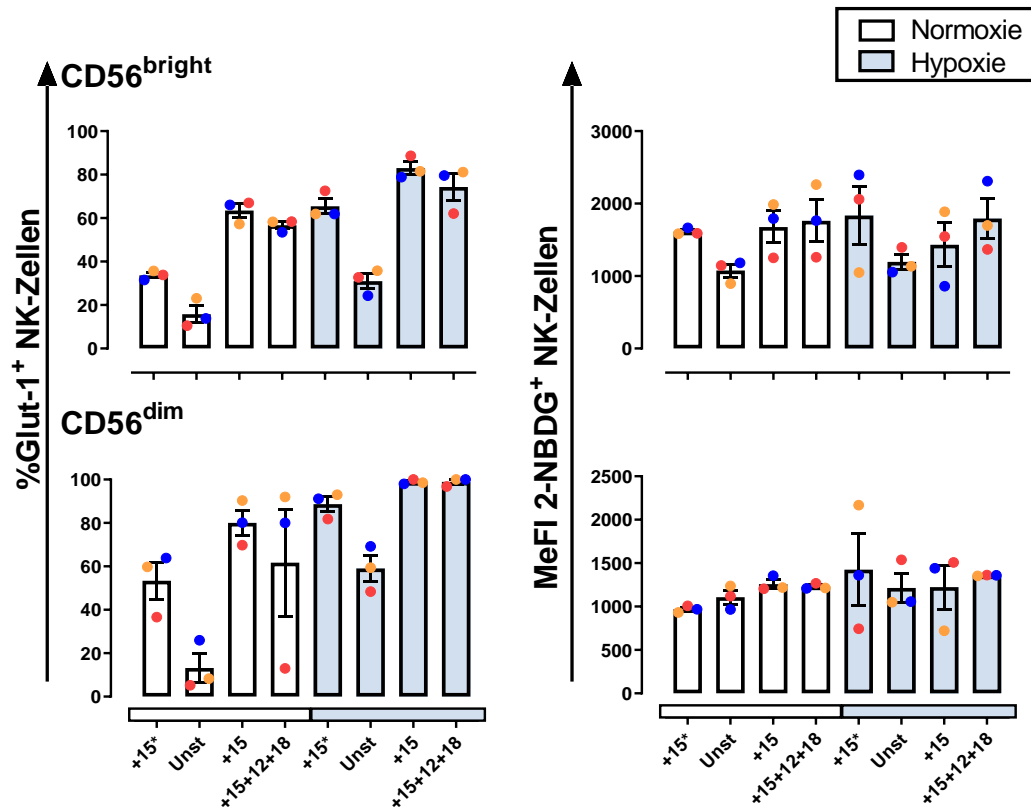


Abbildung 48: Expression von Glut-1 sowie Fluoreszenzintensitäten von 2-NBDG unter Normoxie und Hypoxie.

Der Versuch ist unter Normoxie und Hypoxie mit gleichen Stimulationsbedingungen durchgeführt worden (n=3). Die NK-Zellen sind präkonditioniert und anschließend für zehn Stunden alleine oder sequentiell stimuliert worden. Eine Ausnahme hiervon bildet +IL-15\*. Diese sind für sechs Stunden mit IL-15 inkubiert. (**CD56<sup>bright</sup>**) Prozentuale Anteile der Glut-1<sup>+</sup> CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen und die 2-NBDG MeFI. (**CD56<sup>dim</sup>**) Prozentuale Anteile der Glut-1<sup>+</sup> CD56<sup>dim</sup> NK-Zellen und die 2-NBDG MeFI. Die statistische Auswertung erfolgt mittels Kruskal-Wallis-Test.

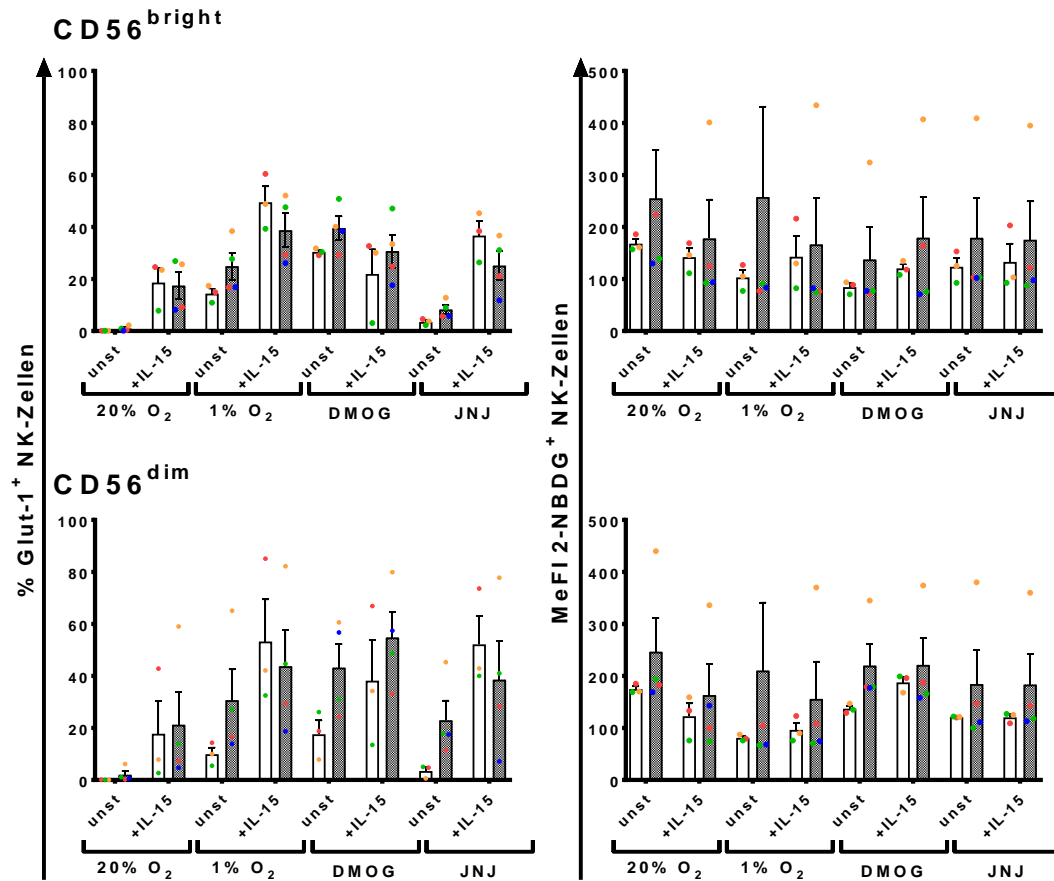


Abbildung 49: Frequenz der Glut-1 Expression und 2-NBDG Expression pro Zelle während des Kontakts mit Zielzellen.

Der Versuch ist unter Normoxie, Hypoxie, DMOG und JNJ mit gleichen IL-15 Priming durchgeführt worden (n=4). Die NK-Zellen sind präkonditioniert und anschließend für 6h mit IL-15 geprimt worden. Als Referenz werden NK-Zellen ohne Stimulation verwendet. Nach dem Priming sind sie für die finalen vier Stunden mit K-652 Zielzellen beigemischt worden. (**CD56<sup>bright</sup>**) Prozentuale Anteile der Glut-1<sup>+</sup> CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen und die 2-NBDG MeFI (**CD56<sup>dim</sup>**) Prozentuale Anteile der Glut-1<sup>+</sup> CD56<sup>dim</sup> NK-Zellen und die 2-NBDG MeFI. Die statistische Analyse erfolgt mittels TWO-Way ANOVA.

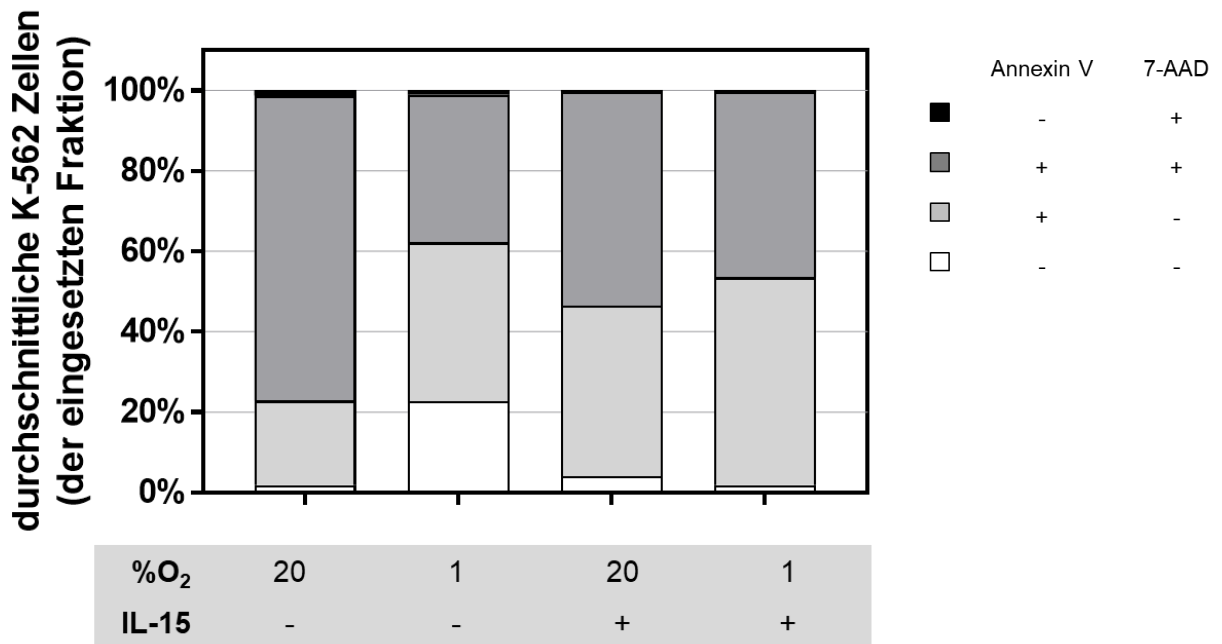


Abbildung 50: Effekte der Hypoxie und IL-15 Priming während NK-Zell Konditionierung auf Stadien der K-652 Zell Apoptose.

Effektor NK-Zellen isoliert aus Buffy Coats wurden bei 20% oder 1% O<sub>2</sub> für 22h mit oder ohne IL-15 (während der finalen sechs Stunden) präkultiviert, danach mit K-652 Zielzellen vermischt und für weitere vier Stunden unter normoxischen Standardkultur Konditionen co-inkubiert. Das Verhältnis zwischen Effektor NK-Zellen und K-652 Zellen beträgt 12,5:1. Stadien der Apoptose wurden durchflusszytometrisch mit Annexin-V-APC und 7-AAD bestimmt. Das Diagramm fasst die mediane der Umverteilung zwischen den Apoptosestadien der Zielzellen zusammen. Dabei sind lebende Zellen (Annexin-V<sup>-</sup> 7-AAD<sup>-</sup>), frühapoptotische (Annexin-V<sup>+</sup> 7-AAD<sup>-</sup>), spätapoptotische (Annexin-V<sup>+</sup> 7-AAD<sup>+</sup>) und nekrotische (Annexin-V<sup>-</sup> 7-AAD<sup>+</sup>) Zielzellen.

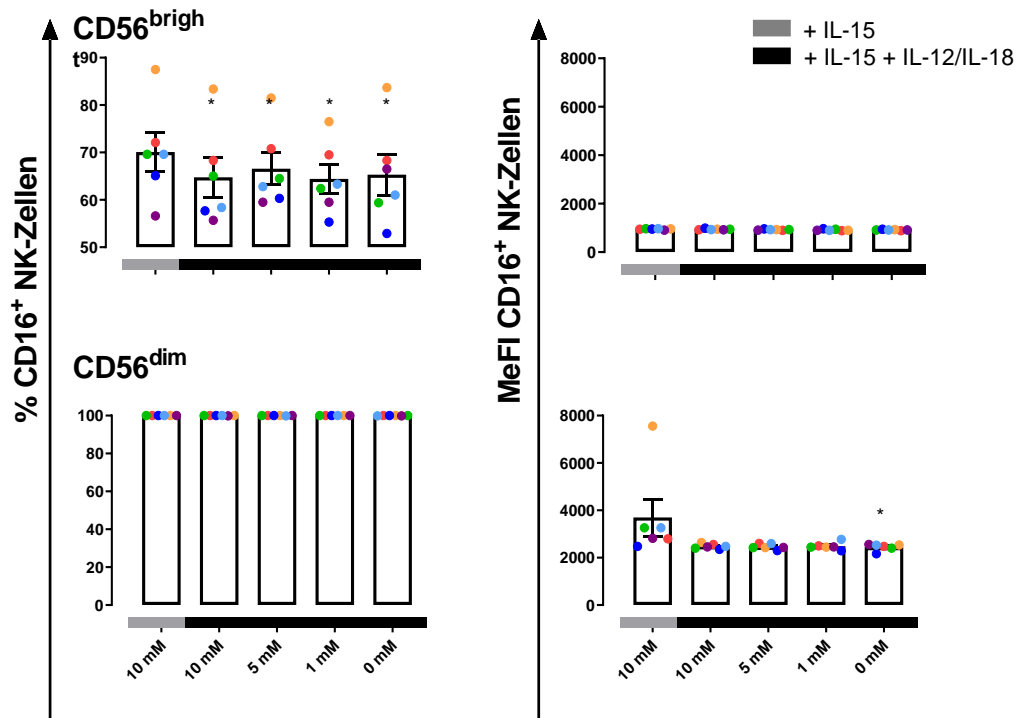


Abbildung 51: Frequenz und MeFI von CD16 auf NK-Zellen unter Normoxie während des Glukoseentzug.

Der Versuch wird unter Normoxie (n=6). Hierfür werden NK-Zellen präkonditioniert und anschließend für 10h alleine oder sequenziell stimuliert (4h). Nach dem Priming ist für die finalen vier Stunden die Glukose entzogen worden. (**CD56<sup>bright</sup>**) CD16<sup>+</sup> MeFI sowie die Frequenz der CD16<sup>+</sup> CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen. (**CD56<sup>dim</sup>**) CD16<sup>+</sup> MeFI sowie die Frequenz der CD16<sup>+</sup> CD56<sup>dim</sup> NK-Zellen. Die statistischen Auswertungen erfolgten mittels Kruskal-Wallis-Test, dabei gilt \*p < 0,05.



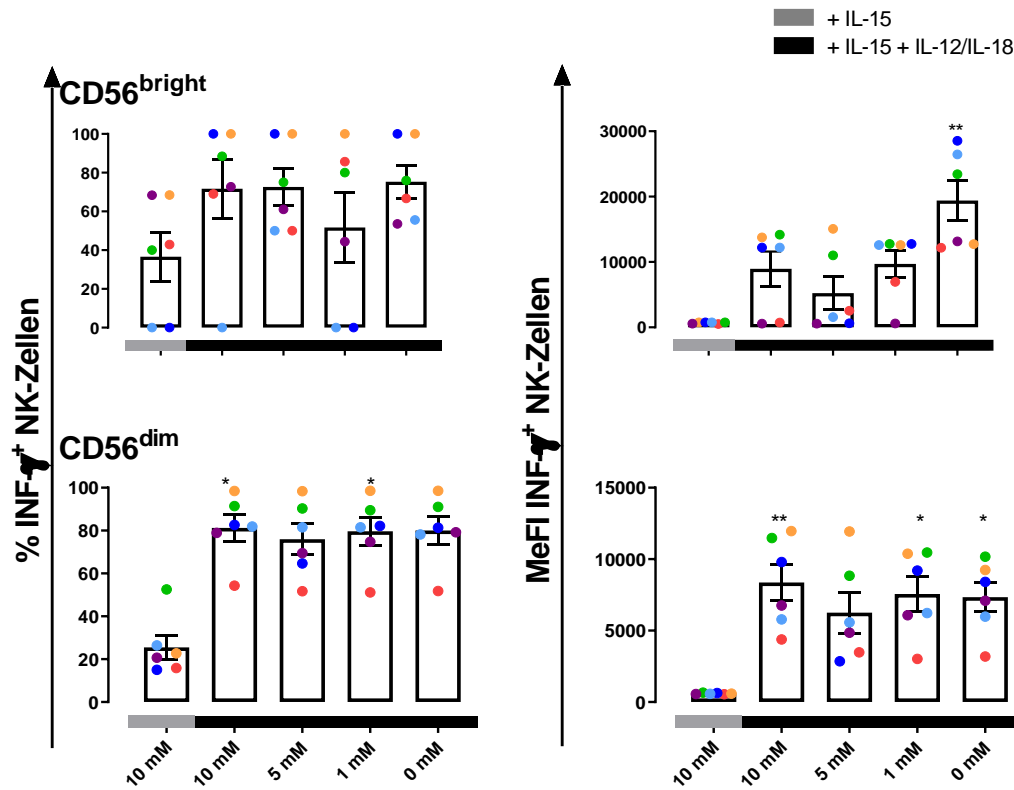


Abbildung 52: Frequenz und MeFI der IFN- $\gamma$  produzierenden NK-Zellen unter Glukoseentzug.

Der Versuch wird unter Normoxie (n=6). Hierfür werden NK-Zellen präkonditioniert und anschließend für 10h alleine oder sequenziell stimuliert (4h). Nach dem Priming ist für die finalen vier Stunden die Glukose entzogen worden. (**CD56<sup>bright</sup>**) Prozentuale Anteile der IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen und deren IFN- $\gamma$  MeFI. (**CD56<sup>dim</sup>**) Prozentuale Anteile der IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> CD56<sup>dim</sup> NK-Zellen und deren IFN- $\gamma$  MeFI. Die statistischen Auswertungen erfolgt mittels Kruskal-Wallis-Test, dabei gilt \*p < 0,05; \*\*p < 0,01.

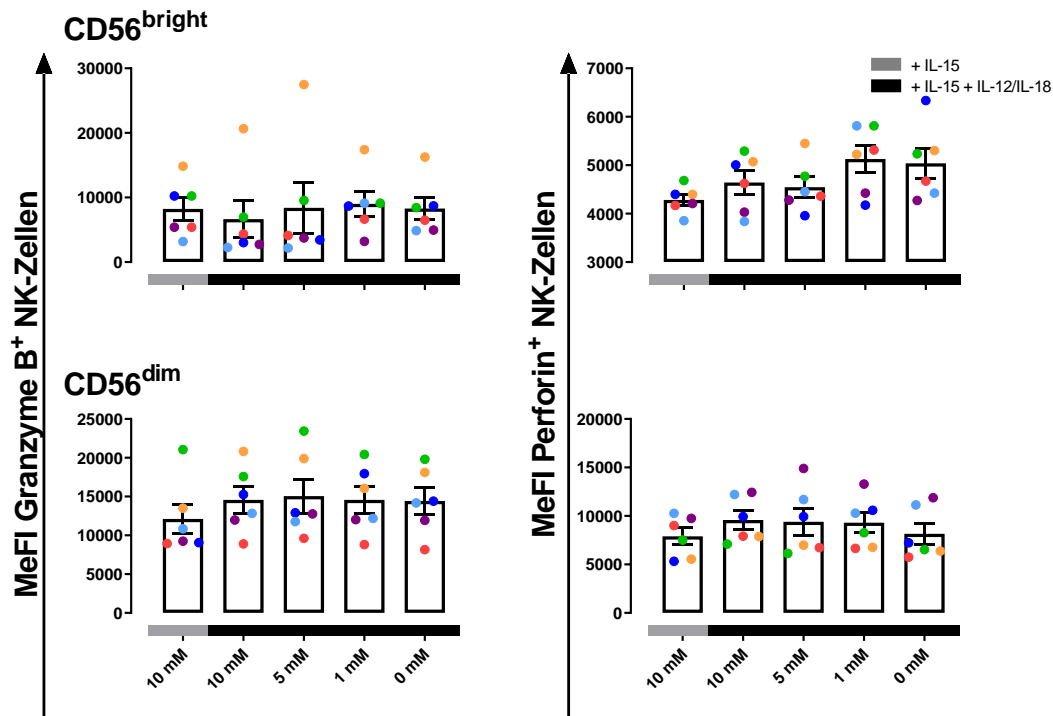


Abbildung 53: Anzahl der Granzyme B und Perforin MeFI der NK-Zellen unter Glukoseentzug.

Der Versuch wird unter Normoxie (n=6). Hierfür werden NK-Zellen präkonditioniert und anschließend für 10h alleine oder sequenziell stimuliert (4h). Nach dem Priming ist für die finalen vier Stunden die Glukose entzogen worden. (**CD56<sup>bright</sup>**) MeFI von Granzyme B und Perforin Molekülen pro CD56<sup>bright</sup> NK-Zelle. (**CD56<sup>dim</sup>**) MeFI Granzyme B und Perforin Molekülen pro CD56<sup>dim</sup> NK-Zelle. Die statistischen Auswertungen erfolgten mittels Kruskal-Wallis-Test.

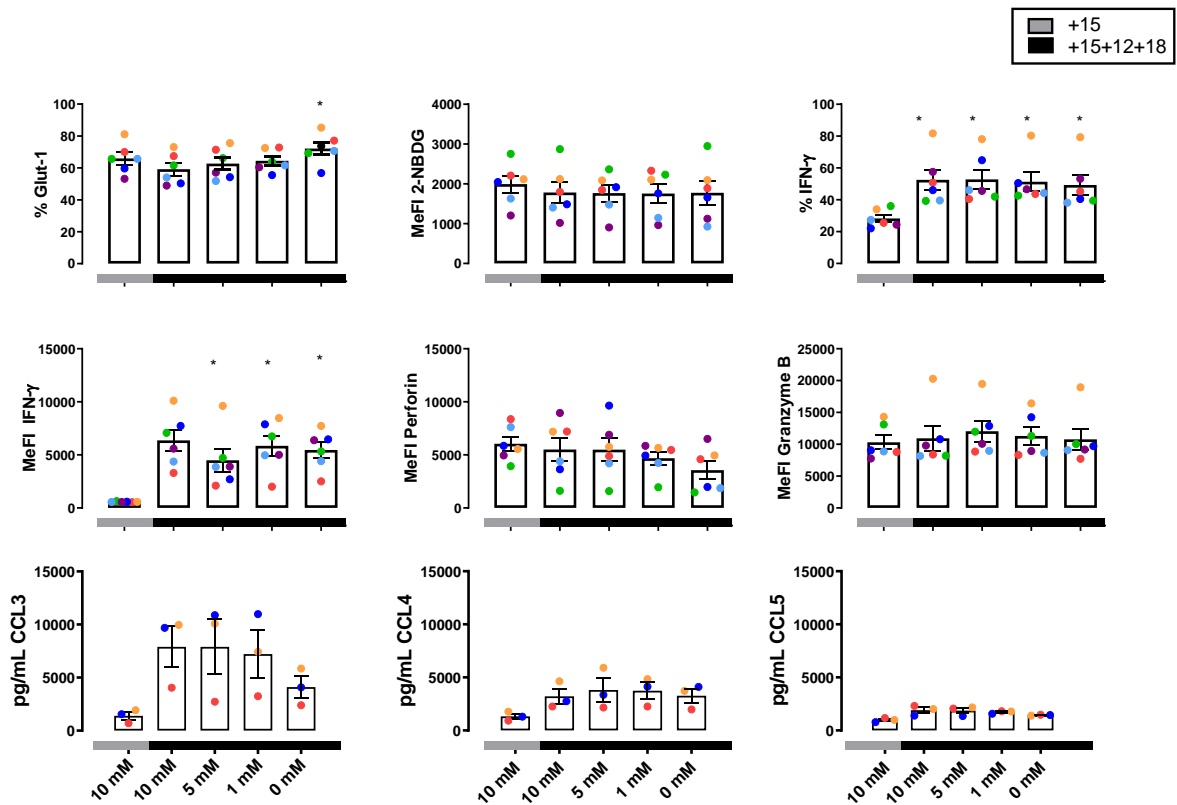


Abbildung 54: Analyse der Effektormoleküle, Glukoseaufnahme und Chemokinsekretion unter Langzeitstimulation.

Bestimmung erfolgt mittels Durchflusszytometrie für Glut-1, 2-NBDG, IFN- $\gamma$ , Perforin und Granzyme B sowie mittels Magnetic-Bead-Array für CCL3, CCL4 und CCL5. Der Versuch wird unter Normoxie (n=6). Hierfür werden NK-Zellen alleine oder sequenziell stimuliert (120h). Nach dem Priming ist für die finalen vier Stunden die Glukose entzogen worden. Die statistischen Auswertungen erfolgten mittels Kruskal-Wallis-Test, \*p<0,05.

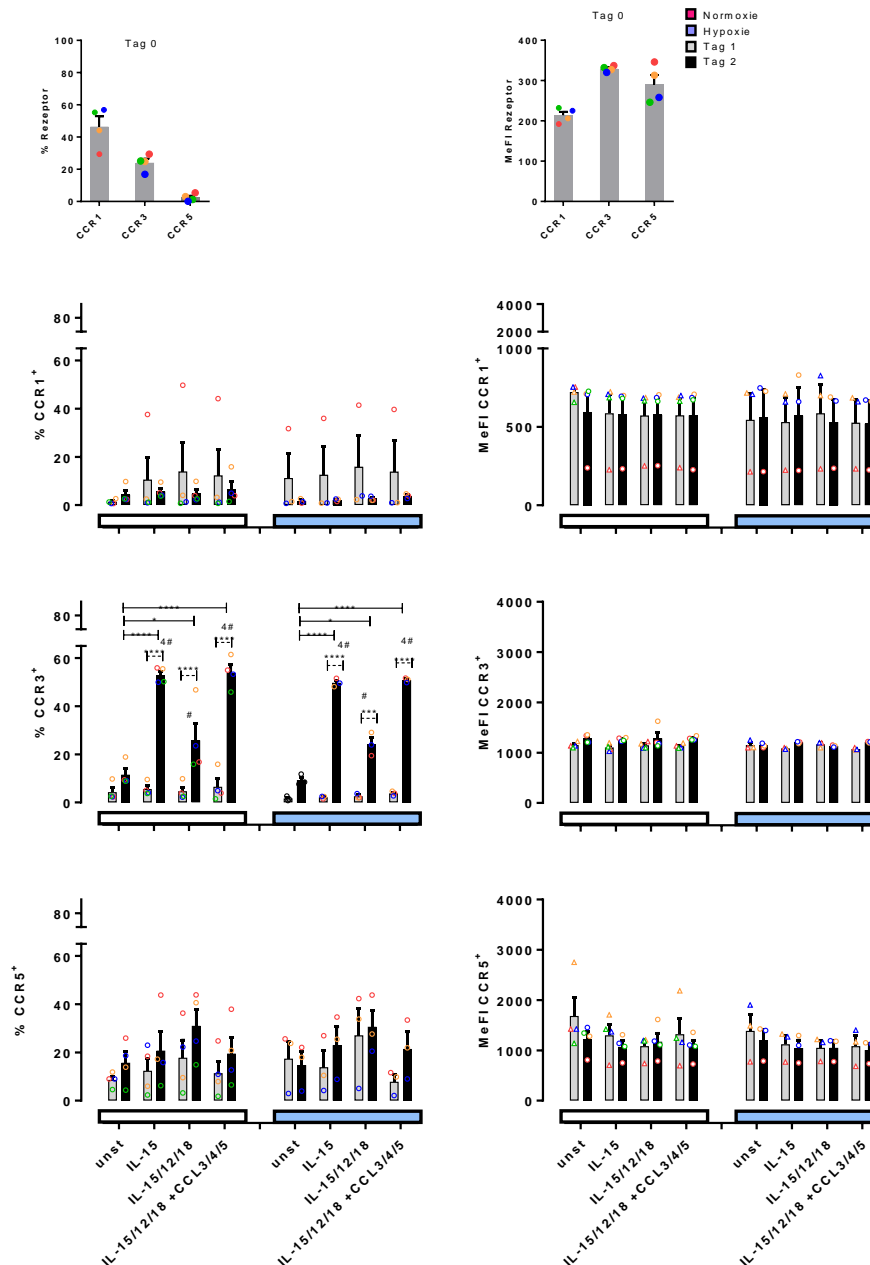


Abbildung 55: Übersicht über die Expression und MeFI der Rezeptoren CCR1, CCR3 und CCR5 nach sekundärer Stimulation (0, 24 und 48 Stunden).

Der Versuch wurde unter Normoxie und Hypoxie mit den gleichen Stimulationsbedingungen durchgeführt (n=4). **(Tag 0)** Übersicht der Rezeptorexpression und MeFI der NK-Zellen für CCR1, CCR3 und CCR5 in Prozent an Tag 0 direkt nach Isolation der NK-Zellen. **(CCR1)** Prozentuale Anteile der NK-Zellen, welche den CCR1-Rezeptor exprimieren sowie MeFI des CCR1-Rezeptors. **(CCR3)** Prozentuale Anteile der NK-Zellen, welche den CCR3-Rezeptor exprimieren sowie MeFI des CCR3-Rezeptors. **(CCR5)** Prozentuale Anteile der NK-Zellen, welche den CCR5 Rezeptor exprimieren sowie MeFI des CCR5-Rezeptors. Signifikante Veränderungen zwischen Tag 1 und Tag2 innerhalb derselben Stimulationsbedingung sind mit einer gestrichelten Linie gekennzeichnet. Die durchgezogene Linie kennzeichnet Veränderungen zwischen den einzelnen Stimulationsbedinungen. Veränderungen zu Tag 0 sind mit # markiert. Die statistische Auswertung erfolgt mittels Two-Way ANOVA. Es gilt: #, \*p < 0,05; ##, \*\*p < 0,01; ###, \*\*\*p < 0,001; ####, \*\*\*\*p < 0,0001.

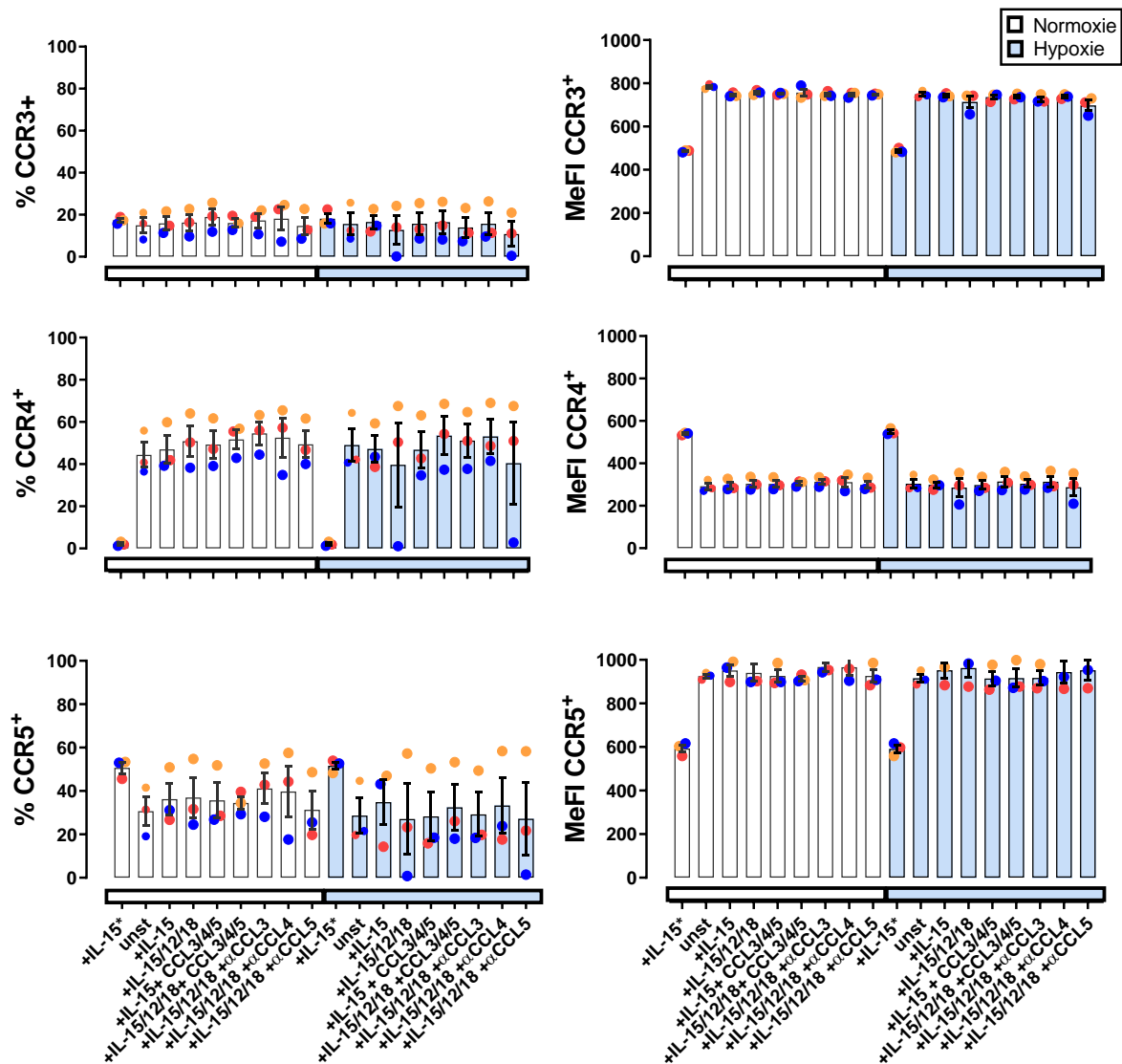


Abbildung 56: Übersicht über Expression der Rezeptoren CCR3, CCR4 und CCR5 nach sekundärer Stimulation von 6 und 10 Stunden.

Der Versuch ist unter Normoxie und DMOG mit den gleichen Stimulationsbedingungen durchgeführt worden (n=3). **(CCR3)** Prozentuale Anteile der NK-Zellen, welche den CCR3-Rezeptor exprimieren sowie die MeFI der CCR3 Rezeptoren pro NK-Zelle. **(CCR4)** Prozentuale Anteile der NK-Zellen, welche den CCR4-Rezeptor exprimieren sowie die die MeFI der CCR4 Rezeptoren pro NK-Zelle. **(CCR5)** Prozentuale Anteile der NK-Zellen, welche den CCR5-Rezeptor exprimieren sowie die MeFI. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Friedman- und Wilcoxon-Test.

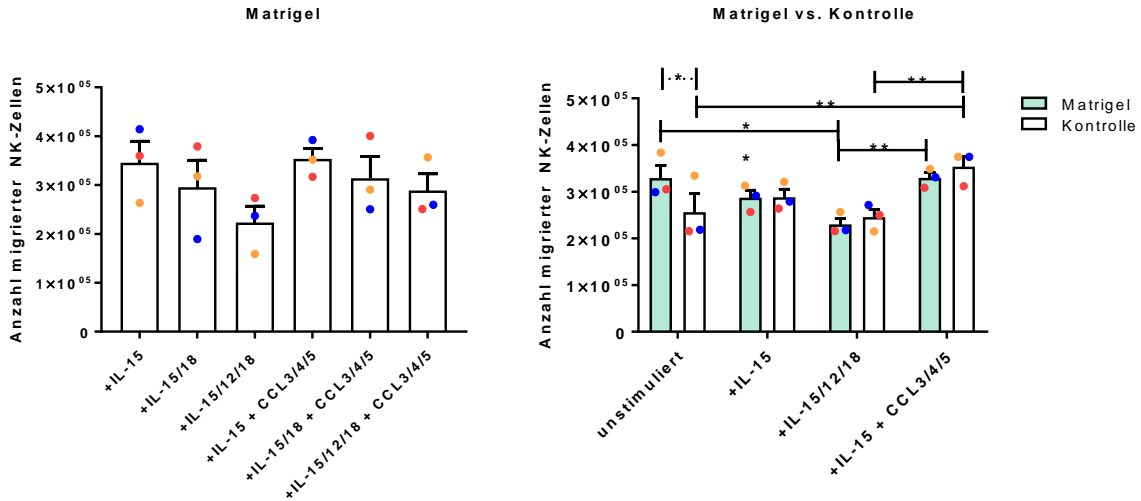


Abbildung 57: Zahlen der NK-Zellen, die nach 48 Stunden vom Insert in das untere Kompartiment migriert sind.

Dieses Diagramm zeigt die Mittelwerte der Migrationsassays, welche ebenfalls mit NK-Zellen aus drei gesunden Probanden durchgeführt wurden (n=3). Bei diesem Versuch wurde für jede Bedingung einmal die Migration durch ein unbeschichtetes Insert (Kontrolle) und ein mit Matrigel beschichtetes Insert (Matrigel) durchgeführt. **(Matrigel)** stellt die Mittelwerte und die einzelnen Datenpunkte der drei Migrationsassays dar, welche mit NK-Zellen, isoliert aus gesunden Probanden, durchgeführt wurden (n=3). Zur statistischen Auswertung wurde der Friedman-Test eingesetzt. **(Matrigel vs. Kontrolle)** Die gestrichelte Linie zeigt die Signifikanz zwischen Matrigel und Kontrolle, während die durchgezogenen Linien die Signifikanzen zwischen den einzelnen Stimulationen verdeutlichen. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Two-way ANOVA. Es gilt: \*p < 0,05; \*\*p < 0,01.

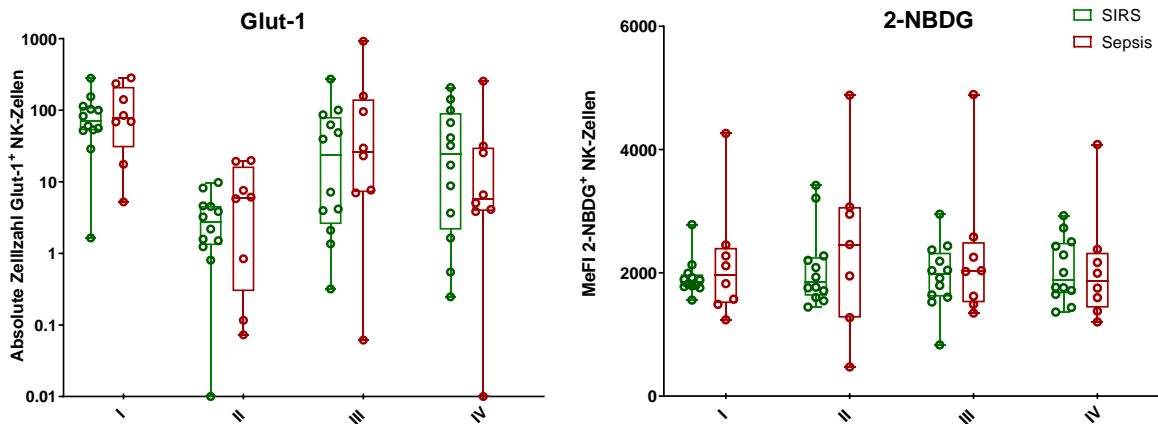


Abbildung 58: Durchflusszytometrische Analyse der Glut-1<sup>+</sup> absoluten Zellzahl und 2-NBDG<sup>+</sup> MeFI gemäß NK-Zell Differenzierungsstatus in Patienten der Validierungsgruppe bei Intensivaufnahme.

Periphere Vollblutanalyse (Glut-1) und Analyse der 2-NBDG MeFI aus PBMC bei Patienten mit SIRS und Sepsis im Rahmen der Validierungsgruppe. Patienten wurde EDTA-Vollblut bei Intensivaufnahme entnommen. SIRS n=12, Sepsis n=8. Wilcoxon-Vorzeichen-Rang Test.

## 10 LEBENS LAUF

### PERSONALIEN

Name und Vorname: Himmelhan, Bianca Stefanie  
Geburtsdatum: 08. April 1991  
Geburtsort: Mannheim  
Familienstand: ledig  
Vater: Klaus Himmelhan  
Mutter: Maritta Himmelhan (geb. Oswald)

### SCHULISCHER WERDEGANG

2001 – 2010 Nikolaus-von-Weis Gymnasium, Speyer  
09. März 2010 Allgemeine Hochschulreife

### UNIVERSITÄRER WERDEGANG

WS 2010/SS 2014 Beginn des Studiums Bachelor of Science Molekulare Biotechnologie an der Ruprecht-Karls Universität Heidelberg  
3. September 2014 Bachelor of Science Molekulare Biotechnologie  
WS 2014 – SS 2016 Beginn des Studiums Master of Science Anthropologie an der Johannes-Gutenberg-Universität Mainz  
2015 – 2016 Untersuchung der Hochregulation von CCR5 auf myeloiden suppressorischen Zellen bei malignem Melanom, DKFZ Heidelberg, klinische Kooperationseinheit (KKE) Dermato-Onkologie  
12. August 2016 Master of Science Anthropology

## 11 EIGENE VERÖFFENTLICHUNGEN

### Artikel in begutachteten Fachzeitschriften

Anna Coulibaly, Sonia Y. Velásquez, Carsten Sticht, Ana Sofia Figueiredo, Bianca S. Himmelhan, Jutta Schulte, Timo Sturm, Franz-Simon Centner, Jochen J. Schöttler, Manfred Thiel und Holger A. Lindner (2019) Int. J. Mol. Sci. 2019, 20(9), 2290  
**„AKIRIN1: A Potential New Reference Gene in Human Natural Killer Cells and Granulocytes in Sepsis“**

### Konferenzbeiträge – Poster

Bianca S. Himmelhan, Sonia Y. Velásquez, Anna Coulibaly, Ana Sofia Figueiredo, Kathrin Brohm, Jutta Schulte, Franz-Simon Centner, Jochen Schöttler, Corinna Worm, Holger A. Lindner, NK2018, Tagungsband, Mai 2018, San Antonio, TX, USA, **Natural Killer Cell Maturation Phenotypes In Non-Infectious Systemic Inflammation Versus Septic Shock**

Bianca S. Himmelhan, Sonia Y. Velásquez, Anna Coulibaly, Ana Sofia Figueiredo, Kathrin Brohm, Jutta Schulte, Nina Kassner, Franz-Simon Centner, Jochen Schöttler und Holger A. Lindner, ESS 2017 Tagungsband, September 2017, Paris, Frankreich, **Natural killer cell differentiation and metabolic phenotypes in non-infectious systemic inflammation versus sepsis**

### Konferenzbeiträge - Vorträge

Bianca S. Himmelhan, Sonia Y. Velásquez, Anna Coulibaly, Ana Sofia Figueiredo, Kathrin Brohm, Jutta Schulte und Holger A. Lindner ENII Summerschool 2017, Tagungsband, Mai 2017, Porto Cervo, Italien, **NK Cell Metabolism in Sepsis**



## 12 DANKSAGUNG

Einen besonderen Dank schulde ich meinem Doktorvater Herrn PD Dr. Holger Lindner für die Überlassung des Themas und Aufnahme in seine Arbeitsgruppe. Jederzeit hatte er ein offenes Ohr für die notwendige, wissenschaftliche Diskussion und gab Hilfestellung zur Strukturierung der Arbeit.

Ein großer Dank gilt Prof. Dr. Manfred Thiel für die Initiierung des gesamten SCIDATOS - Forschungsprojekts. Diese Voraussetzungen ermöglichten erst die notwendigen Untersuchungen zur Anfertigung der vorgelegten Arbeit. Sein erfrischender, wissenschaftlicher Input und die kontinuierliche Unterstützung trugen maßgeblich zum Gelingen dieser Dissertation bei.

Mein ausdrücklicher Dank gilt den Studienärzten Dr. Franz-Simon Centner und Dr. Jochen Schüttler für die notwendige Selektierung und aufwendige, administrative Rekrutierung der Patienten.

Fr. Dr. Sonia Y Velásquez gilt mein großer Dank für Ihre methodische und wissenschaftliche Unterstützung in Laborfragen und für die Nächte, die wir gemeinsam im Labor verbringen durften.

Für die technische Laborunterstützung auch an vielen Wochenenden möchte ich mich bei den MTA Jutta Schutte, Kathrin Brohm und Tanja Fuderer bedanken. Fr. Dr. Anna Coulibaly danke ich für ihre Unterstützung in Fragen zu Magnetic Bead Array und dem wissenschaftlichen Austausch.

Danken möchte ich auf diesem Weg Fr. Dr. Dr. Verena Schneider-Lindner für ihre Beiträge zu klinischen, demographischen und statistischen Fragestellungen sowie allen Mitgliedern des SCIDATOS – Netzwerkes für den wissenschaftlichen Austausch.

Ein besonderer Dank gilt Susanne Kleiner und Noah Schäfer für den wissenschaftlichen Austausch sowie Nina Kassner, Theresa Locher und Julia Süsner, die mich im Rahmen ihrer Bachelorarbeit unterstützten.

Meinen Eltern und meiner Schwester möchte ich ganz herzlich für die aufmerksame, liebevolle und vielseitige Unterstützung während der Erstellung dieser Arbeit und meines gesamten Studiums danken. Meinem Lebensgefährten Sascha danke ich von ganzem Herzen für seine uneingeschränkte und liebevolle Unterstützung sowie seiner grenzenlosen Motivation.