

Die immunmodulatorische Wirkung von mitochondrialer DNA

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Hohen Medizinischen Fakultät
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität
Bonn

Johanna Litt

aus Halle (Saale)

2020

Angefertigt mit der Genehmigung
der Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: PD Dr. med. Sven Klaschik
2. Gutachter: Prof. Dr. Wolfram Sigmar Kunz

Tag der Mündlichen Prüfung: 27.11.2020

Aus der Klinik und Poliklinik für Anästhesiologie und Operative Intensivmedizin

Direktor: Prof. Dr. med. Andreas Hoeft

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis

1. Einleitung	9
1.1 Die angeborene Immunabwehr	9
1.1.1 Toll-like Rezeptoren	10
1.1.2 Der Toll-like Rezeptor 9 in plasmazytoiden dendritischen Zellen	11
1.2 Mitochondrien	14
1.3 Mitochondriale DNA	15
1.3.1 Mitochondriale DNA als DAMP	17
1.4 Zielsetzung der Arbeit	18
2. Material und Methoden	19
2.1 Material	19
2.1.1 Chemikalien und Biochemikalien	19
2.1.2 Puffer und Lösungen	20
2.1.3 Isolations-, Synthese- und Nachweissysteme („Kit's“)	21
2.1.4 Primer und Sonden	22
2.1.5 Zelllinien und Nährmedien	23
2.1.6 CpG-ODN	25
2.1.7 Geräte	25
2.1.8 Programme	26
2.2 Methoden	26
2.2.1 Hep G2-Zellkultur	26
2.2.2 Cal-1-Zellkultur	27
2.2.3 Isolation von mononukleären Zellen aus Spenderblut und Buffy Coats	28
2.2.4 Isolation mitochondrialer DNA	30
2.2.5 Fragmentierung mitochondrialer DNA	32

2.2.6	Konventionelle PCR	32
2.2.7	PCR-Produkt Aufreinigung	33
2.2.8	Agarosegel-Elektrophorese	33
2.2.9	Endotoxin-Testung	35
2.2.10	Transfektion mitochondrialer DNA in Zellen	36
2.2.11	RNA-Isolation	36
2.2.12	Synthese komplementärer DNA	37
2.2.13	Quantitative Echtzeit-PCR	37
2.2.14	ELISA	39
2.2.15	Statistische Auswertung der Versuchsdaten	42
3.	Ergebnisse	43
3.1	Cal-1 Stimulationsversuche	43
3.1.1	Stimulation mit nativer mitochondrialer DNA	43
3.1.2	Stimulation mit fragmentierter mitochondrialer DNA	44
3.1.3	Stimulation mit mitochondrialen PCR-Produkten	46
3.1.4	Transfektion mit DOTAP	47
3.2	Effekte der Stimulation von PBMCs mit mitochondrialer DNA	49
3.3	Endotoxin-Testung und anschließende Versuchsreihen	52
4.	Diskussion	60
4.1	Auswahl der Zellkultur-Modelle	60
4.2	Bewertung der Ergebnisse in Hinblick auf die Endotoxin-Kontamination	63
4.3	Bedingungsoptimierung der TLR9-Stimulationsversuche	64
4.3.1	Einfluss der Stimulationsdauer auf die zelluläre Immunantwort	64
4.3.2	Einfluss der Konzentration der Stimulanzen auf die zelluläre Immunantwort	65
4.3.3	Steigerung der Rezeptoraffinität	67
4.3.4	Sicherung der intrazellulären mtDNA-Aufnahme	68
4.4	Kritische Betrachtung der Rolle des TLR9 in der durch mitochondriale DNA ausgelösten Immunantwort	70
4.5	Alternative intrazelluläre Signalwege	73

4.5.1	Das zytosolische DNA-Sensor-System cGAS/STING	74
4.5.2	Die Rolle des Inflammasom in der immunregulatorischen Wirkung mitochondrialer DNA	77
4.6	Schlussfolgerung und Aussicht	81
5.	Zusammenfassung	83
6.	Abbildungsverzeichnis	85
7.	Literaturverzeichnis	87
8.	Danksagung	97

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AIM2	absent in melanoma 2
AK	Antikörper
AMP	Adenosinmonophosphat
ANOVA	Varianzanalyse (analysis of variance)
ASC	apoptosis-associated Speck-like protein
ATP	Adenosintriphosphat
APACHE-Score	acute physiological assessment and chronic health evaluation
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
CD	immunphänotypisches Oberflächenmerkmal (Cluster of Differentiation)
cDC	konventionelle dendritische Zelle
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
cGAMP	zyklisches GMP-AMP
cGAS	zyklische GMP-AMP Synthase
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
COX-IV	Cytochrom C Oxidase IV
CpG-ODN	Cytosin-Phosphat-Guanin-Oligodesoxynukleotide
DAMP	Damage associated molecular pattern
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DOTAP	N-(2,3-Dioleoyloxy-1-propyl)trimethylammonium Methylsulfat
DEPC	Diethyldicarbonat
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure

ELISA	antikörperbasiertes Protein-Nachweisverfahren (Enzyme-linked Immunosorbent Assay)
FcR	Fc-Rezeptor (fragment crystallisable receptor)
FKS	Fetales Kälberserum
fMLF	N-Formylmethionyl-Leucyl-Phenylalanin
G	G-Zahl, Beschleunigungsgröße einer Zentrifuge
g	Vielfaches der Erdbeschleunigung
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GM-CSF	granulocyte macrophage colony-stimulating factor
GMP	Guanosinmonophosphat
GTP	Guanosintriphosphat
HBS	HEPES gepufferte Salzlösung
HEK	humane embryologische Nierenzellen
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl) -1-piperazinyl) Ethansulfonsäure
HIN	hematopoietic interferon-inducible nuclear protein
HMGB1	High-Mobility Group Box 1
H ₂ SO ₄	Schwefelsäure
IL	Interleukin
IL16	Interferon- γ -induzierbares Protein 16
IFN β	Interferon β
IRAK	IL-1-assozierte Kinase
IRF3	Interferon regulatory factor 3
Kb	Kilobasenpaar
LAL-Test	Limulus-Amöbozyten-Lysat-Test
LL-37	Polypeptid aus 37 Aminosäuren mit der Sequenz LLGDFFRKSKEKIGKEFKRIVQR IKDFLRNLVPRTES
LPS	Lipopolysaccharid
M	molar

MAPK	mitogen-activate Proteinkinase
mM	millimolar
MEM	Nicht essentielle Aminosäuren
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure
mtDNA	mitochondriale Desoxyribonukleinsäure
mtODN	mitochondriales Oligodesoxynukleotide
MyD88	myeloischer Differenzierungsfaktor 88
N	Stoffmenge in mol
NaCl	Natriumchlorid
NADH	Nicotinamidadenindinukeotid
NFκB	nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells
NODs	nukleotidbindende Oligomerisierungsdomäne
PAMP	Pathogen-assoziiertes molekulares Muster
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
pDC	plasmazytoide dendritische Zelle
PBMC	primäre mononukleäre Zellen
PMN	polymorphkernige Leukozyten
PRR	Pathogen-Recognition Receptor
PYHIN	pyrin and HIN domain-containing protein
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	Rotation pro Minute
RSS	response sensor system
STING	Stimulator von Interferongen
TAE-Puffer	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TIR-Domäne	Toll-IL-Rezeptor-Domäne
TLR	Toll-like Rezeptor
TNFα	Tumornekrosefaktor α
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan

1. Einleitung

1.1 Die angeborene Immunabwehr

Die erste Instanz der körpereigenen Verteidigung gegen Infektionen stellt die angeborene Immunantwort dar. Hierbei handelt es sich um eine unspezifische Abwehr von pathogenen Strukturen. Diese Form der Immunreaktion wird unmittelbar nach Kontakt mit den pathogenen Strukturen initiiert. Von dieser zu unterscheiden ist die adaptive Immunität, welche hoch spezifisch abläuft und auf Bildung von Antikörpern und antigen-spezifischen T-Zellen gegen bestimmte Pathogene fußt. Die Aktivierung der adaptiven Immunität kann mehrere Tage dauern.

Ein wichtiger Bestandteil des angeborenen Immunsystems sind Zellen, welche in der Lage sind pathogene Strukturen zu erkennen und eine inflammatorische Reaktion auszulösen. Hierzu zählen unterschiedliche Typen myeloischer Zellen, wie z.B. Makrophagen, Granulozyten oder dendritische Zellen (DCs). Diese Zellen exprimieren sogenannte Mustererkennungsrezeptoren (pattern recognition receptors, PRRs). PRRs sind darauf spezialisiert unterschiedliche spezifische Strukturen von Mikroorganismen, auch pathogenassoziierte molekulare Muster (pathogen-associated molecular patterns, PAMPs) genannt, zu erkennen. Geschieht dies, werden von der stimulierten Zelle verschiedene Zytokine und Chemokine sezerniert. Hierbei handelt es sich um Proteine, welche weitere Zelltypen des Immunsystems aktivieren und so eine Entzündungsreaktion initiieren können. PRRs erkennen jedoch nicht nur PAMPs, sondern sind auch teilweise in der Lage körpereigene Strukturen zu detektieren, welche aufgrund von Zellschäden freigesetzt werden. Solche autologen Stimulantien werden DAMPs genannt (damage-associated molecular patterns) und sind dementsprechend ebenfalls in der Lage immunologische Reaktionen zu verursachen (Murphy und Weaver, 2018).

1.1.1 Toll-like Rezeptoren

Eine Form von PRRs, welche besonders präsent auf Sensorzellen des angeborenen Immunsystems vorkommen, ist die Familie der Toll-like Rezeptoren (TLR). Bisher sind bei Säugetieren dreizehn verschiedene TLRs bekannt. Jedoch wurde TLR10 bisher nur im Menschen und TLR 11-13 nur bei Mäusen nachgewiesen (Kawai und Akira, 2010). Bei den Toll-like Rezeptoren handelt es sich um Transmembranproteine Typ I. Sie besitzen eine Ektodomäne am N-Terminus, deren leucinreiche Struktur die PAMP-Erkennung verantwortet, eine Transmembrandomäne sowie eine intrazelluläre TIR-(Toll-IL-Rezeptor-)Domäne, welche die weitere Signaltransduktion reguliert (Bowie und O'Neill, 2000). Je nach TLR-Unterart variiert der intrazelluläre Standort (Abbildung 1). So befinden sich diese Rezeptoren in der Zellmembran, jedoch auch in Zellorganellen, wie dem Endoplasmatischen Retikulum, dem Lysosom oder dem Endolysosom (Murphy und Weaver, 2018). Jeder TLR ist auf die Erkennung verschiedener Ziel-PAMPs spezialisiert. So binden z.B. die Unterklassen TLR1, TLR2 und TLR6 Lipidstrukturen, während die Rezeptoren TLR7, TLR8 und TLR9 auf die Erkennung von Nukleinsäuren ausgelegt sind. Auch können die intrazellulären Signalwege desselben TLRs variieren, je nachdem in welchem Zelltyp dieser lokalisiert ist. In plasmazytoide dendritische Zellen zum Beispiel unterscheiden sich die Signalkaskaden des TLR7 und TLR9 im Vergleich zu anderen Zellarten (Akira et al., 2006).

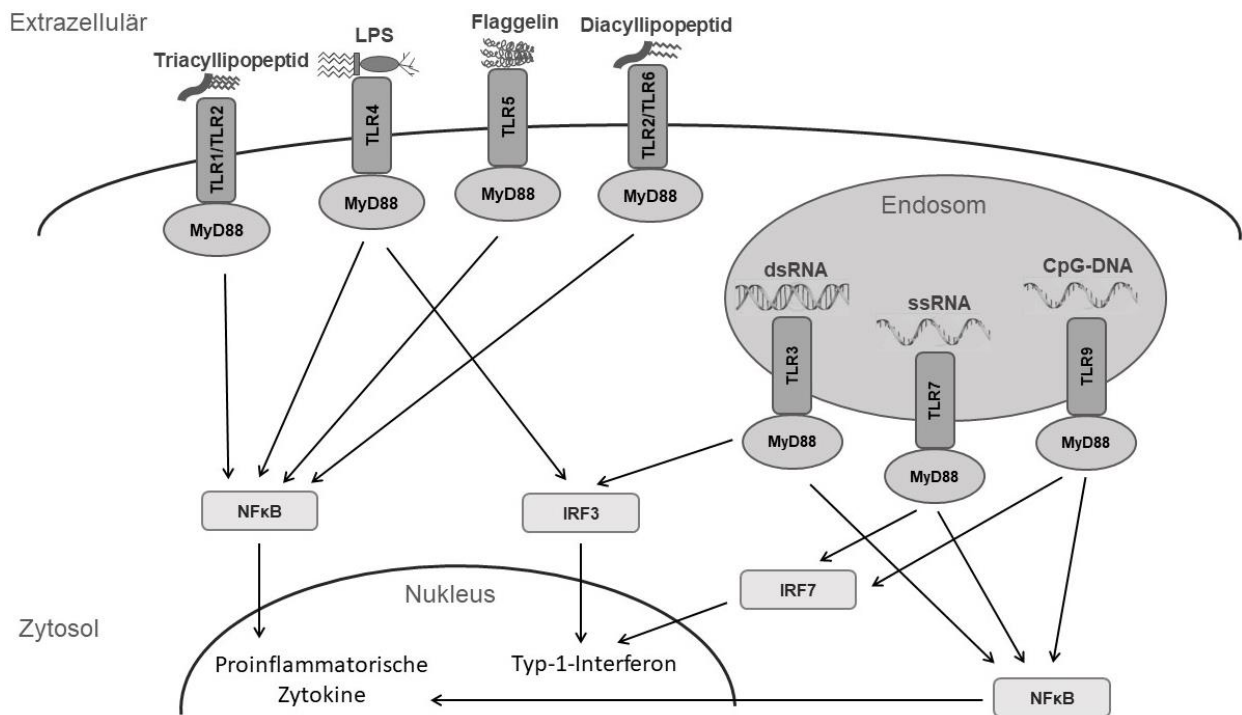


Abb. 1: Übersicht TLR-Unterarten und deren Liganden

Die TLR-Unterarten TLR1, TLR2, TLR4, TLR5 und TLR6 sitzen als Transmembranprotein in der Zellmembran; dort erkennen sie spezifisch extrazelluläre Pathogene und aktivieren über intrazelluläre Signalkaskaden den Transkriptionsfaktor NFκB; dieser fördert die Expression von Genen proinflammatorischer Zytokine; durch die Stimulation des TLR4, wird zudem IRF3 aktiviert, was zu einer Expression von Typ-I-Interferon führt; Die TLR-Unterarten TLR3, TLR7 und TLR9 binden ihre Liganden hingegen im Endosom; durch ihre Stimulation wird ebenfalls NFκB-vermittelt die Expression von proinflammatorischen Zytokinen angeregt. TLR3 aktiviert zudem über IRF7, TLR7 und TLR9 über IRF3 die Typ-I-Interferon-Expression. Abb. modifiziert nach Kawai und Akira (2010).

1.1.2 Der Toll-like Rezeptor 9 in plasmazytoiden dendritischen Zellen

Dendritische Zellen sind Initiatoren und Mediatoren der angeborenen Immunantwort, die Funktion und Aktivität anderer Immunzellen wie B- und T-Lymphozyten kontrollieren können (Banchereau und Steinmann, 1998). Unreife dendritische Zellen entstehen aus myeloischen Vorläuferzellen und differenzieren sich im weiteren Verlauf zu unterschiedlichen Unterarten. Die meisten ausgereiften Zellen besitzen lange sternförmige Zellfortsätze, die zu ihrer Namensgebung führten. Unreife dendritische Zellen betreiben auf ihren Weg durch die Blutbahn neben Phagozytose auch Makropinozytose. Wichtiger ist jedoch die von ihnen vermittelte Erkennung pathogener

Strukturen und die darauffolgende Aktivierung des Immunsystems. Unreife dendritische Zellen lassen sich in zwei Subtypen unterscheiden. Die Hauptaufgabe konventioneller dendritischer Zellen (cDCs) besteht in der Antigen-Präsentation und T-Zellaktivierung (Murphy und Weaver, 2018). Plasmazytoide dendritische Zellen (pDCs) produzieren Typ-I-Interferone (Siegal et al., 1999). Dies sind antiviral wirksame Zytokine, zu denen das IFN α und IFN β gezählt wird (Murphy und Weaver, 2018). Für die Erkennung von pathogenen Strukturen exprimieren pDCs Toll-like Rezeptoren. So konnte insbesondere eine Expression von TLR1, TLR6, TLR7 und im geringen Maße TLR10 in dieser Zellart nachgewiesen werden. Es zeigte sich zudem, dass pDCs und B-Zellen als einzige Zellen des humanen Immunsystems eine relevante Expression des Toll-like Rezeptor 9 aufweisen (Hornung et al., 2002). Kommt es zu einer Differenzierung von pDCs zu gereiften dendritischen Zellen, wird die Expression von TLR7 sowie TLR9 gänzlich reduziert. In den ausgereiften Zellen wurde hauptsächlich ein Vorkommen von TLR1, TLR2 und TLR3 nachgewiesen (Kadowaki et al., 2001).

Der Toll-like Rezeptor 9 befindet sich intrazellulär wandständig im Endoplasmatischen Retikulum (Latz et al., 2004). Er erkennt unmethylierte CpG-Motive der DNA (Kawai und Akira, 2010). Hierbei handelt es sich um Cytosin-Phosphat-Guanin-Oligodesoxynukleotide, welche nichtmethyliert gehäuft in bakterieller und viraler DNA vorkommen (Bauer et al., 2001). Im nukleären Genom von Säugern liegt hingegen in der Regel eine Methylierung von Cytosin vor (Murphy und Weaver, 2018). Im geringen Maße können auch methylierte CpG-Oligonukleotide zu einer Stimulation des TLR9 führen. Diese fällt jedoch wesentlich schwächer aus als die der unmethylierten DNA (Coch et al., 2009). Kommt es zu einer Stimulation der Zellen mit TLR9-Liganden, wandert der Rezeptor vom Endoplasmatischen Retikulum zum Endolysosom (Abbildung 2). Hier generiert die Spaltung des TLR9 durch intrazelluläre Proteasen einen funktionsfähigen Rezeptor und initiiert somit die folgende Signalkaskade (Kawai und Akira, 2010; Latz et al., 2004). Dabei wird zunächst das Adapterprotein MyD88 (myeloischer Differenzierungsfaktor 88) stimuliert, welches an der TIR-Domäne des TLRs sitzt. Im Folgenden kommt es zur Aktivierung von zwei Serin/Threonin-Proteinkinasen IRAK4 (IL-1-assoziierte Kinase 4) und IRAK1. Dadurch wird zum einen über bestimmte MAP-Kinasen der Transkriptionsfaktor NF κ B aktiviert, welcher die Synthese von proinflammatorischen Zytokinen wie beispielsweise TNF α und IL-6 initiiert. Des Weiteren bindet IRAK1 an das

Protein IRF7 und führt somit zu dessen Phosphorylierung. Hierdurch kommt es zu einer Steigerung der Expression von Typ-I-Interferon-Genen (Kaisho und Akira, 2006; Murphy und Weaver, 2018).

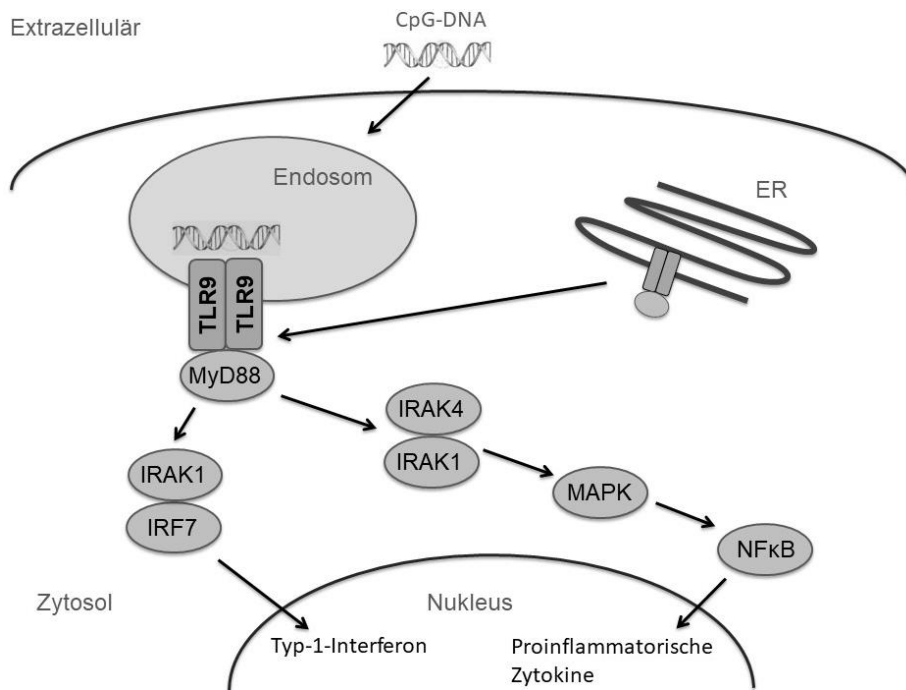


Abb. 2: TLR9-Signalweg

Der zunächst im ER lokalisierte TLR9 wandert nach Aufnahme von CpG-DNA zum Endosom und bindet diese dort, dadurch kommt es zu einer Stimulation des Adapterprotein MyD88, was zu einer Aktivierung von IRAK1 und IRAK4 führt. Über bestimmte MAP-Kinasen wird der Transkriptionsfaktor NFκB aktiviert, welcher die Synthese von proinflammatorischen Zytokinen initiiert. IRAK1 bindet zudem an das Protein IRF7 und löst somit dessen Phosphorylierung aus. Es resultiert eine vermehrte Expression von Typ-I-Interferon-Genen. Abb. modifiziert nach Kawai und Akira (2010).

Je nach TLR9-Ligand dominiert der erste oder der zweite Reaktionsweg. So zeigten Versuche mit synthetischen CpG-ODN, dass eine unterschiedliche molekulare Struktur der Stimulantien eine andere Zellreaktion hervorrufen kann. Das sogenannte K ODN (auch CpG-B) ist ein linearer Einzelstrang mit vielen unmethylierten CpG-Motiven. In Versuchen mit pDCs konnte gezeigt werden, dass dieses synthetische ODN die NFκB-vermittelte Synthese von proinflammatorischen Zytokinen wie TNFα, IL-6 und IL-8 stimuliert. D ODN (oder CpG-A) hingegen formt komplizierte Schleifen und fördert eher die Produktion von IFNα und IFNβ (Kerkmann et al., 2003; Verthelyi et al., 2001).

Die Stimulation von undifferenzierten pDCs via TLR führt neben der Sekretion von Zytokinen und Typ-I-Interferon auch zur Zellreifung und somit zur Verbindung zwischen dem angeborenen und dem adaptiven Immunsystem. Die gereiften DCs initiieren ihrerseits wiederum die Differenzierung von T- und B-Zellen (Abdelsadik und Trad, 2011; Banchereau und Steinmann, 1998). Gelangen proinflammatorische Zytokine in die Blutbahn hat dies neben der Aktivierung von diversen Immunzellen jedoch auch andere weitreichende Folgen. So fördert z.B. TNF α eine erhöhte Permeabilität des Endothels und somit die Entstehung eines septischen Schocks. Ebenfalls kann dieses Zytokin eine disseminierte intravasale Gerinnung auslösen, was zu einem Multiorganversagen führen kann (Murphy und Weaver, 2018).

1.2 Mitochondrien

Mitochondrien sind Zellorganellen mit multiplen Aufgabenbereichen. Durch die Synthese von ATP tragen sie maßgeblich zu der Energieversorgung der Zelle bei. Diese Funktion spielt besonders in sehr aktiven Zelltypen wie z.B. den Herzmuskelzellen eine relevante Rolle. Sie stellen jedoch ebenfalls ein bedeutendes Sensorsystem (response sensor system; RSS) dar. So können diese Organellen, wenn sie sich in Zellen des Gefäßsystems befinden, beispielsweise den intravasalen Sauerstoffgehalt messen. Bei schwerer Hypoxie werden so inflammatorische Reaktionen induziert und der kontrollierte Zelltod (Apoptose) eingeleitet (Dromparis und Michelakis, 2012).

Mitochondrien sind umgeben von einer doppelten Lipidmembran (Abbildung 3). Die äußere Schicht grenzt das Organell vom Zytosol ab. Zwischen ihr und der inneren Schicht befindet sich der Intermembranspalt. Die innere Schicht besteht aus vielen Einstülpungen, den sogenannten Cristae. So wird eine größere Fläche für dort lokalisierte Proteine geschaffen. Neben dem Enzymkomplex der Atmungskette befinden sich hier zahlreiche selektive Transportproteine. So können die für den mitochondrialen Stoffwechsel essentielle Proteine, welche teilweise im Nucleus codiert werden, in das Organell gelangen. Geschützt von dieser Membrandoppelschicht befindet sich die mitochondriale Matrix und in dieser das mitochondriale Genom sowie Ribosomen für die organell-eigene Proteinsynthese. Aufgrund ihres spezifischen Aufbaus besitzen Mitochondrien eine deutliche Ähnlichkeit mit prokaryotischen Zellen (Taanmann, 1998; Stojanovski et al., 2006).

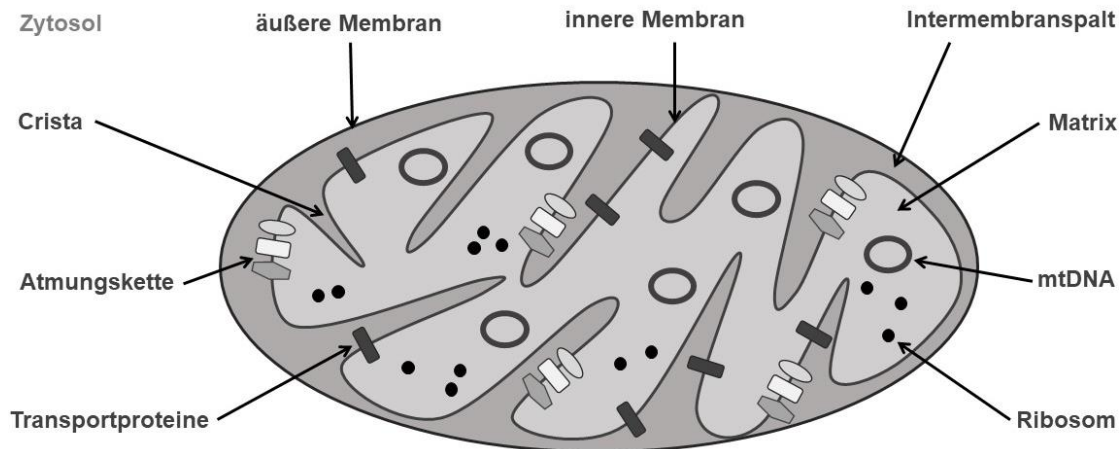


Abb. 3: Aufbau eines Mitochondriums

Die äußere Membran grenzt das Organell gegen das Zytosol ab. Danach folgt die innere Membran, welche vielen Einstülpungen, sogenannten Cristae bildet. Zwischen den beiden Membranschichten befindet sich der Intermembranspalt. In der inneren Membran sitzen Transportproteine und der Enzymkomplex der Atmungskette. Die innere Membran umschließt die Matrix in welcher sich die mtDNA und Ribosomen befinden. Abb. modifiziert nach Lüllmann-Rauch (2009).

1.3 Mitochondriale DNA

Eukaryoten besitzen je Zelle hunderte bis tausende Kopien des mitochondrialen Genoms (Malka et al., 2006; Rodríguez-Nuevo und Zorzano, 2019). Hierbei handelt es sich um einen geschlossenen Ring einer Doppelstrang-DNA mit etwa 16,6 kb welche die Information für 2 rRNAs, 22 tRNAs und 13 Polypeptide trägt (Abbildung 4). Codiert werden einige Proteinuntereinheiten der Atmungskette, wie z.B. NADH-Dehydrogenase, ATP-Synthase, Cytochrom B und C), sowie tRNA- und rRNA-Moleküle für die intramitochondriale Proteinsynthese (Taanman, 1999; Malka et al., 2006). Je nach Dichte von Guanin- und Thymin-Basen-Sequenzen kann in einen „leichten“ und einen „schweren“ DNA-Strang unterschieden werde. Die Mehrheit der codierten Gene befindet sich auf dem „schweren“ Strang. Eine Vererbung des mitochondrialen Genoms erfolgt ausschließlich über die maternale Linie (Taanman, 1999). Eine der ersten Beschreibungen mitochondrialer DNA stammt aus dem Jahr 1963, erfolgt durch Nass und Nass. In dieser wurden mitochondriale Strukturen aus Hühnerembryos als DNA identifiziert und bereits die deutliche Ähnlichkeit zu bakteriellen Plasmiden erkannt. Im

Jahr 1970 wurde durch Lynn Margulis in der Endosymbionten-Theorie postuliert, dass einst freilebende Bakterien durch Symbiose von eukaryotischen Wirtszellen aufgenommen wurden und sich so im Laufe der Evolution zu Zellorganellen transformierten. Dieser Theorie wurde mit der Zeit anderen Hypothesen wie dem Symbiogenese Szenario entgegengestellt. In dieser alternativen Evolutionstheorie heißt es, dass die Wirtszelle eher ein Prokaryot gewesen sei und sich die Eukaryoten erst mit der Zeit, nach der besagten Symbiose entwickeln konnten (Gray, 2012). Die aktuellen Theorien gleichen sich jedoch weiterhin in der Hinsicht, dass die Vorfahren der Mitochondrien am ehesten aus der Gruppe der α -Proteobakterien stammten. Auch nach der vollkommenden Sequenzierung des mitochondrialen Genoms (Anderson et al., 1981) finden sich weitere strukturelle Gemeinsamkeiten mit dem bakteriellen Erbgut. So konnte ebenfalls in mitochondrialer DNA ein vermehrtes Vorkommen von unmethylierten CpG-Sequenzen nachgewiesen werden (Cardon et al., 1994).

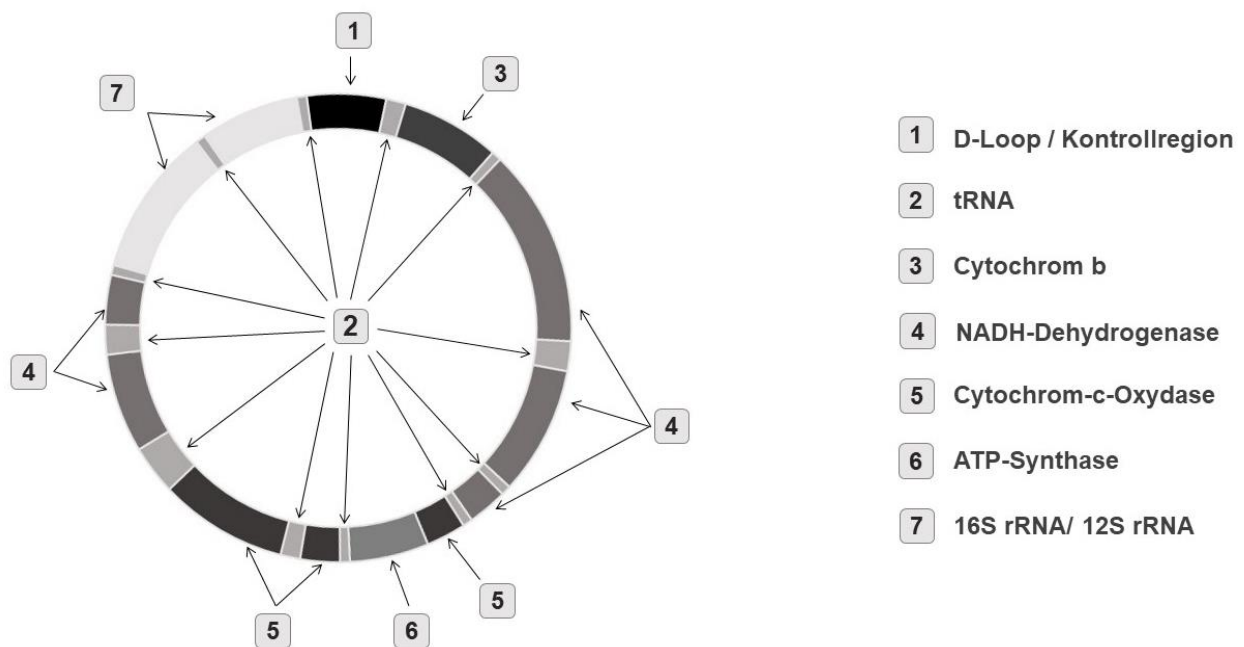


Abb. 4: Das mitochondriale Genom

Vereinfachte Darstellung der zirkulären mtDNA; sie codiert 2 rRNAs, 22 tRNAs und 13 Polypeptide, unter ihnen einige Proteinuntereinheiten der Atmungskette, wie z.B. NADH-Dehydrogenase, ATP-Synthase, Cytochrom B und C. Abb. Modifiziert nach Taanmann (1998) und Andreu et al. (2003).

1.3.1 Mitochondriale DNA als DAMP

Im Serum von Trauma-Patienten konnte eine deutliche Erhöhung von freier mitochondrialer DNA nachgewiesen werden. Zhang et al. (2010a) zeigten in einer Studie mit 15 Trauma-Patienten ohne Nachweis einer bakteriellen Infektion, dass diese einen 1000-fach erhöhten Gehalt an mtDNA aufwiesen als die Vergleichsgruppe. Auch im septischen Krankheitsgeschehen konnten ähnliche Ergebnisse dargestellt werden. In einer Studie, welche 165 septische Patienten umfasste, konnte ebenfalls ein deutlicher Nachweis von vermehrten mtDNA-Gehalt im Serum erbracht werden. Zudem fand sich eine Korrelation zwischen einem erhöhten mtDNA-Gehalt am ersten stationären Tag und einer erhöhten Mortalität nach 30 Tagen (Schäfer et al., 2016). Somit konnte gezeigt werden, dass mtDNA einen durchaus sensitiven Biomarker für die Mortalität von Sepsis-Patienten auf Intensivstationen darstellt. Diese Sensitivität übertrifft sogar die der konventionellen Marker wie Laktat oder dem APACHE-Score (Nakahira et al., 2013).

Die aktuelle klinische Datenlage legt die Vermutung nahe, dass durch ausgeprägte Organschäden bei Trauma- und Sepsis-Patienten nekrosebedingt vermehrt mtDNA in die Blutbahn freigesetzt wird. Diese mtDNA könnte als autologes DAMP das inflammatorische Geschehen bei beiden Krankheitsbildern deutlich verstärken. Die Erkenntnisse über die große strukturelle Ähnlichkeit zu bakterieller DNA, sowie das gehäufte Vorkommen von unmethylierten CpG-Sequenzen lässt die Theorie zu, dass sich die immunmodulatorische Wirkung von mitochondrialer und bakterieller DNA gleicht.

Zhang et al. (2010a) zeigte in Tierversuchen mit Ratten, dass intravasal injizierte mitochondriale DAMPs in vivo schwere Organschäden verursachen. Nach bereits drei Stunden kam es zu deutlichen Lungenschäden. In der bronchoalveolären Lavage konnte der vermehrte Nachweis von polymorphkernigen Leukozyten (PMN) erbracht werden. Ebenfalls wurde eine PMN-induzierte systemische Inflammation mit Leberinfiltration auffällig. PMN exprimieren unter anderem den TLR9, welcher nach Stimulation die p38 MAPK aktiviert. Zellversuchsreihen mit PMN zeigten, dass durch Inkubation mit mtDNA eine Phosphorylierung von p38 MAPK erzielt werden konnte. Nach Zugabe eines den TLR9-inhibierenden Oligonukleotid (TTAGGG) konnte dieser Effekt blockiert werden. Somit postulierte Zhang et al. (2010a) eine Wirkung mitochondrialer DNA via TLR9. In weiterführenden Zellversuchen zeigte sich jedoch,

dass nach isolierter Behandlung mit mtDNA sowie CpG-ODN keine weiterführende signifikante Stimulation der Zellen, nachgewiesen durch eine gesteigerte IL-8 Expression, bewirkt werden konnte (Zhang et al., 2010a). Es erfolgten weitere Tierversuche, welche die Theorie untermauern sollten, dass mtDNA wie bakterielle CpG-reiche DNA durch den TLR9 erkannt und somit ein inflammatorischer Effekt ausgelöst werden kann. Hierzu wurden zunächst Wildtyp-Mäusen einmalig mtDNA, und einer Vergleichsgruppe CpG-ODN injiziert. Es konnte ein direkter Verlust der zytotoxischen T-Zell-Aktivität nachgewiesen werden. Die dendritischen Zellen der Tiere waren nicht fähig, eine T-Zelldifferenzierung zu verursachen. Bei einer zweiten Gruppe von TLR9 Knockout-Mäusen fehlte dieser Effekt. Die Wildtyp-Gruppe zeigte nach Stimulation mit mtDNA eine deutliche Splenomegalie mit einer TLR9 abhängigen Zerstörung der Marginalzone. Ähnliche strukturelle Milzveränderungen wurden ebenfalls bei Sepsis-Patienten nachgewiesen. Auch diese Beobachtungen konnten in den Versuchen mit TLR9 Knockout-Mäusen nicht reproduziert werden.

Durch diese Erkenntnisse wurde nicht nur der Verdacht bestärkt, dass mitochondriale DNA ein Stimulus des TLR9 sei, sondern auch vermutet, dass mtDNA eine Verbindung zwischen der initialen inflammatorischen und der sekundären immunparalysierenden Phase der Sepsis darstellen könnte (Schäfer et al., 2016).

1.4 Zielsetzung der Arbeit

Es wurden bereits einige Studien und Versuchsergebnisse publiziert, welche die Theorie unterstützen, dass mitochondriale DNA, freigesetzt durch Zellnekrose als autologes DAMP fungiert. Aufgrund seiner starken strukturellen Ähnlichkeit mit bakterieller DNA wurde zudem postuliert, dass diese immunologische Wirkung über den Toll-like Rezeptor 9 vermittelt sei (Zhang et al., 2010a; Schäfer et al., 2016). Eindeutig beweisende Versuchsreihen mit humanen Zellkulturen wurden hierzu jedoch noch nicht veröffentlicht. Besonders ein Zellmodell mit plasmazytoiden dendritischen Zellen könnte an dieser Stelle zu weiteren Erkenntnissen der genaueren immunmodulatorischen Wirkung von mitochondrialer DNA führen. Aus diesem Grund wurde in dieser Arbeit die Fragestellung verfolgt, ob sich durch mitochondriale DNA plasmazytoide dendritische Zellen und primäre mononukleäre Zellen stimulieren lassen und ob die mögliche inflammatorische Reaktion eindeutig TLR9-vermittelt abläuft.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien und Biochemikalien

Agarose, PeqGold Universal Agarose	Peqlab, VWR Life Science, Darmstadt, Deutschland
Chloroform	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
DEPC Treated Water	Invitrogen, Carlsbad, USA
dNTP Set	Invitrogen, Carlsbad, USA
Dodecylsulfat	Serva, Heidelberg, Deutschland
DOTAP, Liposomal Transfection Reagent	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
EDTA	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Essigsäure	Merck, Darmstadt, Deutschland
Ethanol absolute	AppliChem GmbH Darmstadt, Deutschland
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
FBS-Gold (Fetales Kälberserum Gold)	PAA - The Cell Culture Company, Cambridge, Großbritannien
FBS-Superior (Fetales Kälberserum)	Biochrom, Berlin, Deutschland
GenRuler, 100 bp / 1 kb Ladder	ThermoFischer Scientific, Waltham, USA
HEPES	PAA – The Cell Culture Company Cambridge, Großbritannien
Isopropanol	Merck, Darmstadt, Deutschland
L-Glutamin 200 Mm	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
LPS (E-Coli)	Sigma- Aldrich, München, Deutschland
MEM not Essential Amino Acids 100x	Gibco [®] , Carlsbad, USA
NaCl	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumbikarbonat	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumhydrogencarbonat	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumhydroxid	Merck, Darmstadt, Deutschland

Natriumpyruvat-Lösung 100 nM	PAA – The Cell Culture Company Cambridge, Großbritannien
PBS	Gibco [®] , Carlsbad, USA
Penicillin (10.000 U/ml) / Streptomycin (10 mg/ml)	Gibco [®] , Carlsbad, USA
Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol 25:4:1	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Protease Inhibitor Cocktail Tablets	Roche, Basel, Schweiz
Proteinase K Solution	Qiagen, Hilden, Deutschland
Rinderserumalbumin	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
RNase Inhibitor	Qiagen, Hilden, Deutschland
Schwefelsäure	Merck, Darmstadt, Deutschland
TaqMan [®] Gene Expression Master Mix	ThermoFischer Scientific, Waltham, USA
TMB Substrat Reagent Set	BD San Diego, Californien, USA
TRIS Hydrochlorid	Serva, Heidelberg, Deutschland
Trizol (TRI-Reagent [®] solution)	Ambion [®] , Carlsbad, Kalifornien
Trypanblau (0,4 %)	Gibco [®] , Carlsbad, USA
Tween [®] 20	Fluka, Steinheim, Deutschland

2.1.2 Puffer und Lösungen

Agarosegel groß	100 ml TAE-Puffer, 1 g Agarose, 10 µl Ethidiumbromid
Agarosegel klein	50 ml TAE-Puffer, 0,5 g Agarose, 5 µl Ethidiumbromid
Coatingbuffer für ELISA	0,1 M Natriumcarbonat-Lösung: 7,13 % Natriumhydrogencarbonat (NaHCO ₃), 1,59 % Natriumcarbonat (Na ₂ CO ₃), (pH = 9,5) pH-Wert-Einstellung mit 10 N Natriumhydroxid (NaOH)

HBS Puffer	20 mM HEPES, 150 mM NaCl, (pH = 7,4)
Lyse Puffer	100 mM TRIS Hydrochlorid, 0,5 mM EDTA, 0,2 % Dodecylsulfat, 200 mM NaCl
Proben-Verdünnungs-Lösung für ELISA	10 % FKS in PBS (pH = 7,0)
Reaktions-Lösung für ELISA	1 % BSA in PBS (pH = 7,2 – 7,4)
TAE-Puffer 1x	40 mM Tris-Base, 1 mM EDTA, 20 mM Essigsäure (pH = 8,5)
Wasch-Puffer für ELISA	PBS-Puffer, 0,05 % Tween®20

2.1.3 Isolations-, Synthese- und Nachweissysteme („Kit's“)

Isolation mitochondrialer DNA:

Mitochondria Isolation Kit for Cultured Cells ThermoFischer Scientific, Waltham, USA

konventionelle PCR:

TaqDNA-Polymerase-Kit Invitrogen, Carlsbad, USA

Reinigung von PCR-Produkten:

High Pure PCR, Product Purification Kit Qiagen, Hilden, Deutschland

Endotoxin-Testung:

Limulus Amebocyte Lysate Lonza, Basel, Schweiz

Synthese komplementärer DNA:

High capacity cDNA Reverse

Transcription Kit

Applied biosystems, Waltham, USA

ELISA-Kit's:

IL-6, BD OptEIA™ Set Human IL-6

BD Biosciences, Franklin Lakes,
New Jersey, USA

IL-10, DouSet® ELISA human IL-10

R&D-Systems, Minneapolis, USA

TNF α , BD OptEIA™ Set Human TNF

BD Biosciences, Franklin Lakes,
New Jersey, USA

2.1.4 Primer und Sonden

Primer für die konventionelle PCR:

ATP-Synthase

Invitrogen, Carlsbad, USA

vorwärts: TCTCCTTCGCCAAAAGCAGG

rückwärts: TGTTTGGTTTTGATGGGACC

COX-IV

Invitrogen, Carlsbad, USA

vorwärts: AGCCTAGTTGGCAAGCGAGCA

rückwärts: GGAGGCTAAGCCCTGGATGGG

Cytochrom-B-Untereinheit

Invitrogen, Carlsbad, USA

vorwärts: ATGACCCCAATACGCAAAT

rückwärts: CGAAGTTTCATCATGCGGAG

Cytochrom-C-Untereinheit

Invitrogen, Carlsbad, USA

vorwärts: ATGACCACCAATCACATGC

rückwärts: ATCACATGGCTAGGCCGGAG

H-Loop L29 Invitrogen, Carlsbad, USA
 CTCACGGGAGCTCTCCATGC

H-Loop H381 Invitrogen, Carlsbad, USA
 GCTGGTGTTAGGGTTCTTTG

NADH-Dehydrogenase Invitrogen, Carlsbad, USA
 vorwärts: ATACCCATGGCCAACCTCCT
 rückwärts: GGGCCTTTGCGTAGTTGTTA

Sequenzen entnommen aus: Homo sapiens mitochondrion, complete genome,
 NCBI Reference Sequence: NC_012920.1

Sonden für die Quantitative Echtzeit-PCR:

IL-6	Hs00174131_m1	ThermoFischer Scientific, Waltham, USA
IL-8	Hs00174103_m1	ThermoFischer Scientific, Waltham, USA
IL-10	Hs00961622_m1	ThermoFischer Scientific, Waltham, USA
IFN β	Hs01077958_s1	ThermoFischer Scientific, Waltham, USA
TNF α	Hs00174128_m1	ThermoFischer Scientific, Waltham, USA

2.1.5 Zelllinien und Nährmedien

Hep G2

Die Hep G2-Zelllinie ist eine humane hepatozelluläre Karzinom-Zelllinie, welche von dem Leberzellkarzinom eines 15-jährigen, männlichen Spenders kaukasischer Herkunft abgeleitet wurde (Wistar Institute, Philadelphia, Pennsylvania).

Cal-1

Die Cal-1-Zelllinie ist eine humane Zelllinie plasmazytoider dendritischer Zellen (pDCs). Sie ist aktuell die einzige Zelllinie, die morphologisch mit pDCs korreliert und deren Reaktionsmuster auf Stimulationsversuche weitestgehend widerspiegeln kann (Steinhagen et al., 2012b). Die für die Versuche dieser Arbeit verwendeten Cal-1-Zellen stammten aus der Arbeitsgruppe von M.D., PhD. D. M. Klinman (Center for Cancer Research, Frederick, Maryland, USA).

Grundmedium:

RPMI 1640 mit L-Glutamin

PAA Laboratories

Pasching, Österreich

Einfriermedium:

Bambanker™

Lymphotec Inc., Tokyo, Japan

Trennmedium:

Bicoll Separation Solution

Biochrom, Berlin, Deutschland

HepG2-Medium:

RPMI 1640

10 % FKS,

Penicillin (10.000 U/ml)/Streptomycin (10 mg/ml)

Cal-1-Medium:

RPMI 1640

1 % bzw., 10 % FCS-Gold

1x MEM

2 mM L-Glutamin

1 mM Natriumpyruvat

2.1.6 CpG-ODN

Als Positivkontrolle für die Stimulationsversuche wurde ein synthetisches CpG-ODN (K-ODN) verwendet. Dieses K-ODN wurde vom Center for Biologics Evaluation and Research core facility (U.S. Food and Drug Administration, Bethesda, Maryland, USA) hergestellt und von der Arbeitsgruppe M.D., PhD. D. M. Klinman (Center for Cancer Research, Frederick, Maryland, USA) zur Verfügung gestellt. Es enthielt ein Gemisch aus drei synthetischen CpG-Sequenzen:

K3: 5'-ATCGACTCTCGAGCGTTCTC-3'

K23: 5'-TCGAGCGTTCTC-3'

K123: 5'-TCGTTTCGTTCTC-3'

Als nicht stimulierende Kontrolle für das K-ODN wurde ODN 1612 verwendet:

5'-GCTAGAGCTTAGGCT-3'

(Steinhagen et al., 2012b)

2.1.7 Geräte

Benchtop UV-Transilluminator	UVP, Cambridge, Großbritannien
Gefrierschrank -20 °C	Bosch, Stuttgart, Deutschland
Gefrierschrank -80 °C	Hettich, Tuttlingen, Deutschland
Inkubator groß Cellstar	Nunc, Wiesbaden, Deutschland
Kühlschrank 4 °C	Bosch, Stuttgart, Deutschland
Lichtmikroskop	Carl Zeiss, Oberkochen, Deutschland
Midi-/Mini-MACS-Magnet	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
Mikrowelle	Severin, Sundern, Deutschland
Mikroplattenphotometer, Asys Expert 96	Biochrom, Berlin, Deutschland
Mikrozentrifuge	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Nanodrop 2000	Pequlab, Erlangen, Deutschland
Sicherheitswerkbank	Waldner, Wangen, Deutschland
Sterile Werkbank, Hera Safe	Unity Lab Service, Waltham, USA
Stromquelle Power Pac 3000	Bio- Rad, München, Deutschland
Thermocycler T3000	Biometra, Göttingen, Deutschland
Thermomixer compact	Eppendorf, Hamburg, Deutschland

Ultraschall Homogenisator Sonopuls	Bandelin, Berlin, Deutschland
ViiA™7	Applied Biosystems, Waltham, USA
Vortex, Genie 2	Bender und Hobein, Zürich, Schweiz
Vortex Genie 2	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Wasserbad Typ 1008	GFL, Burgwedel, Deutschland
Zentrifuge Biofuge pico	Heraeus, Hanau, Deutschland
Zentrifuge 5810R	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Zentrifuge 5415R	Eppendorf, Hamburg, Deutschland

2.1.8 Programme

Layout der quantitativen PCR:

ViiA™7-RUO-Software	Applied Biosystems, Waltham, USA
---------------------	----------------------------------

Berechnungen und Auswertung:

Microsoft Excel 2011	Microsoft Corporation, Redmond, USA
----------------------	-------------------------------------

Statistische Auswertung und grafische Darstellung:

GraphPad Prism 5.02	San Diego, USA
---------------------	----------------

Textverarbeitung:

Microsoft Word 2011	Microsoft Corporation, Redmond, USA
---------------------	-------------------------------------

Abbildungsdesign:

Microsoft Power Point 2011	Microsoft Corporation, Redmond, USA
----------------------------	-------------------------------------

2.2 Methoden

2.2.1 Hep G2-Zellkultur

Für die spätere Isolierung von Mitochondrien und deren DNA wurde eine humane hepatozelluläre Karzinom-Zelllinie kultiviert. Diese Hep G2-Zellkultur wurde in Zellkulturflaschen (mit einer Kulturfläche von 75 cm²) in jeweils 20 ml Nährmedium bei

37 °C, 5 % CO₂ und 100 % Luftfeuchtigkeit in einem Inkubationsschrank gehalten. Die Arbeit an den Zellkulturen fand stets unter einer sterilen Werkbank statt und es wurden nur Materialien verwendet, die sterilisiert bzw. autoklaviert und vorher desinfiziert wurden. Alle genutzten Medien und Substanzen wurden zuvor im Wasserbad auf 37 °C erwärmt. Nährmedium war RPMI 1640 als Grundmedium, das mit 10 % FKS (Fetalem Kälberserum) und Penicillin-Streptomycin-Lösung ergänzt wurde. Etwa alle drei Tage wurde das alte Medium unter der sterilen Werkbank durch frisches ersetzt. In regelmäßigen Abständen wurden die Zellen subkultiviert. Hierzu wurde das alte Medium verworfen und den Zellen 2 ml 1 %-ige Trypsin-Lösung zugegeben. Nach dreiminütiger Inkubation bei 37 °C wurden die Zellen durch Zugabe von 20 ml Nähmedium vollständig gelöst. Jeweils 5 ml der Zellsuspension wurden in frische Zellkulturflaschen mit je 15 ml Nährmedium pipettiert. Waren die Zellkulturflaschen dicht bewachsen und wurden nicht zur Subkultivierung verwendet, wurden die Zellen bis zur späteren Isolation ihrer Mitochondrien eingefroren. Zuerst wurde hierzu das alte Medium verworfen, anschließend 7 ml Einfriermedium hinzugegeben und die Zellen mit einem Zellschaber von dem Flaschenboden gelöst. Die Zellsuspension wurde in ein 50 ml Reaktionsröhrchen überführt und bei -80 °C gelagert.

2.2.2 Cal-1-Zellkultur

Die Kultivierung und die Arbeit an der Cal-1-Zellkultur verliefen unter den zuvor beschriebenen Bedingungen. Das verwendete Nährmedium bestand aus RPMI 1640 als Grundmedium und enthielt 1x MEM, 2 mM L-Glutamin, 1 mM Natriumpyruvat sowie 1 % bzw. 10 % hitzeinaktiviertes FKS. Für die Kultivierung der Zellkultur wurde das Nährmedium mit 10 % FKS, für die Versuche das Nährmedium mit 1 % FKS verwendet. Die tiefgefrorenen Cal-1-Zellen wurden jeweils 6 Tage vor dem Experimentbeginn rekultiviert. Hierzu wurde zunächst die in einem 1 ml Kryoröhrchen befindliche Kultur bei Raumtemperatur erwärmt, bis das Zellmedium sich verflüssigte, und anschließend in einem 50 ml Reaktionsröhrchen mit 10 ml des Mediums mit 10 % FKS resuspendiert. Anschließend wurde die Zellsuspension bei Raumtemperatur 5 Minuten bei 1000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 8 ml frischem Medium mit 10 % FKS resuspendiert. Dann wurden die Zellen in einer 50 ml Zellkulturflasche bei 37 °C im Inkubationsschrank kultiviert. Nach drei Tagen wurde die Zellsuspension in

eine größere Zellkulturflasche mit 250 ml Volumen überführt und weitere 22 ml Medium mit 10 % FKS hinzugefügt. Weitere drei Tage später wurde 1 ml der Zellsuspension aus der Zellkulturflasche entnommen, auf eine Neubauer-Zählkammer pipettiert und unter einem Lichtmikroskop die vitalen Zellen ausgezählt. Daraus konnte die vorhandene Zell/ml errechnet werden. Die restliche Zellsuspension wurde in ein 50 ml Reaktionsröhrchen überführt und unter Raumtemperatur 5 Minuten bei 1300 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen in Versuchsmedium mit 1 % FKS resuspendiert und auf die gewünschte Zellzahl/ml eingestellt. Anschließend konnten die Zellen auf eine Zellkulturplatte mit 24 Vertiefungen (je 1 ml pro Vertiefung) pipettiert und für die Versuchsdurchführung genutzt werden.

2.2.3 Isolation von mononukleären Zellen aus Spenderblut und Buffy Coats

Die Isolation der primären mononukleären Zellen (PBMCs) erfolgte aus Spenderblut sowie aus Buffy Coats des Institutes für experimentelle Hämatologie und Transfusionsmedizin des Universitätsklinikums Bonn. 50ml Spenderblut wurde in 6 EDTA-gefüllte Monovetten (EDTA KD / 9 ml, Sarted Monovette®) abgenommen und unter sterilen Bedingungen mit 0,9%-iger NaCl-Lösung 1:1 verdünnt. Für die Gewinnung der Zellen aus Buffy Coats wurde zuvor das Material der Blutbank durch einen 200 µm-Filter gegeben und anschließend ebenfalls 1:1 mit 0,9 %-iger NaCl-Lösung verdünnt. Die weiteren Schritte wurden für beide Varianten der Probengewinnung angewandt. In vier 50 ml Reaktionsröhrchen wurde jeweils 15 ml Ficoll-Trennmedium vorgegeben. In jedes dieser Röhrchen wurde 25 ml verdünntes Vollblut langsam auf das Ficoll-Trennmedium aufgeschichtet, sodass zwei übereinander gelagerte Phasen entstanden. Es folgte eine 20-minütige Dichtegradientenzentrifugation bei Raumtemperatur und 800 g ohne Bremse. Es resultierte eine Schichtung der unterschiedlichen Blutbestandteile (Abbildung 5). Die Erythrozyten und Granulozyten lagerten sich am Boden des Reaktionsröhrchens ab. Darüber folgte eine Schicht des Trennmediums. Die gewünschten PBMCs (mononukleäre Zellen des peripheren Blutes) bildeten einen schmalen Ring, der auf dem Trennmedium lag und von Blutserum bedeckt wurde, welches die oberste Phase darstellte.

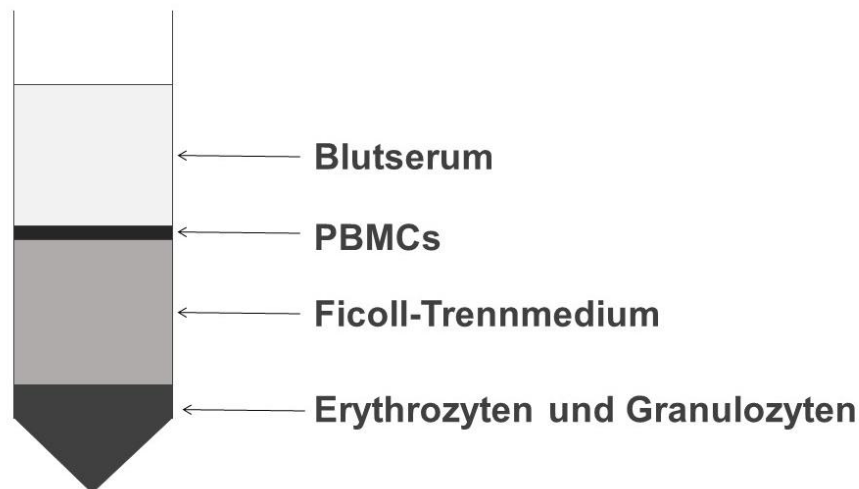


Abb. 5: Auftrennung der Blutbestandteile nach Dichtegradientenzentrifugation
 Nach Schichtung des verdünnten Blutes auf das Ficoll-Trennmedium und erfolgter Dichtegradientenzentrifugation zeigen sich unterschiedliche Phasen. Die oberste Schicht stellt das Blutserum dar. Darunter folgt ein Ring aus PBMCs, welcher auf dem Ficoll-Trennmedium liegt. Erythrozyten und Granulozyten lagern sich am Boden des Reaktionsröhrchens ab. Abb. modifiziert nach Murphy und Weaver (2018).

Der PBMC-Ring wurde vorsichtig durch kreisende Bewegungen abpipettiert und in neue Reaktionsröhrchen überführt. Dabei wurde darauf geachtet, die Erythrozytenschicht unversehrt zulassen. Anschließend wurden die PBMC-enthaltenen Röhrchen bei 4 °C und 400 g, 7 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 20 ml Nährmedium gelöst (RPMI 1640 als Grundmedium mit Zusatz von 10 % hitzeinaktivierten FCS). Es folgte ein zweiter Waschschrift: 7 Minuten Zentrifugation bei 4 °C und 400 g, Verwerfen des Überstandes und erneute Lösung in dem Nährmedium. Um die vitalen Zellen während des späteren Auszählens identifizieren zu können, wurde die Zellsuspension mit Trypanblau (0,4 %) angefärbt. Hierzu wurde eine 1:5-Verdünnung (80 µl Trypanblau und 20 µl Zellsuspension) hergestellt. Im Anschluss konnte die Zellzahl mittels einer Neubauer-Zählkammer erhoben und daraus die Konzentration der PBMCs errechnet werden. Durch Zugabe der fehlenden Menge des Nährmediums konnte so die gewünschte Zellkonzentration eingestellt werden. Es wurde je 1 ml Zellsuspension in die Vertiefungen einer Zellkulturplatte mit 24 Vertiefungen gegeben und die Versuchsdurchführung begonnen.

2.2.4 Isolation mitochondrialer DNA

Für die Gewinnung mitochondrialer DNA (mtDNA) aus den Hep G2 - Zellen mussten zunächst deren Mitochondrien isoliert werden. Hierzu wurde das „Mitochondria Isolation Kit for Cultured Cells“ von ThermoFischer Scientific genutzt, welches drei Reagenzien (A,B und C) enthält. Zunächst wurden die bei -80 °C in 50 ml Reaktionsröhrchen eingefrorenen Hep G2-Zellen auf Eis aufgetaut. Während der weiteren Arbeitsschritte wurden die Zellen stets auf Eis gelagert. Die Zellsuspension wurde 5 Minuten bei 4 °C und 3000 rpm zentrifugiert und der Überstand verworfen. Anschließend wurde 3200 µl des A-Reagenz sowie 32 µl Protease Inhibitor zu den Zellen gegeben und die Lösung mittels eines Reagenzschüttlers durchmischt. Es folgte eine Inkubationszeit von exakt 2 Minuten. Danach wurden 40 µl des B-Reagenz hinzugefügt und die Suspension erneut durchmischt. Während einer anschließenden Inkubationszeit von fünf Minuten wurde die Lösung minütlich auf einen Reagenzschüttler kurz durchmischt. Nach diesen fünf Minuten wurden 3200 µl C-Reagenz und 32 µl Protease Inhibitor dazu pipettiert und das Reaktionsröhrchen vorsichtig invertiert. Die Zellsuspension wurde nun 10 Minuten bei 4 °C und 700 g zentrifugiert. Der Überstand wurde auf fünf 1,5 ml Reaktionsgefäße aufgeteilt. Diese wurden 15 Minuten bei 4 °C und 12.000 g zentrifugiert und der Überstand abpipettiert. Zu dem verbliebenen Rückstand wurden nochmals 500 µl C-Reagenz und 5 µl Protease Inhibitor hinzugegeben. Es folgten ein erneuter Zentrifugationsdurchlauf von 5 Minuten bei 4 °C und 12.000 g und das Verwerfen des Überstandes. Das verbliebene Pellet enthielt die isolierten Mitochondrien. Diese wurden nun bis zur weiteren Verarbeitung bei 4 °C gelagert oder direkt zur DNA-Gewinnung genutzt.

Zur Isolation der mtDNA musste zunächst die mitochondriale Doppelmembran aufgebrochen werden. Hierzu wurden 500 µl Lysepuffer und 2,5 µl Proteinkinase K in die Reaktionsgefäße zu den mitochondrialen Pellets gegeben, die Lösung gut durchmischt und 60 Minuten bei 55 °C inkubiert. Anschließend wurde die Mitochondriensuspension eine Minute bei 4 °C und 13.000 rpm zentrifugiert. Die folgenden Arbeitsschritte erfolgten unter einer Sicherheitswerkbank. Die Überstände wurden in frische 1,5 ml Reaktionsgefäße mit je 500 µl Phenol-Chloroform-Lösung überführt, gut durchmischt und zentrifugiert (1 Minute, 4 °C, 13.000 rpm). Erneut wurden die Überstände in frische 1,5 ml Reaktionsgefäße, diesmal mit 500 µl Chloroform,

pipettiert, invertiert und wie zuvor zentrifugiert. Die Überstände wurden nun in frische Reaktionsgefäße mit 500 µl Isopropanol gegeben und 5 Minuten auf Eis inkubiert. Im Anschluss wurden die Lösungen 15 Minuten bei 4 °C und 13.000 rpm zentrifugiert. Die Überstände wurden verworfen und 500 µl 75 %igen Ethanol hinzugegeben. Es folgte ein letzter Zentrifugationsschritt von 5 Minuten bei 4 °C und 13.000 rpm. Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet mit der mtDNA bei Raumtemperatur getrocknet. Zuletzt wurde 10 µl DEPC-Wasser auf jedes Pellet gegeben und die mtDNA in einem Thermoblock bei 37 °C und 300 rpm für 60 Minuten gelöst. Es folgte die Konzentrationsmessung durch den Nanodrop, ein Spektrophotometer, welches in der Lage ist DNA- und RNA-Konzentrationen auch in geringen Testvolumina zu bestimmen (Abbildung 6). Das Absorptionsmaximum sollte für reine DNA-Proben bei einer Wellenlänge von 260-270 nm liegen (Desjardins und Conklin 2010). Die mtDNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei 4 °C gelagert.

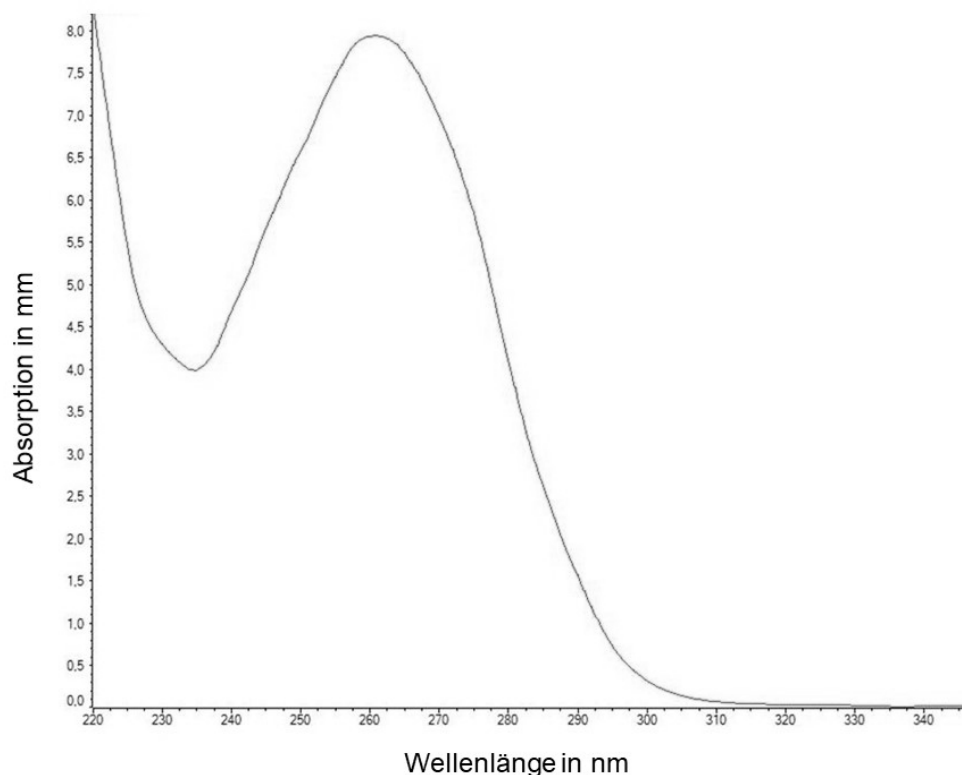


Abb. 6: Absorptionskurve der spektrophotometrischen Konzentrations-Messung von mtDNA

X-Achse: Wellenlänge in nm; Y-Achse: Absorption in mm; hierbei handelt es sich um eine Eigenmessung einer Probe, des für die Versuche verwendeten mtDNA-Bestandes mit einer Konzentration von 439 ng/µl.

2.2.5 Fragmentierung mitochondrialer DNA

Um aus der isolierten nativen mtDNA kürzere Fragmente zu generieren, wurde diese durch Ultraschall mechanisch verkleinert. Zunächst wurden mehrere mtDNA-Proben in einem 2 ml Reaktionsgefäß zusammengeführt. Während der weiteren Durchführung wurde die DNA stetig auf Eis gekühlt. Es folgten drei Durchgänge von 10 Sekunden Dauer, während denen der Ultraschallstab in die Probe gehalten wurde, bis die Lösung anfang zu schäumen. Der Ultraschallstab lief währenddessen auf 30 % seiner Maximalstärke. Anschließend wurde die Größe der erzielten DNA-Fragmente mit Hilfe der Gelelektrophorese mit der nativen mtDNA verglichen und bis zu ihrer weiteren Verwendung bei 4 °C gelagert.

2.2.6 Konventionelle PCR

Für die Vervielfältigung spezifischer mitochondrialer Gene wurde die Methode der qualitativen oder auch konventionellen Polymerase-Kettenreaktion gewählt. Mit dieser Methode können DNA-Abschnitte mittels spezifischer Primer, Nucleotide und der Taq-DNA-Polymerase amplifiziert werden (Mullis et al., 1986). Hierzu wurde das TaqPolymerase-Kit von Invitrogen genutzt. Zunächst wurde für jedes mitochondriale Zielgen ein Master Mix angesetzt. Dieser enthielt pro Probe 5 µl 10 x Puffer, 5 µl dNTP's, 1,5 µl MgCl₂, 1 µl 5'-Primer, 1 µl 3'-Primer, 0,2 µl TaqDNA-Polymerase und 33 µl destilliertes Wasser. Anschließend wurde in 0,2 µl Reaktionsgefäße 1 µl der mtDNA pipettiert und anschließend 46 µl Master Mix hinzugefügt. Für jedes Zielgen wurde zudem eine Negativkontrolle mit 1 µl destilliertem Wasser angefertigt. Die Lösungen wurden gut durchmischt und in einem Kurzzeitlauf in der Zentrifuge abzentrifugiert. Der Ablauf der PCR verlief auf einem Thermoblock in folgenden Zyklen:

1. Denaturierung	93 °C	45 Sekunden	
2. Hybridisierung	59 °C	30 Sekunden	} 40 x
3. Elongation	72 °C	1 Minute	

Die fertigen PCR-Genprodukte wurden bis zur weiteren Verwendung bei 4 °C gelagert.

2.2.7 PCR-Produkt Aufreinigung

Bevor die PCR-Produkte der mitochondrialen Gene für die Versuchsdurchführung genutzt wurden, mussten diese zunächst aufgereinigt werden. Es wurde das „High Pure PCR – Product Purification Kit“ von Qiagen verwendet, welches spezielle Filter- und Sammelröhrchen für die Zentrifuge sowie einen Bindepuffer, einen Waschpuffer und einen Lösungspuffer enthielt. Zunächst wurden 250 µl des Bindepuffers mit 50 µl des PCR-Produktes vermischt und je ein Filterröhrchen in ein Sammelröhrchen gesetzt. Anschließend wurde das Puffer-PCR-Produkt-Gemisch in das Filterröhrchen pipettiert und dieses bei Raumtemperatur, 1 Minute bei 13.000 rpm zentrifugiert. Der Durchfluss im Sammelröhrchen wurde verworfen, 250 µl Waschpuffer wurden in das Filterröhrchen gegeben und dieses unter denselben Bedingungen erneut zentrifugiert. Dieser Waschschrift wurde ein zweites Mal wiederholt – diesmal jedoch nur mit 100 µl Waschpuffer. Das Filterröhrchen wurde in ein frisches 1,5 ml Reaktionsgefäß gesetzt. Nun wurden 50 µl Lösungspuffer hinein pipettiert. Diesem Schritt folgte ein letzter Zentrifugationsschritt. Das Filterröhrchen wurde verworfen. Der Durchfluss enthielt das gereinigte PCR-Produkt. Die replizierten mitochondrialen Gene konnten nun durch die Gelelektrophorese visualisiert werden und wurden anschließend bei 4 °C gelagert.

2.2.8 Agarosegel-Elektrophorese

Zur bildlichen Dokumentation der mtDNA in ihren unterschiedlichen Zustandsformen (nativ, fragmentiert sowie als PCR-Produkte) wurde die Methode der Gelelektrophorese genutzt. Für die Herstellung des Gels (groß/klein) wurde 1 g bzw. 0,5 g Agarosepulver in 100 ml bzw. 50 ml 1 x TAE-Puffer gelöst und drei Minuten in einer Mikrowelle zum Kochen gebracht. Der verdunstete Flüssigkeitsanteil wurde anschließend mit destilliertem Wasser aufgefüllt und die Lösung nochmals eine Minute erhitzt. Anschließend wurden 10 µl bzw. 5 µl Ethidiumbromid dazu pipettiert und durch mehrmaliges Schwenken gelöst. Die Lösung wurde in eine 13 x 11,5 cm² bzw. eine 10 x 9 cm² große Form gegossen und ein Kamm für die Bildung von Geltaschen eingesetzt. Zum Erkalten benötigte das Gel 20 Minuten. Danach wurde der Kamm entfernt und das Gel in eine Gelkammer mit elektrischen Polen gelegt, sodass die Geltaschen an der negativ geladenen Kathode lagen. Die Gelkammer wurde zur Hälfte mit TAE-Puffer gefüllt und die Geltaschen mit den verschiedenen mtDNA-Präparationen beladen. In der

ersten oder letzten Tasche pro Reihe wurde jeweils eine DNA-Leiter mit 100 bp bzw. 1 kb als Größenstandard gegeben. Das Gel wurde zwei Minuten mit 100 mA unter Spannung gelegt und dann die Kammer komplett mit TAE-Puffer gefüllt. Anschließend wurde das Gel weitere 25 Minuten mit 100 mA unter Spannung gelegt. Die negativ geladene mtDNA bewegte sich dadurch von der negativen Kathode in Richtung positiv geladene Anode. In einer UV-Lichtkammer konnten die DNA-Banden schließlich sichtbar gemacht werden (Abbildung 7 und 8). Je kleiner die mtDNA-Fragmente waren, desto schneller bewegten sie sich durch das Agarosegel. Demnach konnten die kleineren mtDNA-Fragmente als näher an der Anode lokalisierte Banden dargestellt werden.

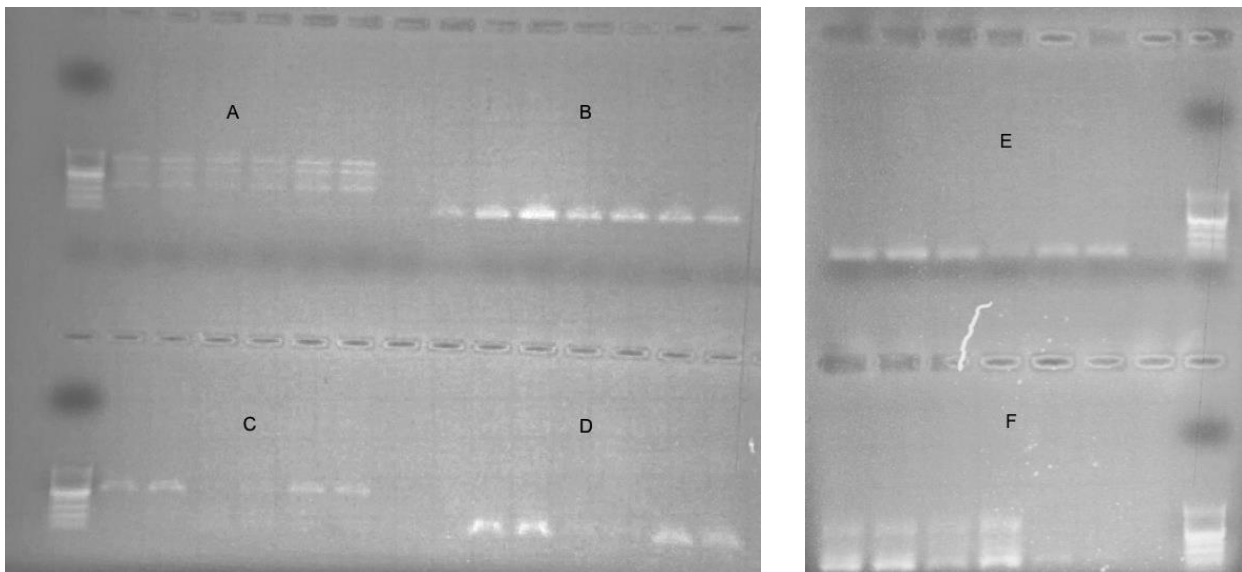


Abb. 7: Agarose-Gelelektrophorese mitochondrialer PCR-Genprodukte

A) H-Loop L29 / L381; B) NADH-Dehydrogenase; C) ATP-Synthase; D) Cytochrom-B-Untereinheit; E) Cytochrom-C-Untereinheit F) Cytochrom-C-Oxidase IV als nukleäres Gen zur Evaluation des Reinheitsgrades. Zum Größenvergleich dient eine 100 bp DNA-Leiter

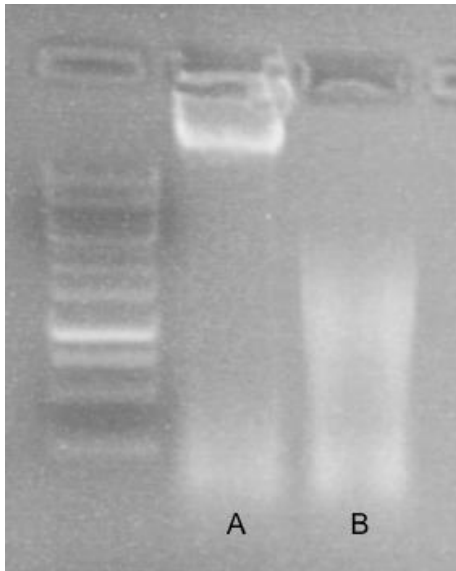


Abb. 8: Agarose-Gelelektrophorese der mtDNA
 A) native mtDNA; B) durch Ultraschall fragmentierte mtDNA.
 Zum Größenvergleich dient eine 1 kb DNA-Leiter

2.2.9 Endotoxin-Testung

Zur Testung der für die Versuche verwendeten Substanzen auf Kontamination mit bakteriellen Endotoxinen wurde der Limulus-Amöbozyten-Lysat-Test (LAL-Test) von Lonza angewandt. Das Kit enthielt Limulus-Amöbozyten-Lysat, LAL-Reagenz-Wasser, chromogenes Substrat und E. coli Endotoxin. Die Stammlösungen wurden nach Herstellerprotokoll erstellt und von der Endotoxinlösung eine Verdünnungsreihe angesetzt (1,0; 0,5; 0,25; 0,1 EU/ml). Die Durchführung des Testes erfolgte bei 37 °C. In die Vertiefungen einer Reaktionsplatte mit 96 Vertiefungen wurden je 50 µl der zu testenden Substanz bzw. der Endotoxin-Lösungen (Positivkontrolle) und anschließend je 50 µl LAL pipettiert und 10 Minuten inkubiert. Jede Probe wurde in Duplikaten getestet. Nach Inkubation wurde 100 µl der chromogenen Substrat-Lösung hinzugegeben und erneut 6 Minuten inkubiert. Schließlich wurde die Reaktion mit 25 %-iger Essigsäure gestoppt und die Platte bei 405 - 410 nm im Mikroplattenphotometer ausgelesen. So konnten im Vergleich zu der Endotoxin-Verdünnungsreihe die Konzentration von kontaminierendem Endotoxin identifiziert werden.

2.2.10 Transfektion mitochondrialer DNA in Zellen

Um die Aufnahme von mitochondrialer DNA in Cal-1-Zellen zu unterstützen, wurde in einer Versuchsreihe die Transfektion der mtDNA mittels DOTAP durchgeführt. Zunächst wurde die gewünschte Menge mtDNA mit 10 %-igen HBS auf ein Gesamtvolumen von 50 µl aufgefüllt und darin gelöst. Dasselbe geschah mit CpG-ODN als positiver Kontrolle. In zwei sterilen 2 ml Reaktionsröhrchen wurden 30 µl DOTAP in 70 µl HBS-Puffer gelöst und die 50 µl mtDNA- bzw. CpG-ODN-Lösung hinzu pipettiert. Die Lösungen wurden bei Raumtemperatur 10 Minuten inkubiert und konnten anschließend für die Versuchsdurchführung genutzt werden. Es sollten allerdings nie mehr als 30 µl DOTAP-Lösung pro Milliliter Zellmedium für die Transfektion verwendet werden.

2.2.11 RNA-Isolation

Für die Isolation der RNA wurden die Zellen nach Beendigung der Versuchsdurchführung in ein 2 ml Reaktionsgefäß gegeben und 5 Minuten bei Raumtemperatur und 165 g zentrifugiert. Die Überstände wurden zur späteren Analyse der Proteinfreisetzung mittels ELISA bei -80 °C aufbewahrt.

Die gesamte Präparation der RNA erfolgte unter einer Sicherheitswerkbank. Auf das Zellpellet wurde 500 µl Trizol (ein RNA-Isolationsreagenz) gegeben und mit der Pipette gut durchmischt, bis das Pellet vollständig gelöst war. Die Lösung wurde bei Raumtemperatur 5 Minuten inkubiert und daraufhin 200 µl Chloroform hinzu pipettiert. Die Probe wurde auf einem Reagenzschüttler gemischt und erneut 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, sowie 15 Minuten bei 4 °C und 12.000 g zentrifugiert. Nach der Zentrifugation waren im Reaktionsgefäß drei Phasen erkennbar: die obere klare wässrige Phase enthielt die RNA, die unterhalb der weißlichen Trennphase liegende pinkfarbene organische Phase beinhaltete die zellulären Proteine und Lipide. Die DNA befand sich in der weißlichen Trennphase. Die obere Phase wurde vorsichtig abpipettiert und in ein frisches 1,5 ml Reaktionsgefäß mit 500 µl Isopropanol gegeben, um die RNA zu fällen. Die Proben wurden invertiert, bis kleine Bläschen in der Lösung aufstiegen. Anschließend wurden sie bei Raumtemperatur 10 Minuten inkubiert und danach 8 Minuten bei derselben Temperatur und 12.000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und 1 ml 75 %-iger Ethanol auf das RNA-Pellet gegeben. Es folgte ein weiterer Zentrifugationsgang bei Raumtemperatur und 7500 g für 5 Minuten. Der

Überstand wurde erneut verworfen und das Pellet unter dem Abzug 20 Minuten getrocknet. Abschließend wurde die RNA in 12 µl DEPC-Wasser gelöst und die Konzentration mittels Nanodrop gemessen.

Die RNA-Proben wurden bis zur weiteren Verarbeitung bei -80 °C eingefroren.

2.2.12 Synthese komplementärer DNA

Für die Synthese von komplementärer DNA (cDNA) aus der zuvor Isolierten RNA wurde das „High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit“ von Applied biosystems™ genutzt. Das Kit enthielt 10 x Reverse-Transkriptase-Puffer, 10 x Reverse-Transkriptase-Primer, 25 x dNTP-Mix (100 mM) und die Reverse Transkriptase (MultiScribe®) 50 U/l.

Zuerst wurde das benötigte Volumen der RNA-Proben, je nach gemessener Konzentration, sowie die fehlende Menge an DEPC-Wasser berechnet, um eine Zielkonzentration von 2000 ng RNA / 25 µl zu erreichen. Zeitgleich wurden die RNA-Proben auf Eis zum Tauen gebracht. Im Anschluss wurden die Proben auf einem Reagenzschüttler durchmischt und abzentrifugiert. In 0,2 ml Reaktionsgefäße wurde anschließend, für jede Probe spezifisch, das errechnete Volumen der gelösten RNA und das gewünschte Volumen DEPC-Wasser pipettiert. Daraufhin wurden 25 µl Master Mix (5 µl Reverse-Transkriptase-Puffer, 2 µl dNTPs, 5 µl Primer, 2,5 µl Reverse Transkriptase, 1 µl RNase Inhibitor, 9,5 µl DEPC-Wasser) pro RNA-Probe angesetzt, in die Reaktionsröhrchen gegeben und gut durchmischt. In einem Thermocycler durchliefen die Proben zunächst eine 10-minütige Phase bei 25 °C und inkubierten dann 120 Minuten bei 37 °C. In diesem Schritt wurde die cDNA synthetisiert. Im letzten Schritt wurden die Proben nochmals 5 Minuten auf 85 °C erhitzt. Die fertige cDNA wurde bei 4 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

2.2.13 Quantitative Echtzeit-PCR

Für die Betrachtung der zellulären Genexpression wurde das Verfahren der Quantitativen Echtzeit-PCR nach Bustin et al. (2000) genutzt. Dazu wurde das PCR-System ViiA™7, basierend auf dem TaqMan™-PCR-Prinzip, verwendet (Abbildung 9).

Zunächst wurde mittels der ViiA™7-Software ein Layout der für den PCR-Durchlauf benötigten 384er-Mikrotiterplatte erstellt. In diesem Rahmen wurde zugleich GAPDH als konstitutiv exprimiertes Gen und somit als Vergleichsgröße zu dem Zielgen definiert.

Des Weiteren wurde eine 1:5-Verdünnung der gewünschten cDNA-Proben hergestellt. Es wurde für GAPDH und jedes weitere gewünschte Zielgen eine spezielle Master-Mix-Lösung (je Probe: 16,83 μ l TaqMan[®] Gene Expression Master Mix, 1,68 μ l Sonde, 8,49 μ l DEPC-Wasser) vorbereitet. Da die TaqMan-Sonden lichtempfindlich sind, wurde ab diesem Arbeitsschritt unter Ausschluss des Tageslichts und möglichst wenig künstlicher Lichtquelle gearbeitet. Anschließend wurde in jede Vertiefung einer Mikrotiterplatte mit 384 Vertiefungen je 9 μ l Master-Mix-Sonden-Gemisch und 2,2 μ l der cDNA-Proben pipettiert. Für jede Probe wurden je Sonde drei technische Replikate erstellt. Die Mikrotiterplatte wurde mit einer Folie sauber beklebt und lichtgeschützt bis zur Durchführung der Echtzeit-PCR bei 4 °C gelagert.

Die PCR durchlief folgende Phasen:

1. Erwärmung	50 °C	2 Minuten	
2. Initiale Denaturierung	95 °C -	10 Minuten	
3. Denaturierung	95 °C -	15 Sekunde	} 40 x
4. Elongation	60 °C -	1 Minute	

Nach jedem Amplifikationszyklus wurde der Grad der Fluoreszenz gemessen, der mit der Anzahl der replizierten PCR-Produkte korrelierte. Als Messwert wurde der Fluoreszenz-Schwellenwert (CT-Wert) ermittelt, der die Anzahl der Amplifikationszyklen angab, nach der eine relevante Fluoreszenz gemessen werden konnte.

Die Auswertung der Echtzeit-PCR-Daten wurde nach der Delta-Delta-CT-Methode durchgeführt (Yuan et al.; 2008). Zunächst wurde der CT-Mittelwert aus den technischen Triplikaten jeder Probe berechnet. Anschließend wurde der CT-Wert jedes Zielgens in Beziehung zu GAPDH als Vergleichsgröße gesetzt (Δ CT = CT(Zielgen) – CT(GAPDH)). Im nächsten Schritt wurde der Δ CT-Wert jeder Probe mit dem Δ CT-Mittelwert der Kontrollproben verglichen ($\Delta\Delta$ CT = Δ CT(Probe) - Δ CT(Mittelwert der Kontrollproben)). Zum Schluss wurde der relative Quantifikationswert errechnet ($RQ = 2^{-\Delta\Delta CT}$), durch welchen beurteilt werden konnte, wie viel mehr das Zielgen im Vergleich zu dem konstitutiv exprimierten GAPDH und der negativ Kontrollprobe ausgeprägt wurde.

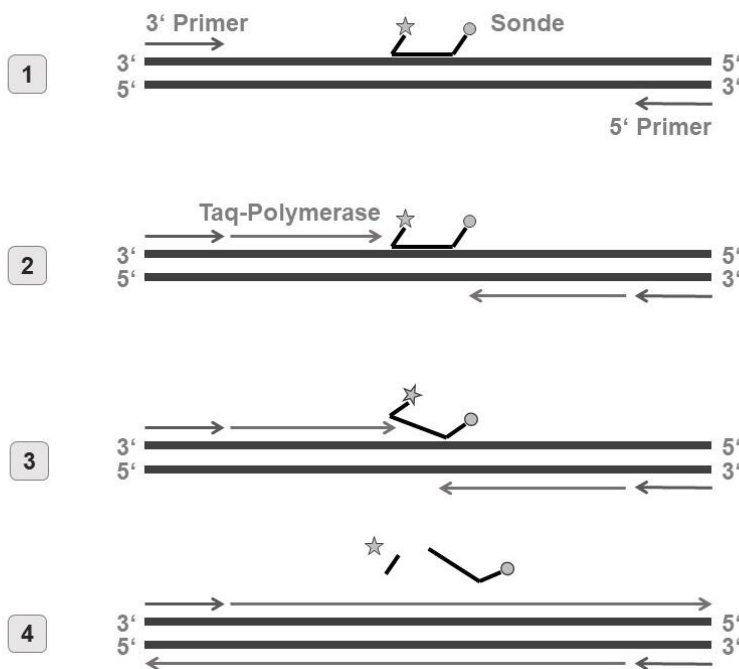


Abb. 9: Funktionsprinzip der quantitativen Echtzeit-PCR

1) Anlagerung der Primer an die DNA mit gebundener TaqMan-Sonde, welche mit einem Fluoreszenzfarbstoff (Stern) und einem Fluoreszenzshemmer (Kreis) versehen ist, bei intakter Sonde wird somit die Fluoreszenz unterdrückt; 2) Beginn der Polymerasekettenreaktion 3) Abspaltung der Sonde von der DNA durch die Polymerase-Aktivität 4) Freisetzung des Fluoreszenzfarbstoffes; Abb. modifiziert nach MVZ Martinsried GmbH, Zentrum für Humangenetik und Laboratoriumsdiagnostik (2020).

2.2.14 ELISA

Um nachzuweisen, welche Proteine die Zellen aufgrund der Versuchsstimulation effektiv sezernierten, wurde die Methode der enzymatischen Immunabsorption (ELISA) angewandt. Aufgrund seiner starken Effektivität wurde dazu das Verfahren des Sandwich-ELISAs gewählt. In diesem Verfahren wird das nachzuweisende Protein zunächst mit Hilfe eines ersten Antikörpers gebunden (Abbildung 10). Ein zweiter Antikörper detektiert im nächsten Schritt das gebundene Protein, wodurch ein Antikörper-Protein-Antikörper-Komplex entsteht. Der Zweite Antikörper ist zudem über das Molekül Biotin an das Enzym Meerrettich-Peroxidas gekoppelt. Dieses Enzym kann ein chromogenes Substrate (Tetramethylbenzidin) umsetzen, wodurch es zu einem Farbumschlag kommt, der proportional zu der vorhandenen Proteinmenge ist. Mit Hilfe einer Standard-Verdünnungsreihe kann letztlich der Proteingehalt bestimmt werden.

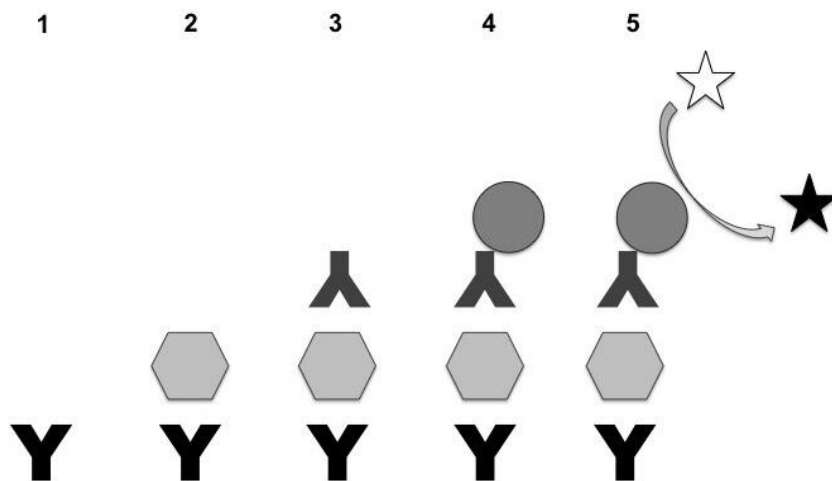


Abb. 10: Funktionsprinzip eines Sandwich-ELISA

1) Festsetzen von AK₁; 2) Bindung des Proteins an AK₁; 3) Detektion durch AK₂; 4) Bindung des Enzyms an AK₂; 5) Farbumschlag durch Zugabe des chromogenen Substrates; Abb. modifiziert nach Sino Biological (2020).

IL-6/TNF α ELISA

Für die Durchführung des IL-6 bzw. TNF α ELISAs wurde das „BD O ptEIA™ Set Human IL6/TNF“ von BD Biosciences verwendet. Das Kit enthielt neben dem Antikörper zur Beschichtung der Reaktionsplatten und dem biotinylierten Antikörper für die Detektion von IL-6/TNF das Enzym Streptavidin-Meerrettich-Peroxidase und einen Standard in Form von rekombinanten IL-6 bzw. TNF. Zunächst wurden der Beschichtungs-Puffer, die Proben-Verdünnungslösung und der Waschpuffer wie im Herstellerprotokoll vorgegeben angesetzt (Absatz 2.1.2.). Zudem wurde eine Standard-Verdünnungsreihe erstellt (IL-6: 300/150/75/37,5/18,8/9,4/4,7 pg/ml bzw.: TNF: 500/250/125/62,5/31,3/15,6/7,8 pg/ml). Eine Mikrotiterplatte mit 96 Vertiefungen wurde zunächst mit dem ersten Antikörper beschichtet. Hierzu wurden 100 μ l in Beschichtungs-Puffer gelöster Antikörper (1:500) in jede Vertiefung pipettiert, die Platte mit Folie beklebt und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Überstände verworfen und die Vertiefungen dreimal mit je 300 μ l Wasch-Puffer gewaschen. Nach jedem Waschschrift wurde die Platte invertiert und der Wasch-Puffer ausgeklopft. Anschließend wurden 200 μ l Proben-Verdünnungslösung in jede Vertiefung gegeben und eine Stunde inkubiert. Mit diesem Blockierungsschritt, in welchem ungebundene Stellen abgedeckt wurden, sollten falsch-positive Ergebnisse verhindert

werden. Es folgten erneut drei Waschschritte. Nun wurden in die ersten zwei Spalten der Platte 100 µl pro Vertiefung der Standard-Verdünnungsreihe pipettiert. In die restlichen Vertiefungen wurden je 100 µl der zu testenden Überstände der Zellstimulationsversuche gegeben. Jede Probe sowie die Standardreihe wurden in Duplikaten getestet. Die Platte wurde zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend fünfmal gewaschen. Der Detektionsantikörper wurde 1:500 in der Proben-Verdünnungslösung verdünnt. In dieser Lösung wurde im Anschluss die Streptavidin-Meerrettich-Peroxidase im Verhältnis 1:500 verdünnt. In jede Vertiefung der Mikrotiterplatte wurden 100 µl Antikörper-Enzym-Lösung pipettiert und eine Stunde inkubiert. Die Überstände wurden verworfen und die Vertiefungen siebenmal mit Wasch-Puffer gewaschen. Es folgte die Zugabe von 100 µl chromogenem Substrat (für diesen und alle folgenden ELISA: TMB Substrat Reagent Set, BD) und eine 30-minütige Inkubation im Dunkeln. Zum Schluss wurde die Reaktion mit 50 µl Schwefelsäure (2N H₂SO₄) gestoppt. Es folgte die Absorptionsmessung mit einem Mikroplattenphotometer bei einer Wellenlänge von 450 nm. Aufgrund der optischen Messunsicherheit (ausgelöst durch die Eigenabsorption der Mikrotiterplatte und der verwendeten Lösungen) wurde eine Wellenlängenkorrektur bei 570 nm durchgeführt (Messwert_{450 nm} – Messwert_{570 nm}). Mit Hilfe der Standardreihe konnte der Gehalt an IL-6 bzw. TNFα in den Überständen der Zellstimulation berechnet werden.

IL-10 ELISA

Für den Nachweis von IL-10 in den Überständen der Zellstimulationsversuche wurde das Kit „DuoSet ELISA human IL-10“ von R&D Systems verwendet. Dieses enthielt den Antikörper zum Beschichten der Mikrotiterplatte, den biotinylierten Detektionsantikörper, den Vergleichsstandard in Form von rekombinanten IL-10 und die Streptavidin-Meerrettich-Peroxidase. Zunächst wurden der Wasch-Puffer und die Reaktionslösung wie im Herstellerprotokoll beschrieben erstellt (Absatz 2.1.2.). Zudem wurde der erste Antikörper zum Beschichten der Reaktionsplatte in PBS auf eine Konzentration von 2,0 µg/ml verdünnt und eine Standard-Verdünnungsreihe erstellt (2000/1000/500/250/125/62,5/32,5 pg/ml). Im Anschluss wurde in jede Vertiefung einer 96er-Mikrotiterplatte 100 µl des gelösten ersten Antikörpers gegeben und diese über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Während dieser und allen folgenden

Inkubationszeiten wurde die Platte mit Folie beklebt. Am Folgetag wurde der Überstand verworfen und die Vertiefungen dreimal mit je 400 µl Wasch-Puffer gespült. Für den Blockierungsschritt wurde 300 µl Reaktions-Lösung in jede Vertiefung pipettiert und eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Der vorher beschriebene Waschschrift wurde nun wiederholt. Es wurden 100 µl der Standard-Verdünnungsreihe und der jeweiligen Überstände der Zellstimulationsversuche in Duplikaten in die Vertiefungen pipettiert. Nach zweistündiger Inkubation wurden die Platte erneut, wie zuvor beschrieben, gewaschen und 100 µl Detektionsantikörper (150 ng/ml in Reaktions-Lösung) in jede Vertiefung gegeben. Nach zwei weiteren Stunden Inkubation und einem Waschlurchlauf wurde die Streptavidin-Meerrettich-Peroxidase 1:200 in der Reaktions-Lösung verdünnt. Von dieser Verdünnung wurden jeweils 100 µl in die Vertiefungen pipettiert. Bei Raumtemperatur erfolgte eine 20-minütige Inkubation mit anschließendem Waschschrift. In jede Vertiefung wurde 100 µl chromogenes Substrat gegeben und die Platte weitere 20 Minuten an einem lichtgeschützten Ort gelegt. Schließlich wurde die Reaktion mit 50 µl (2N) H₂SO₄ gestoppt. Die Absorptionmessung und Berechnung der IL-10 Konzentration erfolgte wie zuvor beschrieben.

2.2.15 Statistische Auswertung der Versuchsdaten

Die durch die Echtzeit-PCR erhobenen CT-Werte wurden in „Microsoft Excel 2011“ kopiert. Mit Hilfe einer vorgegebenen Berechnungstabelle wurden aus den Ct-Werten die Delta-Delta-CT-Werte ermittelt (Absatz 2.2.14.). Die so berechneten RQ-Werte wurden anschließend mit dem Programm „GraphPad Prism 5.02“ statistisch ausgewertet und graphisch dargestellt. Die Proteinkonzentrationsmesswerte der ELISA-Durchführungen wurden ebenfalls mit „GraphPad Prism 5.02“ ausgewertet. In den graphischen Darstellungen wurden alle Ergebnisse als Mittelwert ± den mittleren Standardfehler (SEM) angegeben. Die erste Varianzanalyse der Daten wurde mit einem einfaktoriellen ANOVA durchgeführt. Es folgte ein Tukey-Test als Post-hoc-Testung. Ab einem Signifikanzwert (P-Wert) von <0,05 wurde ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Messergebnissen angenommen und dieser in den Graphiken mit dem Symbol * gekennzeichnet. Ein p-Wert <0,01 erhielt ** sowie ein P-Wert <0,001 das Zeichen ***.

3. Ergebnisse

3.1 Cal-1 Stimulationsversuche

Für die ersten Versuche wurde die Zelllinie Cal-1 als Testsystem für dendritische Zellen ausgewählt. Die Cal-1-Zellen wurden nach Zugabe der Stimulantien bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Da in Pilotversuchen K-ODN bereits nach 3 Stunden Inkubation schon einen deutlichen proinflammatorischen Effekt aufwies, sollte zu Beginn die schnelle Zellantwort untersucht werden.

3.1.1 Stimulation mit nativer mitochondrialer DNA

Zunächst wurde die Wirkung nativer, unbehandelter mitochondrialer DNA auf die Cal-1-Zellen untersucht. $0,4 \times 10^6$ Zellen wurden dazu in 1 ml Nährmedium resuspendiert und jeweils in die Vertiefungen einer 24er-Zellkulturplatte gegeben. Anschließend wurden diese mit 1 µM CpG-ODN oder 5 µg mtDNA stimuliert und 3 Stunden inkubiert. Eine Kontrollgruppe blieb ohne Stimulation. Nach Versuchsbeendigung wurde die RNA der Cal-1-Zellen isoliert und anschließend in cDNA umgeschrieben. Zur Quantifizierung der Zielgenexpression von IL-6 und IFNβ erfolgte eine Echtzeit-PCR. Im Vergleich zu der Kontrollgruppe zeigten die mit CpG-ODN stimulierten Zellen nach 3-stündiger Inkubation eine signifikante, um mehr als das 300-fach erhöhte Genexpression für IL-6 und um mehr als das 600-fache für IFNβ (Abbildung 11). Eine entsprechend starke Antwort konnte durch die Stimulation mit mitochondrialer DNA nicht erreicht werden. Im Vergleich zu der Kontrollgruppe zeigte sich nur eine gering erhöhte Expression der Zielgene um das 1,5-fache.

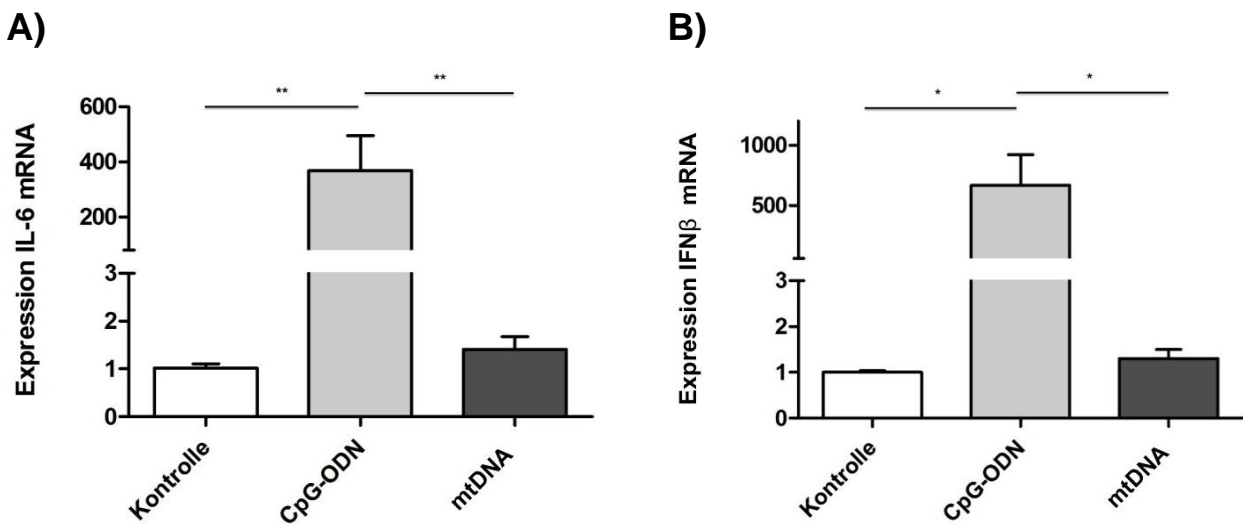


Abb. 11: IL-6 und IFN β Expression nach Stimulation der Cal-1-Zellen

Cal-1-Zellen ($0,4 \times 10^6$ pro Vertiefung einer 24er-Zellkultur-Platte in 1 ml Nährmedium) wurden drei Stunden nach Zugabe von $1 \mu\text{M}$ CpG-ODN bzw. $5 \mu\text{g}$ mtDNA bei 37°C und 5% CO_2 inkubiert. Nach RNA-Präparation und cDNA-Synthese wurde eine Echtzeit PCR durchgeführt und mit Hilfe der $\Delta\Delta\text{CT}$ -Methode die Expression der Zielgen mRNA im Verhältnis zu der unbehandelten Kontrollgruppe bestimmt. Darstellung der Mittelwerte \pm SEM von A) IL-6; $n=7$ Proben aus 5 unabhängigen Versuchen. $**p < 0,01$; und B) IFN β ; $n=7$ Proben (Kontrolle und mtDNA) bzw. $n=8$ Proben (CpG-ODN) aus 5 unabhängigen Versuchen. $*p < 0,05$; Varianzanalyse durch einfaktoriellen ANOVA, multipler Mittelwertsvergleich durch Tukey-Test. Ein Test-Wert der CpG-ODN-Stimulationsreihe von A) wurde durch den Grubbs-Test als Ausreißer identifiziert ($p < 0,05$) und aus der weiteren Auswertung ausgeschlossen.

3.1.2 Stimulation mit fragmentierter mitochondrialer DNA

Da nach der Stimulation der Cal-1-Zellen mit nativer mitochondrialer DNA keine signifikante Regulation der IL-6 und IFN β Genexpression beobachtet werden konnte, wurde die Vermutung aufgestellt, dass die DNA-Segmente zu groß seien, um von der Zelle aufgenommen zu werden. Mittels Ultraschall wurde, wie im Absatz 2.2.6. beschrieben, die mtDNA in kleinere Fragmente geteilt. Diese konnten anschließend mit Hilfe einer Gelelektrophorese sichtbar gemacht werden. Es zeigte sich ein deutlicher Unterschied zwischen der Größe der nativen mtDNA und den kleineren DNA-Fragmenten (Abbildung 8). Es wurden nun jeweils $0,4 \times 10^6$ Cal-1-Zellen in 1 ml Nährmedium resuspendiert und in die Vertiefungen einer 24er-Zellkulturplatte pipettiert. Die Stimulation erfolgte wie zuvor beschrieben entweder mit $1 \mu\text{M}$ CpG-ODN oder mit $5 \mu\text{g}$ nativer mtDNA. Zudem wurden in diesen Versuchsreihen noch einer weiteren

Gruppe 5 µg fragmentierte mtDNA zugegeben. Eine Kontrollgruppe verblieb wieder ohne Stimulation. Die Zellen wurden bei 37 °C drei Stunden lang inkubiert. Anschließend erfolgte die Präparation der RNA und die Umschreibung in cDNA. Mittels Echtzeit PCR wurde die Expression der Zielgene IL-6 und IFNβ untersucht. Es imponierte wie schon in der ersten Versuchsreihe eine deutliche Hochregulation der Genexpression nach Stimulation mit CpG-ODN. Erneut konnte dieser Effekt durch native mitochondriale DNA nicht erreicht werden (Abbildung 12). Hiernach zeigte sich wiederholt nur eine geringe, nicht signifikante Erhöhung der Genexpression. In der Zellreihe, welche mit mtDNA Fragmenten behandelt wurde, fand sich ebenso eine nur geringe Zellantwort ohne statistische Signifikanz.

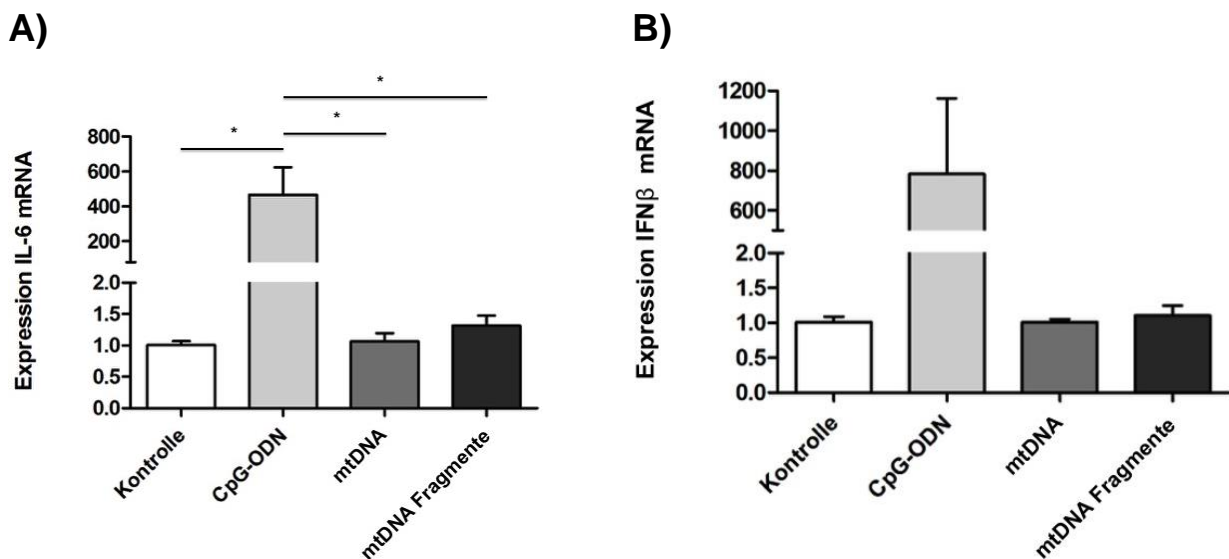


Abb. 12: IL-6 und IFNβ Expression nach Stimulation der Cal-1-Zellen mit fragmentierter mtDNA

Cal-1-Zellen ($0,4 \times 10^6$ pro Vertiefung einer 24er-Zellkultur-Platte in 1 ml Nährmedium) wurden drei Stunden nach Zugabe von 1 µM CpG-ODN bzw. 5 µg mtDNA oder 5 µg fragmentierter mtDNA bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Nach RNA-Präparation und cDNA-Synthese wurde eine Echtzeit PCR durchgeführt und mit Hilfe der $\Delta\Delta CT$ -Methode die Expression der Zielgen mRNA im Verhältnis zu der unbehandelten Kontrollgruppe bestimmt. Darstellung der Mittelwerte \pm SEM von A) IL-6; n=5 Proben (Kontrolle, CpG-ODN und mtDNA) bzw. n=3 (mtDNA Fragmente) aus 3 unabhängigen Versuchen. *p < 0,05; und B) IFNβ; n=5 Proben (Kontrolle, CpG-ODN und mtDNA) bzw. n=3 Proben (mtDNA Fragmente) aus 3 unabhängigen Versuchen; Varianzanalyse durch einfaktoriellen ANOVA, multipler Mittelwertvergleich durch Tukey-Test.

3.1.3 Stimulation mit mitochondrialen PCR-Produkten

Da die fragmentierte mitochondriale DNA ebenfalls keine signifikante Erhöhung der Genexpression erreichte, wurde eine Methode gesucht, noch kleineren Fragmente der mitochondrialen DNA für die Versuchsdurchführung zu nutzen. Hierzu wurden vier für die mitochondriale DNA spezifische Gene ausgewählt: H-Loop 162, H-Loop 381 sowie die Gene der NADH-Dehydrogenase und der ATP-Synthase. Mittels konventioneller Polymerase-Kettenreaktion erfolgte die Amplifikation der entsprechenden mtDNA-Abschnitte. Anschließend wurden die PCR-Produkte aufgereinigt und mit Hilfe einer Gelelektrophorese dargestellt (Abbildung 7). In den Folgeversuchen wurden die Cal-1-Zellen, wie zuvor beschrieben, auf Zellkulturplatten ausgesät. Neben der unbehandelten Kontrollgruppe, den mit CpG-ODN und nativer mtDNA stimulierten Zellen, wurden nun auch Zellen mit 100 ng der einzelnen PCR-Produkte behandelt. Nach dreistündiger Inkubation, RNA- und cDNA- Gewinnung erfolgte wieder die Auswertung der Zielgenexpression mittels quantitativer PCR. Die Genexpression von IFN β zeigte sich nach Stimulation mit den mitochondrialen PCR-Produkten nicht wesentlich beeinflusst. Für die Expression von IL-6 konnte, wenn auch nicht statistisch signifikant, zumindest eine geringe Erhöhung durch die Stimulationsversuche gezeigt werden (Abbildung 13). So fand sich z.B. nach Inkubation mit dem ATP-Synthase-Genabschnitten eine Hochregulation des Interleukins über das dreifache im Vergleich zu der unbehandelten Kontrollgruppe. Der starke Stimulationseffekt, der in der CpG-ODN-Gruppe zu beobachten war, konnte jedoch nicht erzielt werden.

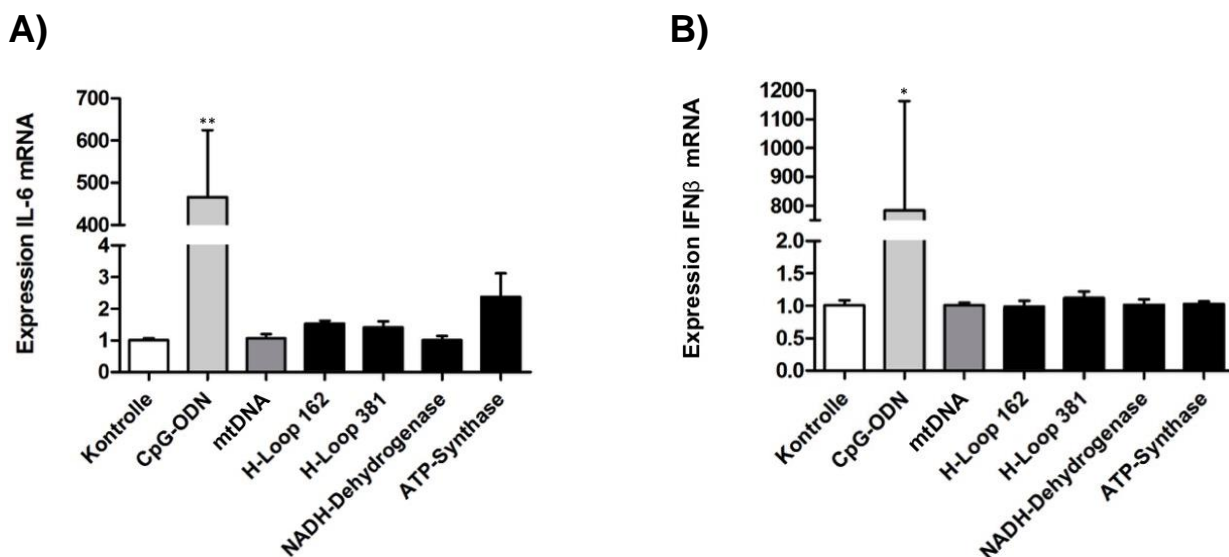


Abb. 13: IL-6 und IFN β Expression nach Stimulation der Cal-1-Zellen mit PCR-Produkten mitochondrialer Gene

Cal-1-Zellen ($0,4 \times 10^6$ pro Vertiefung einer 24er-Zellkultur-Platte in 1 ml Nährmedium) wurden drei Stunden nach Zugabe von $1 \mu\text{M}$ CpG-ODN, $5 \mu\text{g}$ mtDNA bzw. 100 ng des jeweiligen PCR-Produktes bei $37 \text{ }^\circ\text{C}$ und 5% CO_2 inkubiert. Nach RNA-Präparation und cDNA-Synthese wurde eine Echtzeit PCR durchgeführt und mit Hilfe der $\Delta\Delta\text{CT}$ -Methode die Expression der Zielgen-mRNA im Verhältnis zu der unbehandelten Kontrollgruppe bestimmt. Darstellung der Mittelwerte \pm SEM von A) IL-6; $n=5$ Proben (CpG-ODN, mtDNA, H-Loop 381, NADH-Dehydrogenase) bzw. $n=3$ (Kontrolle, H-Loop 162, ATP-Synthase) aus 3 unabhängigen Versuchen. $**p < 0,01$; und B) IFN β ; $n=5$ Proben (CpG-ODN, mtDNA, H-Loop 381, NADH-Dehydrogenase) bzw. $n=3$ Proben (Kontrolle, H-Loop 162, ATP-Synthase) aus 3 unabhängigen Versuchen. $*p < 0,05$; Varianzanalyse durch einfaktoriellen ANOVA, multipler Mittelwertsvergleich durch Tukey-Test.

3.1.4 Transfektion mit DOTAP

In der nächsten Versuchsreihe wurde das liposomale Transfektionsreagenz DOTAP genutzt, um die mitochondriale DNA in die Cal-1-Zellen einzuschleusen (Absatz 2.2.11). Hierzu wurden die Cal-1-Zellen wie zuvor auf die Zellversuchsplatten ausgesät und erneut mit $1 \mu\text{M}$ CpG-ODN sowie mit $5 \mu\text{g}$ nativer mitochondrialer DNA behandelt. Einer weiteren Versuchsgruppe wurden die Zellen mit derselben Menge $1 \mu\text{M}$ CpG-ODN sowie $5 \mu\text{g}$ nativer mtDNA mittels DOTAP transfiziert. Die Kontrollgruppe blieb abermals ohne Behandlung. Die deutlich vermehrte IL-6 Expression durch Stimulation mit CpG-ODN konnte durch das Transfektionsreagenz von einer 500-fachen auf eine 750-fache Erhöhung gesteigert werden (Abbildung 14). Für die Expression des IFN β -Genes war

kein vergleichbarer Effekt zu beobachten. Es zeigte sich jedoch bei den mit mtDNA-stimulierten Versuchsgruppen, dass durch die DOTAP-vermittelte Transfektion in das Zellinnere beinahe eine Verdopplung der Expression beider Zielgene erreicht werden konnte. Im Vergleich zu den mit CpG-ODN inkubierten Zellen war die beobachtete Antwort jedoch weiterhin sehr gering.

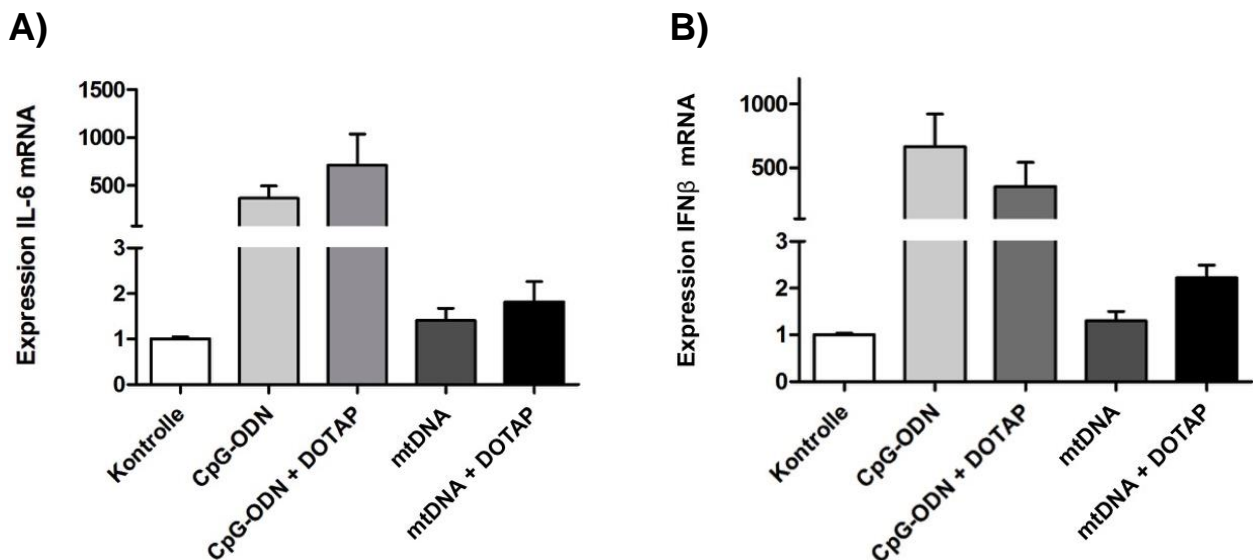


Abb. 14: IL-6 und IFN β Expression nach Transfektionsversuchen der nativen mtDNA mit DOTAP in Cal-1-Zellen

Cal-1-Zellen ($0,4 \times 10^6$ pro Vertiefung einer 24er-Zellkultur-Platte in 1 ml Nährmedium) wurden drei Stunden nach Zugabe von $1 \mu\text{M}$ CpG-ODN bzw. $5 \mu\text{g}$ mtDNA jeweils mit und ohne Transfektionsreagenz DOTAP bei $37 \text{ }^\circ\text{C}$ und 5% CO_2 inkubiert. Nach RNA-Präparation und cDNA-Synthese wurde eine Echtzeit PCR durchgeführt und mit Hilfe der $\Delta\Delta\text{CT}$ -Methode die Expression der Zielgen mRNA im Verhältnis zu der unbehandelten Kontrollgruppe bestimmt. Darstellung der Mittelwerte \pm SEM von A) IL6; $n=7$ Proben (Kontrolle, CpG-ODN, CpG-ODN + DOTAP und mtDNA) bzw. $n=6$ Proben (mtDNA + DOTAP) aus 4 unabhängigen Versuchen; und B) IFN β ; $n=7$ Proben (Kontrolle, CpG-ODN + DOTAP und mtDNA), $n=8$ Proben (CpG-ODN) bzw. $n=6$ (mtDNA + DOTAP) aus 4 unabhängigen Versuchen; Varianzanalyse durch einfaktoriellen ANOVA, Post-hoc: Tukey-Test; ein Test-Wert der CpG-ODN-Stimulationsreihe von A) wurde durch den Grubbs-Test als Ausreißer identifiziert ($p < 0,05$) und aus der weiteren Auswertung ausgeschlossen.

3.2 Effekte der Stimulation von PBMCs mit mitochondrialer DNA

Aufgrund der fehlenden signifikanten Stimulationseffekte nach Inkubation der Cal-1-Zellen mit mtDNA, wurde auf ein physiologischeres Zellmodell umgestellt.

Im Folgenden wurden die Stimulationsversuche mit primären humanen mononukleären Zellen (PBMCs) durchgeführt. Hierzu wurden $0,2 \times 10^6$ Zellen jeweils 3 und 24 Stunden mit $1 \mu\text{M}$ CpG-ODN bzw. $5 \mu\text{g}$ mtDNA inkubiert. Anschließend erfolgte wie bei den Versuchsreihen mit den Cal-1-Zellen zunächst die Betrachtung der IL-6 Genexpression mittels real-time PCR. Im Vergleich zu der unbehandelten Kontrollgruppe zeigte sich auch bei PBMCs eine deutliche Hochregulation des Zielgenes nach Stimulation mit CpG-ODN (Abbildung 15). Auffällig war hier, dass nach CpG-ODN-Inkubation das Expressionsmaximum schon nach 3 Stunden erreicht war und nach 24 Stunden bereits deutlich abfiel.

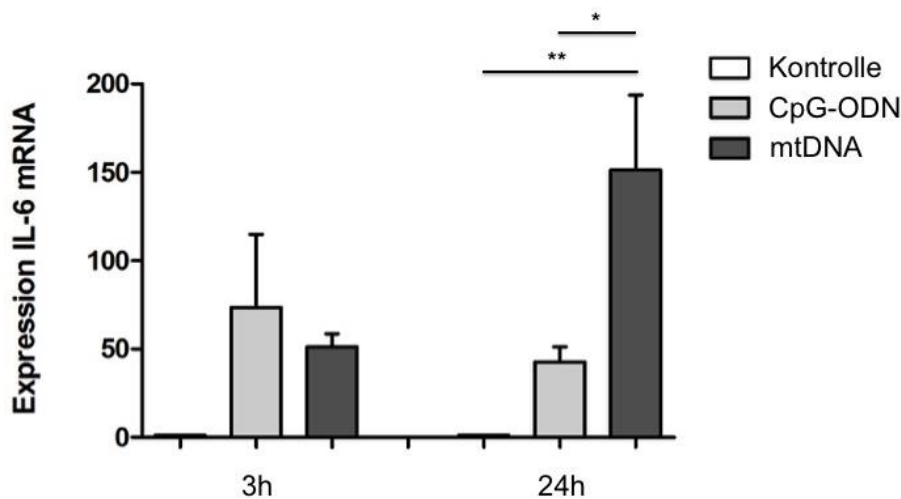


Abb. 15: Expression des IL-6-Gens nach Stimulation der PBMCs mit mtDNA nach 3 und 24 Stunden

PBMCs ($0,2 \times 10^6$ pro Vertiefung einer 24er-Zellkultur-Platte in 1 ml Nährmedium) wurden drei bzw. vierundzwanzig Stunden nach Zugabe von $1 \mu\text{M}$ CpG-ODN bzw. $5 \mu\text{g}$ mtDNA bei 37°C und 5% CO_2 inkubiert. Nach RNA-Präparation und cDNA-Synthese wurde eine Echtzeit PCR durchgeführt und mit Hilfe der $\Delta\Delta\text{CT}$ -Methode die Expression der Zielgen mRNA im Verhältnis zu der unbehandelten Kontrollgruppe bestimmt. Darstellung der Mittelwerte \pm SEM von IL6; $n=3$ (für die 3h-Werte), $n=4$ (für die 24h-Werte) aus 4 unabhängigen Versuchen, Varianzanalyse durch einfaktoriellen ANOVA, multipler Mittelwertsvergleich durch Tukey-Test, $*p < 0,05$, $**p < 0,01$.

Bei den PBMCs konnte nun im Gegensatz zu den Cal-1-Versuchen eine gesteigerte IL-6-Expression nach Stimulation mit mtDNA beobachtet werden. Nach 3 Stunden zeigte sich bereits eine um das 50-fach erhöhte Genexpression, welche nach 24 Stunden auf mehr als das 150-fache anstieg. Diese Reaktion übertraf sogar die der mit CpG-ODN behandelten Versuchsgruppen.

Der Zellkulturüberstand der 24-stündigen Inkubationsreihe wurde zudem genutzt um die effektive Sekretion von IL-6 mit Hilfe eines ELISAs zumessen. Auch hierbei konnte der Nachweis einer erhöhten Interleukin-Produktion nach Stimulation mit mtDNA erbracht werden (Abbildung 16). Die IL-6-Konzentration im Zellkulturüberstand zeigte sich doppelt bis dreifach höher als die der Stimulationsgruppen mit CpG-ODN.

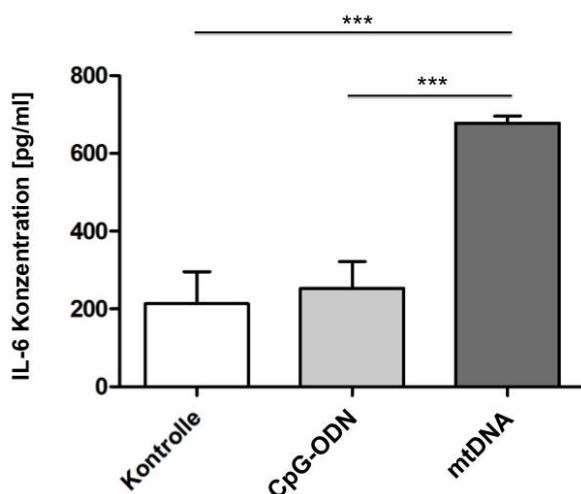


Abb. 16: Sekretion von IL-6 nach Stimulation der PBMCs mit mtDNA

PBMCs ($0,2 \times 10^6$ pro Vertiefung einer 24er-Zellkultur-Platte in 1 ml Nährmedium) wurden vierundzwanzig Stunden nach Zugabe von $1 \mu\text{M}$ CpG-ODN bzw. $5 \mu\text{g}$ mtDNA bei 37°C und 5% CO_2 inkubiert. Mittels Sandwich-Elisa wurde anschließend die IL-6-Konzentration im Zellmedium gemessen $n=6$ Proben aus 3 unabhängigen Versuchen. *** $p < 0,001$; Varianzanalyse durch einfaktoriellen ANOVA, multipler Mittelwertsvergleich durch Tukey-Test. Ein Test-Wert der CpG-ODN-Stimulationsreihe wurde durch den Grubbs-Test als Ausreißer identifiziert ($p < 0,05$) und aus der weiteren Auswertung ausgeschlossen.

Um eine mögliche Reaktion anderer in PBMCs enthaltender Zelllinien als pDCs auf die erfolgten Stimulationsversuche zu untersuchen, wurde des Weiteren die Genexpression von Interleukin 8 und Interleukin 10 betrachtet (Abbildung 17).

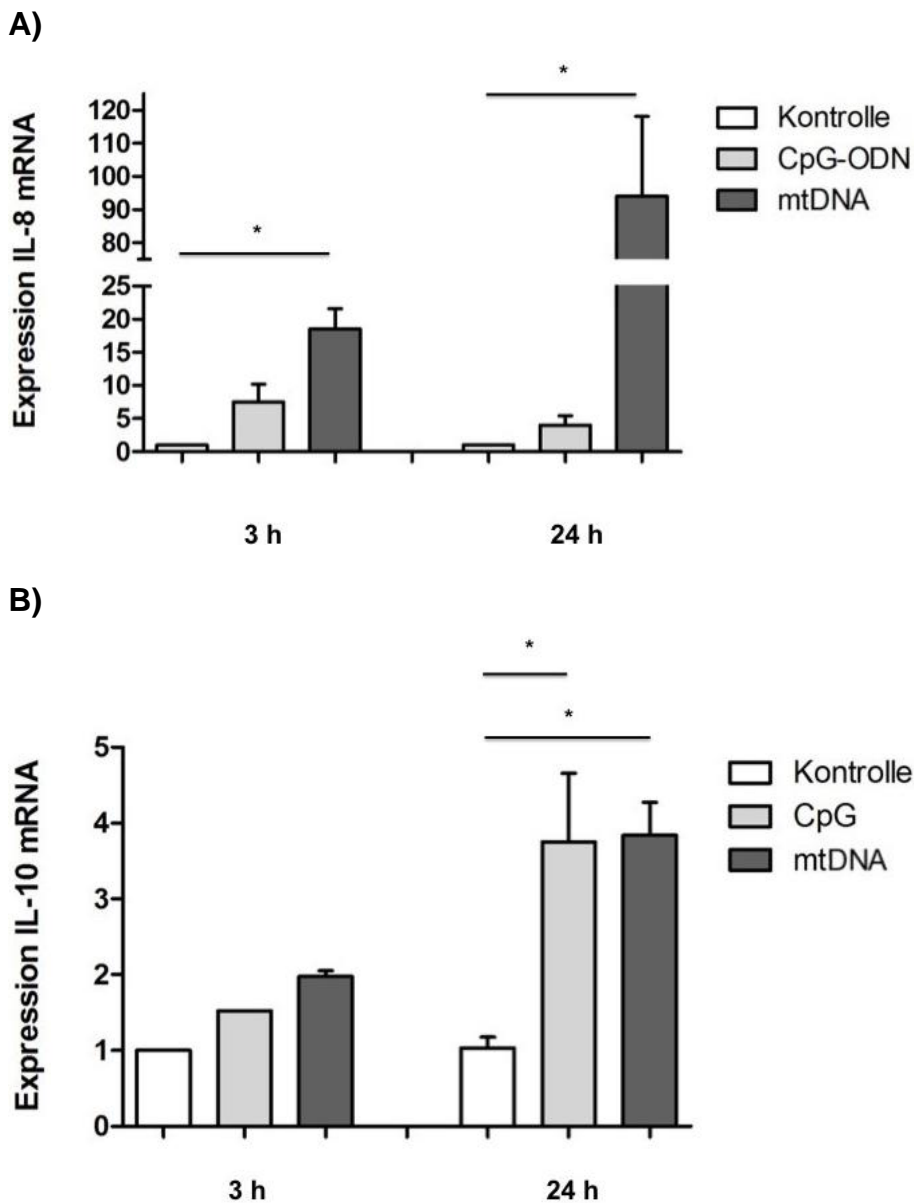


Abb. 17: Expression nach Stimulation der PBMCs mit mtDNA nach 3 und 24 Stunden PBMCs ($0,2 \times 10^6$ pro Vertiefung einer 24er-Zellkultur-Platte in 1 ml Nährmedium) wurden drei bzw. vierundzwanzig Stunden nach Zugabe von $1 \mu\text{M}$ CpG-ODN bzw. $5 \mu\text{g}$ mtDNA bei 37°C und 5% CO_2 inkubiert. Nach RNA-Präparation und cDNA-Synthese wurde eine Echtzeit PCR durchgeführt und mit Hilfe der $\Delta\Delta\text{CT}$ -Methode die Expression der Zielgen mRNA im Verhältnis zu der unbehandelten Kontrollgruppe bestimmt. Darstellung der Mittelwerte \pm SEM von A) IL-8 und B) IL-10; $n=3$ (für die 3 h-Werte), $n=4$ (für die 24 h-Werte) aus 4 unabhängigen Versuchen, Varianzanalyse durch einfaktoriellen ANOVA, multipler Mittelwertsvergleich durch Tukey-Test, $*p < 0,05$.

Die mit mtDNA stimulierten PBMC-Zellen zeigten hier zunächst eine leichte Hochregulation der IL-8-Expression nach 3 sowie eine deutlich gesteigerte Genexpression nach 24 Stunden. Nach Stimulation mit CpG-ODN zeigte sich dagegen nur ein minimaler Effekt. Bei Betrachtung der Expression von IL-10 fiel auf, dass die Hochregulation dieses Zielgenes im Vergleich zu den anderen Interleukinen nach Inkubation mit CpG-ODN sowie mtDNA deutlich geringer ausfiel. Nach 24 Stunden zeigte sich ein Expressionsmaximum, welches nur das 4-fache betrug.

3.3 Endotoxin-Testung und anschließende Versuchsreihen

Um sicherzustellen, dass die in den vorhergehenden Versuchen mit den PBMCs gezeigte Stimulation durch mtDNA und nicht durch eine Endotoxin-Kontamination ausgelöst wurden, erfolgte eine Testung aller zur Versuchsdurchführung genutzten Lösungen und Substanzen. Hierfür wurde ein Limulus-Assay verwendet (Absatz 2.2.10). Es erwiesen sich alle Lösungen, Medien und Substanzen als endotoxinfrei, bis auf das DEPC-Wasser welches zum Lösen der fertig präparierten mtDNA genutzt wurde. In dieser Probe wurde der Nachweis bakterieller Endotoxine erbracht. Auch in der im DEPC-Wasser gelöste mtDNA-Probe konnte eine Kontamination mit Endotoxinen nicht ausgeschlossen werden (Abbildung 18).

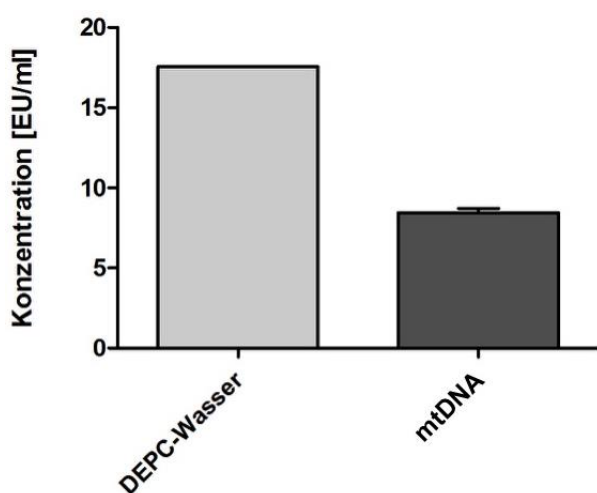


Abb. 18: Endotoxin-Nachweis mittels Limulus-Assay in DEPC-Wasser und der darin gelösten mtDNA

Mit Hilfe eines Limulus-Assays wurde der Gehalt an Endotoxinen in jeweils 50 µl DEPC-Wasser bzw. 50 µl in DEPC-Wasser gelösten mtDNA Proben nachgewiesen. Die Messung der Endotoxinkonzentration erfolgte bei einer Wellenlänge von 405-410 nm.

In den folgenden Versuchen sollte dargestellt werden, inwieweit das kontaminierte DEPC-Wasser für die Expression und Sekretion von Interleukinen in den PBMCs ursächlich gewesen sein könnte. Hierzu wurden neben der unbehandelten Kontrolle und dem CpG-ODN auch Zellen mit bakteriellen LPS als Positivkontrollgruppe für bakterielle Endotoxine stimuliert. Eine weitere Gruppe wurde mit reinem DEPC-Wasser inkubiert. Die mitochondriale DNA wurde in unterschiedlichen Konzentrationen und Volumina in einer Verdünnungsreihe in das Zellmedium gegeben. Nach 24-stündiger Inkubation wurde die effektive Sekretion von IL-6 mittels ELISA untersucht. In dem Zellkulturüberstand der mit reinem DEPC-Wasser inkubierten Zellen konnte eine erhöhte IL-6-Konzentration mit über 500 pg/ml nachgewiesen werden (Abbildung 19). Dieses Stimulationsniveau entsprach der Positivgruppe, welche ausschließlich mit LPS behandelt wurde. Die mit mtDNA stimulierten Zellen zeigten entsprechend des steigenden mtDNA Gehaltes einen Anstieg der IL-6-Sekretion. Die mit 40 µg mtDNA stimulierten Zellen erreichten wie das DEPC-Wasser und die LPS-Kontrolle eine stark gesteigerte Freisetzung von IL-6.

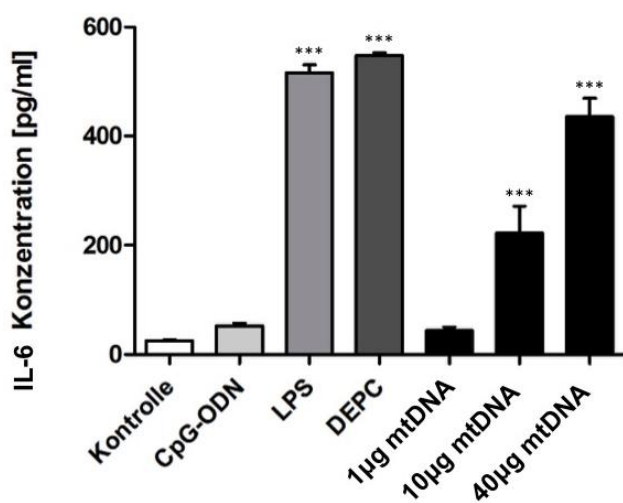


Abb. 19: Vergleich der IL-6-Sekretion von PBMCs nach Stimulation mit LPS bzw. der fraglich kontaminierten mtDNA-Proben

PBMCs ($0,4 \times 10^6$ pro Vertiefung einer 24er-Zellkultur-Platte in 1 ml Nährmedium) wurden 24 Stunden nach Zugabe von 1 µM CpG-ODN, 1 ng LPS bzw. 1, 10 oder 40 µg mtDNA bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Mittels ELISA wurde anschließend die Konzentration des sezernierten IL-6 im Zellkulturmedium gemessen n=2 Proben aus einem Versuch. Varianzanalyse durch einfaktoriellen ANOVA, multipler Mittelwertsvergleich durch Tukey-Test. ***p < 0,001.

Im Folgenden wurden die Stimulationsversuche nach den gleichen Bedingungen wiederholt. Es erfolgte jedoch das Angleichen der Stimulationsvolumina in der mtDNA Gruppe. Die unterschiedlichen mtDNA-Mengen (1, 10 und 40 μg) wurden dazu so verdünnt, dass die Endvolumina des DEPC-Wassers bei allen Gruppen übereinstimmten. Die Messung der IL-6-Konzentration erfolgte erneut nach 24 Stunden mittels ELISA. Wie schon zuvor in der Versuchsreihe beobachtet, konnte nach Stimulation mit DEPC-Wasser eine deutlich erhöhte IL-6-Sekretion nachgewiesen werden (Abbildung 20). Die mit mtDNA stimulierten Zellen zeigten diesmal jedoch nicht wie zuvor einen konzentrationsabhängigen Anstieg der IL-6-Sekretion. In allen Proben ließ sich diesmal eine äquivalente Menge IL-6 nachweisen, welche sich im selben Bereich wie bei der DEPC- und LPS-Gruppe befand.

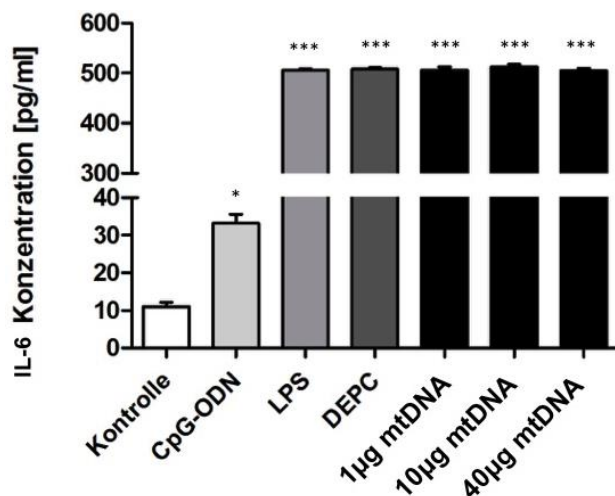


Abb. 20: Vergleich der IL-6-Sekretion von PBMCs nach Stimulation mit LPS bzw. mit mtDNA-Proben in dem fraglich kontaminierten DEPC-Wasser
PBMCs ($0,4 \times 10^6$ pro Vertiefung einer 24er-Zellkultur-Platte in 1 ml Nährmedium) wurden 24 Stunden nach Zugabe von 1 μM CpG-ODN, 1 ng LPS bzw. 1, 10 oder 40 μg mtDNA jeweils in demselben Volumina DEPC-Wasser gelöst, bei 37 °C und 5 % CO_2 inkubiert. Mittels ELISA wurde anschließend die Konzentration des sezernierten IL-6 im Zellkulturmedium gemessen, n=2 Proben aus einem Versuch, Varianzanalyse durch einfaktoriellen ANOVA, multipler Mittelwertsvergleich durch Tukey-Test. *p < 0,05, ***p < 0,001.

Als weiteren Nachweis, dass es sich bei der beobachteten Stimulation um eine Reaktion auf die Endotoxin-Kontamination handelte, wurde zum Vergleich auch die Sekretion von TNF α untersucht. Hier zeigte sich in den Versuchsreihen ein ähnliches Sekretionsmuster wie bei IL-6. In den Zellkulturüberständen der Versuchsgruppen, welche mit DEPC und LPS inkubiert wurden, zeigte sich eine stark erhöhte Sekretion von TNF α (Abbildung 21). In den mtDNA-Proben fand sich zunächst ein konzentrationsabhängiger Anstieg der TNF α -Konzentration. Nach dem Angleichen der Endvolumina in den Folgeversuchen, wurde wie zuvor IL-6 auch TNF α ähnlicher Konzentration in allen mtDNA Gruppen nachgewiesen (Abbildung 22).

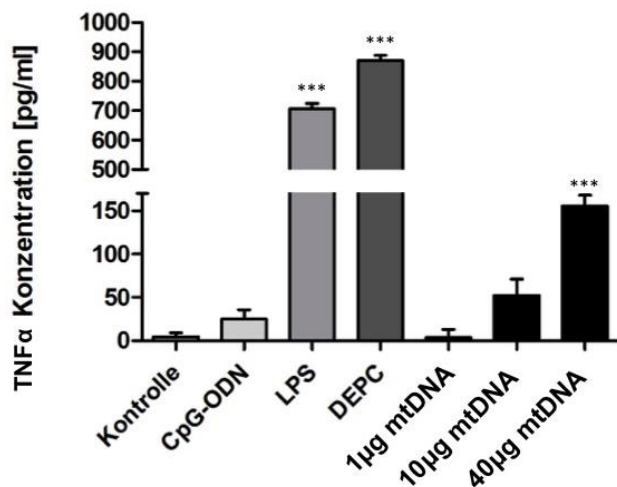


Abb. 21: Vergleich der TNF α -Sekretion von PBMCs nach Stimulation mit LPS bzw. der fraglich kontaminierten mtDNA-Proben

PBMCs ($0,4 \times 10^6$ pro Vertiefung einer 24er-Zellkultur-Platte in 1 ml Nährmedium) wurden 24 Stunden nach Zugabe von 1 μ M CpG-ODN, 1 ng LPS bzw. 1, 10 oder 40 μ g mtDNA bei 37°C und 5% CO $_2$ inkubiert. Mittels ELISA wurde anschließend die Konzentration des sezernierten TNF α im Zellmedium gemessen n=2 Proben aus einem Versuch. Varianzanalyse durch einfaktoriellen ANOVA, multipler Mittelwertsvergleich durch Tukey-Test. ***p < 0,001.

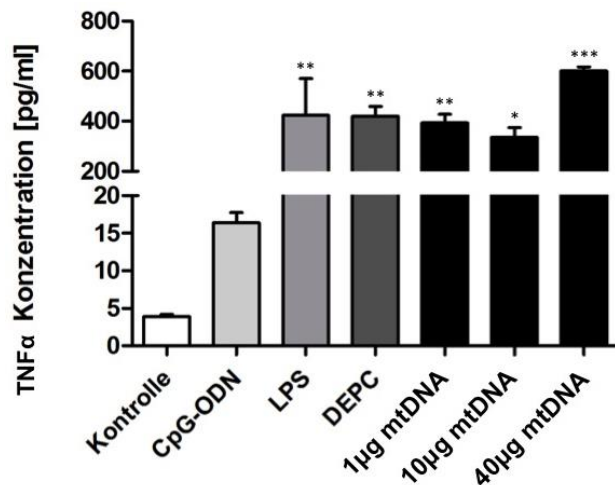


Abb. 22: Vergleich der TNF α -Sekretion von PBMCs nach Stimulation mit LPS bzw. mit mtDNA-Proben in dem fraglich kontaminierten DEPC-Wasser
PBMCs ($0,4 \times 10^6$ pro Vertiefung einer 24er-Zellkultur-Platte in 1 ml Nährmedium) wurden 24 Stunden nach Zugabe von 1 μ M CpG-ODN, 1 ng LPS bzw. 1, 10 oder 40 μ g mtDNA jeweils in demselben Volumina DEPC-Wasser gelöst, bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Mittels ELISA wurde anschließend die Konzentration des sezernierten TNF α im Zellmedium gemessen, n=2 Proben aus einem Versuch, Varianzanalyse durch einfaktoriellen ANOVA, multipler Mittelwertsvergleich durch Tukey-Test. *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001.

Es erfolgte daraufhin die Suche nach einem alternativen Lösungsmittel für die präparierte mtDNA. Hierzu wurden destilliertes Wasser sowie speziell endotoxinfreies Wasser getestet (Abbildung 23). Beides stellte sich als geeignetes Lösungsmittel dar. Für die weiteren Versuche wurde sich für die Nutzung von destilliertem Wasser entschieden. Weitere Testungen zeigten, dass in der anschließend erneut isolierter mtDNA im Vergleich zu den Vorproben keinen relevanten Endotoxingehalt mehr nachgewiesen werden konnten.

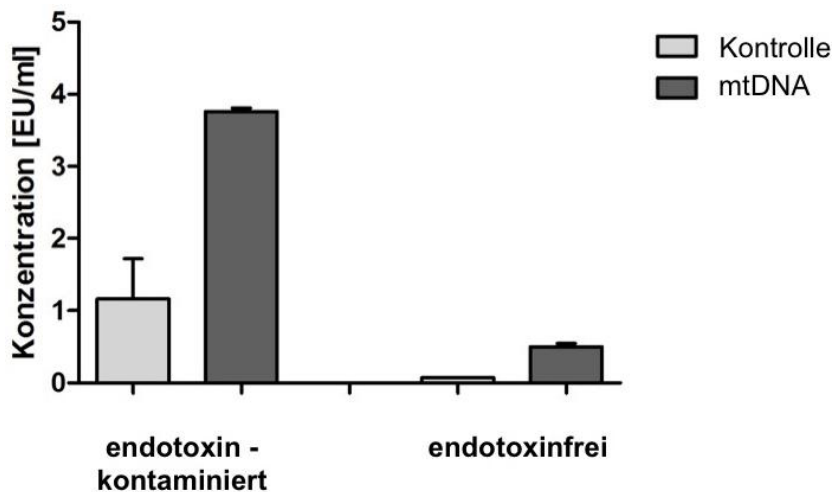


Abb. 23: Vergleichende Endotoxin-Testung der kontaminierten Proben zu der endotoxinfrei präparierten mtDNA

Mit Hilfe eines Limulus-Assays wurde der Gehalt von Endotoxinen in den kontaminierten mtDNA-Proben sowie in der endotoxinfrei präparierten mtDNA bestimmt. Als Kontrolle diente für die kontaminierte mtDNA das DEPC-Wasser, für die endotoxinfrei präparierte mtDNA Endotoxinfreies Wasser. Der Endotoxinkonzentration wurde bei einer Wellenlänge von 405-410 nm gemessen.

Für die folgenden Versuche wurde die mtDNA dementsprechend präpariert und in endotoxinfreiem Wasser gelöst. Vor der Versuchsdurchführung erfolgte ein Limulus-Assay zum Ausschluss im Verlauf entstandener Kontaminationen. PBMCs wurden wie zuvor beschrieben isoliert und ausgesät. Als Negativkontrolle dienten unbehandelte Zellen. Als Positivkontrolle dienten mit CpG-ODN sowie mit LPS behandelte Zellen. Die mtDNA wurde vor Versuchsbeginn in unterschiedlichen Mengen (1, 10 und 40 µg) in demselben Volumen endotoxinfreien Wasser gelöst. Die Zellen wurden erneut 24 Stunden inkubiert und anschließend die Sekretion von IL-6 mittels ELISA untersucht. Diesmal zeigte sich, dass endotoxinfreies Wasser, welches als Lösungsmittel für die DNA verwendet wurde, keinen Einfluss auf die Sekretion von IL-6 in PBMCs hatte (Abbildung 24). Durch CpG-ODN und LPS ließ sich wie erwartet eine deutliche Zellantwort erreichen. In den Zellüberständen der mit mtDNA behandelten Gruppen wurde ein Anstieg der IL-6 Konzentrationen abhängig der genutzten Materialmenge nachgewiesen. So zeigte sich nach Inkubation von 1 µg mtDNA eine nur geringe Sekretion von IL-6. Nach Stimulation mit 40 µg hingegen zeigte sich mit über 300 pg/ml

eine deutlich erhöhte Ausschüttung. Die Stimulation mit mtDNA übertraf die der CpG-Vergleichsgruppe um das Dreifache.

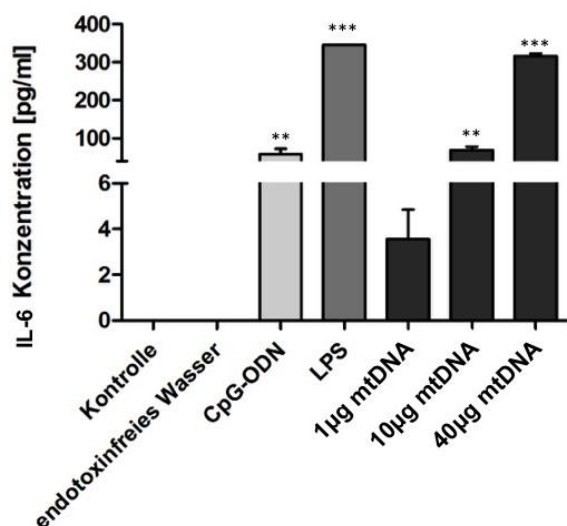


Abb. 24: Vergleich der IL-6-Sekretion von PBMCs nach Stimulation mit LPS bzw. mit endotoxin-freier mtDNA

PBMCs ($0,4 \times 10^6$ pro Vertiefung einer 24er-Zellkultur-Platte in 1 ml Nährmedium) wurden 24 Stunden nach Zugabe von $1 \mu\text{M}$ CpG-ODN, 1 ng LPS bzw. 1, 10 oder 40 μg mtDNA, bei 37°C und 5 % CO_2 inkubiert. Mittels ELISA wurde anschließend die Konzentration des sezernierten IL-6 im Zellmedium gemessen, $n=2$ Proben aus einem Versuch, Varianzanalyse durch einfaktoriellen ANOVA, multipler Mittelwertsvergleich durch Tukey-Test. ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

Zum Vergleich mit den vorhergehenden Versuchen wurde erneut die Sekretion von $\text{TNF}\alpha$ betrachtet (Abbildung 25). Hier zeigte sich eine deutliche Hochregulation nach Inkubation der PBMCs mit LPS. Die Zellen, welche mit dem endotoxinfreien Wasser und der mtDNA in den geringeren Konzentrationen stimuliert wurden, wiesen hingegen keine relevante $\text{TNF}\alpha$ -Produktion auf. Höhere Konzentrationen von mtDNA verursachten ähnlich wie CpG-ODN nur eine geringe Freisetzung von $\text{TNF}\alpha$. Dies demonstrierte, dass eine Endotoxin-Kontamination für die deutliche IL-6-Sekretion in diesem Versuch nicht ursächlich sein konnte und sich hier der Eigeneffekt der reinen nativen mtDNA beobachten ließ.

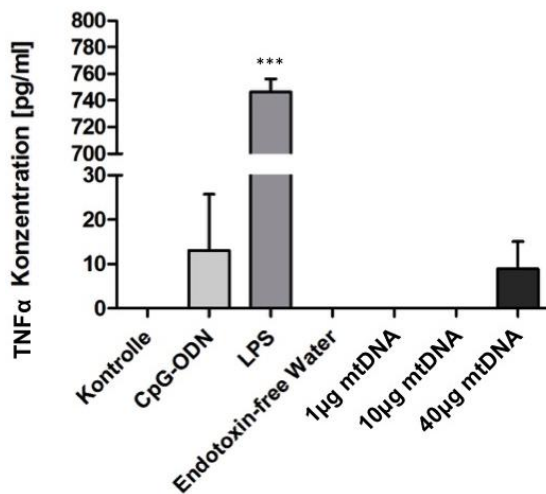


Abb. 25: Vergleich der TNF α -Sekretion von PBMCs nach Stimulation mit LPS bzw. mit endotoxin-freier mtDNA

PBMCs ($0,4 \times 10^6$ pro Vertiefung einer 24er-Zellkultur-Platte in 1 ml Nährmedium) wurden 24 Stunden nach Zugabe von $1 \mu\text{M}$ CpG-ODN, 1 ng LPS bzw. 1, 10 oder 40 μg mtDNA, bei $37 \text{ }^\circ\text{C}$ und 5 % CO_2 inkubiert. Mittels ELISA wurde anschließend die Konzentration des sezernierten TNF α im Zellmedium gemessen, $n=2$ Proben aus einem Versuch, Varianzanalyse durch einfaktoriellen ANOVA, multipler Mittelwertsvergleich durch Tukey-Test. *** $p < 0,001$.

4. Diskussion

4.1 Auswahl der Zellkultur-Modelle

Für die Betrachtung des immunmodulatorischen Effektes von mitochondrialer DNA auf plasmazytoide dendritische Zellen wurde zunächst als Modell die Cal-1-Zellkultur ausgewählt. Diese bisher für plasmazytoide dendritische Zellen einzigartige Zellkultur wurde aus malignen Lymphoblasten eines Patienten mit blastischer plasmazytoider dendritischer Neoplasie (auch Blastisches natürliches Killerzell-Lymphom) etabliert. Hierbei handelt es sich um eine seltene Neoplasie, welche vermutlich von pDC-Vorläuferzellen abstammt. Die Zellkultur zeigt sich im lichtmikroskopischen Aufbau und ihrer immunphänotypischen Eigenschaften äquivalent zu humanen pDCs. Es wurde zum Beispiel beobachtet, dass nach dreitägiger Inkubation mit Stimulantien wie IL-3 oder GM-CSF (granulocyte macrophage colony-stimulating factor) eine Transformation in gereifte DCs mit Ausbildung langer Dendriten erfolgt. Zudem besitzen Cal-1-Zellen neben den für primäre humane pDCs spezifischen immunphänotypischen Oberflächenmerkmale, auch verschiedenen Toll-Like Rezeptoren. So konnte die Expression von TLR2, TLR4, TLR7 und TLR9 nachgewiesen werden (Maeda et al., 2005). Es zeigte sich, dass das Cal-1-Zellmodell eine einzigartige Möglichkeit darstellt, die Zellantwort von primären pDCs widerzuspiegeln. Dies birgt erhebliche Vorteile gegenüber Versuchsreihen mit primären humanen pDCs, welche aufgrund ihres sehr geringen Vorkommens im peripheren Blut (weniger als 0,5% der Leukozyten) nur schwer ausreichend für umfangreiche Zellkulturversuche isoliert werden können (Siegal et al., 1999; Autissier et al., 2010).

In Cal-1-Zellversuchen konnte ebenfalls nachgewiesen werden, dass Ablauf sowie Kinetik der Zellantwort nach Stimulation mit synthetischen CpG-ODN der Reaktion von frisch isolierten humanen pDCs gleichen. In beiden Zelltypen ließ sich eine TLR9-induzierte intrazelluläre Signalkaskade belegen. Aufgrund ihrer doppelt so hohen TLR9-Expression fiel die Zellantwort von primären pDCs jedoch höher aus als die der Cal-1-Zellen (Steinhagen et al., 2012b). In Zusammenschau dieser Erkenntnisse erschien die Cal-1-Zellkultur als ein geeignetes Modell für die Fragestellung, ob sich pDCs mittels mitochondriale DNA stimulieren lassen und eine mögliche Reaktion TLR9-vermittelt

abläuft. Auf Basis der Datenlage von Steinhagen et al. (2012b) konnte des Weiteren eine valide positive Vergleichsgruppe durch Stimulation mit synthetischen CpG-ODN herangezogen werden. Nachdem durch die Inkubation mit mitochondrialer DNA keine Steigerung der Expression von inflammatorischen Zytokinen nachweisbar war (Absatz 3.1.), wurde die Eignung einer isolierten pDC-Zellkultur hinterfragt.

Für die Betrachtung eines physiologischeren Zellmodelles als das der Reinkultur, wurden für die weiteren Versuche primäre mononukleäre Zellen (PBMCs) verwendet. Hierbei handelt es sich um Zellen des Immunsystems, welche aus dem peripheren Blut isolierbar sind. Um PBMCs von den anderen Blutzellen, wie polymorphkernigen Leukozyten oder Erythrozyten zu separieren, wurde die Methode der Dichtegradientenzentrifugation (s. Abs. 2.2.3) genutzt (Murphy und Weaver, 2018). Die so erhaltene Mischkultur besteht aus etwa 60 % T-Zellen, 13 % B-Zellen, 15 % Natürlichen Killerzellen, 9 % Monozyten und 1,1 % dendritischen Zellen von welchen etwa 0,3 % pDCs entsprechen (Autissier et al., 2010). Die mit PBMCs durchgeführten Versuchsreihen sollten eine mögliche Beteiligung anderer Zelltypen mit einschließen. Es wurde postuliert, dass die immunologische Wirkung mitochondrialer DNA nicht auf eine isolierte pDC-Stimulation, sondern auf die weitere Aktivierung der anderen Zelltypen zurückzuführen sei. Im Vergleich zu den Cal-1-Versuchen zeigte sich nach Stimulation der PBMCs mit nativer mitochondrialer DNA eine deutliche Reaktion. So konnte nach 24-stündiger Inkubationszeit eine dreimal so hohe IL-6-Sekretion nachgewiesen werden als in der CpG-ODN-Vergleichsgruppe. Ebenfalls wurde eine um mehr als das 100-fach gesteigerte Expression von IL-8 beobachtet. Die Sekretion von TNF α und die Expression von IL10 zeigten sich durch mtDNA jedoch nur im geringen Maße beeinflusst.

Die beobachteten Zellreaktionen lassen die Schlussfolgerung zu, dass es sich hierbei um ein Zusammenspiel der unterschiedlichen Zelltypen bzw. um die initiale Aktivierung eines weiteren Zelltyps handeln muss. Als maßgeblicher Rezeptor für die Erkennung von mtDNA als DAMP wurde bisher der TLR9 angesehen. Abgesehen von pDCs wird der TLR9 noch hauptsächlich in B-Zellen exprimiert. Zwar konnte dieser Toll-like Rezeptor sehr gering auch in Monozyten, Natürlichen Killerzellen und T-Zellen nachgewiesen werden (Hornung et al., 2002), jedoch stellen diese Zellarten keine primären Sensorzellen für unmethylierte DNA dar. Dies zeigte sich in

Stimulationsversuchen mit isoliert aufgereinigten Zellen aus primären PBMCs. Weder Monozyten, noch Natürliche Killerzellen oder T-Zellen zeigten losgelöst von pDCs und B-Zellen eine Differenzierung nach Inkubation mit synthetischen CpG-ODN. Im PBMC-Verbund konnte jedoch eine deutliche Zellaktivierung beobachtet werden, welche dementsprechend von der Signalweiterleitung anderer Zellen abhängig ist. Isolierte B-Zellen hingegen reagierten bereits nach drei Stunden wie pDCs deutlich auf die Stimulation mit einer gesteigerten IL-8-Expression (Hornung et al., 2002). Die Zellreaktion nach Stimulation mit CpG-ODN gleicht der nach erfolgter Inkubation mit E.Coli-DNA (Bauer et al., 2001). Auch kommt es in B-Zellen zu einer vermehrten IL-6 Sekretion nach Stimulation mit synthetischen CpG-ODN (Gürsel et al., 2002). Versuche mit Wildtyp- und TLR9-Knockout-B-Zellen konnten eine TLR9-abhängige Aktivierung durch CpG-DNA belegen (Hemmi et al., 2000). Interessant wäre demnach die Durchführung weiterer Versuche mit einem isolierten B-Zell-Modell.

Bekannterweise kommt es je nach CpG-ODN-Subtyp zu einer stärkeren Stimulation von entweder B-Zellen oder pDCs. So zeigte sich, dass CpG-ODN der Klasse B (K-ODN) vorzugsweise B-Zellen aktiviert, während CpG der Klasse A (D-ODN) für die Interferon-Produktion in pDCs verantwortlich ist. Eine signifikante Sekretion von IFN α oder IFN β in PBMCs konnte hingegen nach Stimulation mit K-ODN im Vergleich zu D-ODN nicht nachgewiesen werden (Krug et al., 2001). D-ODN verursacht zudem in B-Zellen eher einen inhibitorischen Effekt (Krieg, 2002). Ähnliche Ergebnisse zeigten sich im Vergleich von mitochondrialer DNA mit D-ODN in PBMC-Versuchsreihen. Hier konnte eine Stimulation mit nativer mtDNA keine signifikante IFN α -Sekretion nach 20-stündiger Inkubation induzieren (Ries et al., 2013). Der Vergleich dieser Ergebnisse, die eindeutige IL-6 und IL-8-Expression gegenüber der mangelnden Interferonfreisetzung, könnte vermuten lassen, dass mtDNA wie K-ODN eher vermehrt eine B-Zell-vermittelte Immunreaktion bewirkt.

Abgesehen von weiterführenden B-Zell-Versuchen könnte die Verteilung der mtDNA-Aufnahme in PBMCs genauer betrachtet werden. So beschrieben Gürsel et al. (2002) die Unterschiede der Bindung und Internalisierung von Biotin-markierten CpG-ODN durch die verschiedenen Zellarten. Gegebenenfalls würde eine äquivalente Analyse mit markierter mtDNA einen Aufschluss über relevante Zelltypen in der beobachteten Reaktion primärer mononukleärer Zellen geben.

4.2 Bewertung der Ergebnisse in Hinblick auf die Endotoxin-Kontamination

Nach der positiven Endotoxin-Testung der mtDNA mit dem Limulus Assay, müssen die vorhergehenden Versuchsergebnisse kritisch hinterfragt werden.

Unklar ist, ab wann die Endotoxin-Verunreinigung in den Proben aufgetreten war. Die Ergebnisse der Cal-1-Zellkultur deuten darauf hin, dass eine durchgehende Kontamination als unwahrscheinlich anzunehmen ist. Cal-1-Zellen exprimieren, wie bereits erwähnt, neben TLR9 auch TLR2, TLR4 und TLR7 (Maeda et al., 2005). Sie unterscheiden sich in dieser Hinsicht von primären pDCs, welche TLR1, TLR6, TLR7 und TLR9 exprimieren (Hornung et al., 2002). Der in Cal-1-Zellen befindliche Toll-like Rezeptor 4 stellt einen wichtigen PRR des Immunsystems dar. Er ist in der Zellmembran lokalisiert und besitzt eine vielschichtige Sensorfunktion. Unter anderem detektiert er das bakterielle Lipopolysaccharid (LPS) neben anderen pathogenen Strukturen von Viren, Pilzen und Parasiten (Akira et al., 2006). Bei dem bakteriellen LPS handelt es sich um ein häufiges Endotoxin, welches in der äußeren Zellmembran gramnegativer Bakterien vorkommt (Murphy und Weaver., 2018). Im Falle einer Endotoxin-Kontamination der mtDNA zu einem frühen Zeitpunkt wäre demnach ebenfalls in der Cal-1-Versuchsgruppe eine deutliche inflammatorische Zellantwort zu erwarten gewesen.

In PBMCs kann bis zu dem Kontaminations-Nachweis und den anschließenden Versuchsreihen die Wirkung von mtDNA und Endotoxin nicht differenziert werden. Tatsächlich stehen am Ende des intrazellulären TLR4-Signalweges ähnliche Zytokine wie die, welche nach TLR9-Stimulation nachgewiesen werden können. So exprimieren über den TLR4 aktivierte Immunzellen nicht nur IL-6 und IL-8, sondern ebenfalls Typ-I-Interferone (Kawai und Akira., 2010; Patil et al., 2010). Die deutliche IL-6- und IL-8-Expression in den PBMCs nach 24-stündiger Inkubation mit mitochondrialer DNA, könnte also dementsprechend ebenfalls kontaminationsbedingt zu werten sein. Auffällig sind jedoch die IL-10-Expressionsdaten. In Versuchsreihen mit primären Knochenmarksmakrophagen konnte nachgewiesen werden, dass LPS ebenfalls die IL-10-Expression signifikant steigert (Iyer et al., 2010). So wäre im Falle einer relevanten Endotoxin-Verunreinigung in der Anfangsphase der PBMC-Versuche auch bei diesem Zielgen eine deutliche Hochregulierung zu erwarten gewesen. Wie jedoch in Abbildung 10 dargestellt (Absatz 3.2.) blieb dieser Effekt aus. Es konnte lediglich ein geringer IL-

10-Anstieg beschrieben werden. Diese Beobachtungen führen zu dem Schluss, dass die Probenkontamination erst im späten Verlauf der Versuchsdurchführungen entstanden sein muss.

Nachdem das DEPC-Wasser, welches zur Lösung der mtDNA genutzt wurde als Verunreinigungsquelle festgestellt werden konnte, erfolgte die Etablierung eines alternativen endotoxinfreien Lösungsmittels. Es wurden im Anschluss weitere Versuchsreihen durch

geführt, in welchen die Wirkung von LPS und nun reiner mtDNA auf PBMCs untersucht wurde. Als Zielprodukt wurde hier neben IL-6 auch TNF α bestimmt. TNF α wird in relevanter Menge von Immunzellen nach LPS-vermittelter TLR4 Stimulation sezerniert (Kawai und Akira, 2010). Diese Zellreaktion ist nach Stimulation mit mtDNA jedoch nicht zu erwarten. So zeigten Di Caro et al. (2016) in Versuchsreihen mit PBMCs, dass nach 6-stündiger Inkubation mit mtDNA nur ein geringer Gehalt an TNF α von den Zellen sezerniert wurde. Diese Beobachtung deckt sich mit den Versuchsergebnissen dieser Arbeit. Während durch mtDNA eine deutliche dosisabhängige IL-6-Sekretion nach 24 Stunden erzielt werden konnte, fiel die Zellantwort bezüglich TNF α deutlich geringer aus. Hier zeigte sich im Vergleich zu der mit LPS behandelten Gruppe eine nur sehr schwache Sekretion dieses inflammatorischen Mediators, und das auch nur bei hoher mtDNA-Dosierung. Diese abschließenden Versuchsreihen bewiesen, dass mitochondriale DNA in isolierter naiver Form einen deutlichen immunologischen Eigeneffekt besitzt.

4.3 Bedingungsoptimierung der TLR9-Stimulationsversuche

4.3.1 Einfluss der Stimulationsdauer auf die zelluläre Immunantwort

Da zu Beginn der Versuchsreihen K-ODN als positive Vergleichsgruppe ausgewählt wurde, machte es Sinn, zunächst die schnelle Zellantwort zu untersuchen. Nach Stimulation von Cal-1-Zellen mit 3 μ g K-ODN wird der Höhepunkt der Genregulierung von proinflammatorischen Zytokinen nach 9 Stunden erreicht. Anschließend kommt es zu einem deutlichen Abfall (Steinhagen et al., 2012b). Aus diesem Grund wurde zunächst eine Stimulationsdauer von 3 Stunden gewählt. Da sich nach dieser Inkubationszeit keine relevante Expression von IL-6 und INF β durch mtDNA

beschrieben ließ, würde es sinnvoll sein im weiteren Verlauf zusätzlich die längerfristige Zellantwort zu beobachten. Auch im Vergleich der unterschiedlichen synthetischen CpG-ODN zeigen sich deutliche Unterschiede in der Reaktionskinetik von Immunzellen. Während K-ODN einen schnellen, kurzen Anstieg von inflammatorischen Genen bewirkt, fördert D-ODN einen anhaltenden Anstieg von Typ-I-Interferonen. Nach Stimulation von Cal-1-Zellen mit 3 µg D-ODN unter gleichen Bedingungen wie zuvor mit K-ODN beschrieben, kam es zu einem Maximum der Genexpression nach erst 27 Stunden. Anschließend war ein langsamer Abfall zu beobachten (Steinhagen et al., 2012b). Es zeigt sich demnach, dass zwei Substanzen, welche denselben Toll-like Rezeptor stimulieren, je nach molekularer Struktur eine andere Wirkdauer und Wirkungsweise besitzen. So stellt sich die Frage, ob mitochondriale DNA in ihrer Reaktionskinetik mehr dem Verhalten von D-ODN gleicht. Ries et al. (2013) zeigte in Versuchen mit pDCs, dass für die Aufnahme einer relevanten Menge von mitochondrialen ODN etwa 20 Stunden benötigt werden. Auch in den PBMC-Versuchsreihen dieser Arbeit konnte ein deutlicher Anstieg der IL-6 sowie IL-8 Genregulierung erst nach längerer Stimulationsdauer beobachtet werden. So imponierte bei beiden Zielgenen eine vier- bis fünffach gesteigerte Expression nach 24 Stunden im Vergleich zu drei Stunden. Um auszuschließen, dass eine zu kurze Stimulationsdauer die Ursache für die mangelnde Zellantwort der Cal-1-Zellen auf mitochondriale DNA darstellt, wären weitere Versuchsreihen mit Inkubationszeiten von 24 Stunden sinnvoll.

4.3.2 Einfluss der Konzentration der Stimulanzen auf die zelluläre Immunantwort

Auch die Konzentration der Stimulanzen, die für die Versuchsdurchführung genutzt wurde, trägt zu einer stärkeren oder schwächeren Ausprägung der Zellantwort bei. In Untersuchungen der dosisabhängigen IFN α -Sekretion von PBMCs nach Inkubation mit unterschiedlichen CpG-ODN Typen zeigte sich ein Maximum der Interferonfreisetzung bei einer Konzentration von 3 µg/ml (Krug et al., 2001). Steinhagen et al. (2012b) zeigte, dass bereits 1 µg/ml K-ODN ausreichen, um eine signifikante Cal-1-Stimulation zu erreichen. Es wurden daher für die Inkubation der positiven Vergleichsgruppe 1 µg/ml K-ODN verwendet.

Für die geeignete Dosierung mitochondrialer DNA zur Zellstimulation gibt es bisher keine ausreichende Datenlage. Veröffentlichte Versuchsreihen mit neutrophilen

Granulozyten beginnen bei Konzentrationen von 1 µg/ml (Zhang et al., 2010a) und reichen bis zu 100 µg/ml (Zhang et al., 2010b). Wobei durch die Stimulation mit 1 µg nativer mtDNA allein keine signifikante Zellantwort beobachtet werden konnte. Es wurde sich zu Beginn der Versuchsreihen dieser Arbeit an einem möglichen physiologischen Modell orientiert. In Blutplasma von Trauma-Patienten konnte ein Gehalt von mitochondrialer DNA um $2,7 \pm 0,94$ µg/ml nachgewiesen werden (Zhang et al., 2010a). Dementsprechend wurde mit einer Inkubationskonzentration von 5 µg/ml begonnen. Die abschließenden PBMC-Versuche dieser Arbeit demonstrieren eine eindeutig dosisabhängige Steigerung der IL-6 Sekretion nach Inkubation mit mtDNA. So übertrifft die Induktion von IL-6 in der Versuchsgruppe, welche mit 40 µg mtDNA behandelt wurde, die der Gruppe, die mit 1 µg mtDNA behandelt wurde um das Hundertfache. Es ist nachvollziehbar, dass größere Mengen native mtDNA für eine erfolgreiche Stimulation benötigt werden als von dem synthetischen Vergleichs-ODN, da in diesem die CpG-Sequenzen viel höher konzentrierter vorliegen.

Interessant wäre in diesem Sinne die weitere Betrachtung einer dosisabhängigen Versuchsreihe mit Cal-1-Zellen, um sicherzustellen, dass eine ausreichend hohe Konzentration für die Durchführung der Experimente genutzt wurde. Eine weitere Möglichkeit wäre die Erhöhung der CpG-Konzentration in der mitochondrialen DNA. Dies wurde bereits ansatzweise durch die Herstellung mitochondrialer PCR-Produkte versucht. Hier wurden mit Genabschnitten wie z.B. dem H-Loop 381, bereits möglich CpG-reiche Sequenzen repliziert. Aufgrund der geringen Probenmengen konnte jedoch nur eine niedrige Dosis von 100 ng/ml des PCR-Produktes für die Stimulation verwendet werden. Auch an dieser Stelle wären weiterführende Versuchsreihen der Cal-1-Zellkultur mit Inkubationsmengen von mindestens 1 µg, sowie eine weitere Dosissteigerung wegweisend. Des Weiteren könnten Versuchsreihen mit speziell hergestellten CpG-reichen mitochondrialen ODN durchgeführt werden. So dienen synthetische CpG-ODN als Vorbild für gekürzte CpG-reiche Inseln mitochondrialer DNA, welche als mtODN ein erhöhtes immunstimulatorisches Potential aufweisen könnten. PDCs, welchen mtODN transfiziert wurde, zeigen einen deutlich gesteigerten Grad der Zellaktivierung (Ries et al., 2013).

4.3.3 Steigerung der Rezeptoraffinität

Die unterschiedliche Reaktion der Cal-1-Zellen nach Inkubation mit K-ODN und mtDNA könnte sich auch durch eine andere Rezeptoraffinität der beiden Stimulanzen begründen lassen. Synthetisches CpG-ODN, stellt das optimale Substrat für den Toll-like Rezeptor 9 dar (Bauer et al., 2001). Dies liegt neben dem hohen Gehalt an unmethylierten CpG-Motiven auch an seiner Konfiguration als linearer DNA-Einzelstrang. So wird Einzelstrang-DNA vom TLR9 deutlich besser gebunden als Doppelstrang-DNA (Rutz et al., 2004). Im PBMC-Versuchen konnte gezeigt werden, dass doppelsträngiges CpG-A im Vergleich zu seiner Einzelstrang-Variante eine deutlich geringere bis keine IFN α -Produktion auslöst (Ries et al., 2013). Die in dieser Arbeit isolierte native mtDNA liegt hingegen, wie auch in physiologischen Bedingungen, als Doppelstrang vor. Diese Tatsache könnte eine deutliche Senkung der Bindungsaffinität am TLR9 und damit verbunden eine geringe Zellantwort der Cal-1-Zellen erklären.

Ries et al. (2013) konnte demonstrieren, dass pDCs nach 20-stündiger Inkubation 36,3 % dem Zellmedium zugefügten Einzelstrang mtODN aufgenommen hatten. Die Rate der internalisierten Doppelstrang mtODN betrug im Vergleich hierzu nur 7,9 %. Jedoch zeigten die Versuche auch, dass das Reaktionspotential der einzelnen mtODN-Subtypen je nach molekularer Form variiert. Von sieben ausgewählten mtODN-Arten wiesen drei eine höhere IFN α -Sekretion auf, wenn sie doppelstrangförmig in PBMCs transfiziert wurden. Dieses Versuchsmodell auf die Cal-1-Zellkultur zu übertragen könnte ebenfalls Aufschluss über den Einfluss der molekularen Konfiguration des Substrates auf die TLR9-vermittelte Zellreaktion bringen.

Charles Janeway beschrieb als einer der Ersten, dass zum Auslösen einer starken Immunantwort auf gereinigte Antigene der Einsatz zusätzlicher mikrobieller Bestandteile notwendig ist. Er nannte dieses Erkenntnis das „schmutzige Geheimnis der Immunologen“. Diese sogenannten Adjuvantien sind für die Aktivierung bestimmter Rezeptoren verantwortlich (Murphy und Weaver, 2018). Auch in zahlreichen weiteren Veröffentlichungen wird eine Adjuvans-abhängige Zellantwort nach Stimulation mit mitochondrialer DNA beschrieben. So konnte eine signifikante IL-8-Expression durch mtDNA in PMN-Versuchen nur mittels Zugabe von fMLF (N-Formylmethionyl-Leucyl-Phenylalanin) erzielt werden (Zhang et al., 2010a). Hierbei handelt es sich um ein chemotaktisches Peptid, welches eine deutliche Aktivierung von Granulozyten und

Makrophagen bewirkt (Schiffmann et al., 1975). Ohne diese vorhergehende Zellaktivierung zeigte sich in diesen Versuchen keine relevante Zytokinexpression (Zhang et al., 2010a). Ein weiteres Adjuvans stellt HMGB1 (High-Mobility Group Box 1) dar. Dieser körpereigene Botenstoff wird als DAMP von Immunzellen freigesetzt und stimuliert die Sekretion verschiedener proinflammatorischer Zytokine (Yang et al., 2005). Auch wird ein gewisses Aktivierungspotential auf den TLR9 beschrieben. Ivanov et al. (2007) zeigten eine signifikante Steigerung der inflammatorischen Zellantwort nach Stimulation von CpG-ODN in Kombination mit HMGB1. In Versuchsreihen mit PBMCs sollte mit diesem Zellaktivator die TNF α -Sekretion nach mtDNA-Inkubation erhöht werden. Es ließ sich hierdurch jedoch nur eine sehr geringe Steigerung der Stimulation erzielen (Di Caro et al., 2016). Auch die IFN α -Sekretion in PBMCs und pDCs ließ sich durch eine Kostimulation mit HMGB1 und mtDNA nicht beeinflussen.

Hingegen konnte durch Inkubation mit LL-37 in Kombination mit mitochondrialer DNA eine Erhöhung der IFN α -Produktion beschrieben werden (Ries et al., 2013). LL-37 ist ein humanes Cathelicidine mit starkem chemotaktischem Potential (Dürr et al., 2006). Es wird besonders durch die Aktivierung von Toll-like Rezeptoren wie auch dem TLR9 freigesetzt (Rivas-Santiago et al., 2008). In den Versuchen von Ries et al. (2013) zeigte sich, dass LL-37 die immunstimulatorische Wirkung von längerer Doppelstrang-mtDNA in pDCs erhöht. PBMCs zeigten hingegen keine Steigerung der Zellaktivität. Ebenso wurde keine relevante IFN α -Erhöhung nach Inkubation mit LL-37 in Kombination mit mtODN verzeichnet. Dieses Adjuvans würde sich dennoch für eine weitere Cal-1-Versuchsreihe anbieten. So könnte der Effekt einer TLR9-Rezeptor Aktivierung auf das Stimulationspotential mitochondrialer DNA untersucht werden.

4.3.4 Sicherung der intrazellulären mtDNA-Aufnahme

Da die TLR9-Bindung erst im Endosom stattfindet (Latz et al., 2004), muss für die Untersuchung dieser Signalkaskade die intrazelluläre Aufnahme des gewünschten Substrates gewährleistet sein. Nachdem in anfänglichen Versuchen mit Cal-1-Zellen und nativer mtDNA keine signifikante Zellreaktion beobachtet werden konnte, wurde zunächst angenommen, dass die Plasmid-DNA in dieser Form zu groß sei, um von der Zelle internalisiert werden zu können. Versuchsreihen mit PBMCs zeigten, dass im Vergleich zu der nativen mtDNA, CpG-reiche Inseln (ca. 200 bp groß) sowie noch

kleinere mtODN eine höhere IFN α -Sekretion verursachten (Ries et al., 2013). Aus diesem Grund folgte die Inkubation mit fragmentierter mtDNA und noch kleineren mitochondrialen PCR-Produkten. In beiden Versuchsgruppen konnte jedoch keine signifikante Verbesserung der Zellstimulation erreicht werden. Ob dies an einer mangelnden Aufnahmefähigkeit der Cal-1-Zellen liegt, könnte mit Hilfe Biotin-markierter Substrate untersucht werden. Nach erfolgter Inkubation mit den so markierten DNA-Fragmenten kann mittels einer anschließende Fluoreszenzmessung auf den Grad der internalisierten DNA rückgeschlossen werden (Gürsel et al., 2002).

Ein Weg, um die intrazelluläre Substrataufnahme zu sichern, ist die Transfektion mittels spezieller Transfektionsreagenzien. Eine Methode stellt die Lipofektion dar. Hierbei bilden kationischen Lipide Komplexe mit der zu transferierenden DNA. In diesen Liposomen eingelagert wird das Substrat einfacher von der Zelle über Endozytose aufgenommen und gelangt so in das Endosom (Zabner, 1997). Ein sehr gängiges und effektives Transfektionsreagenz stellt das Lipid N-(2,3-Dioleoyloxy-1-propyl) trimethylammonium Methylsulfat (DOTAP) dar. Mit dieser Methode lässt sich eine 500-600 effektiverer Aufnahme von DNA in Zellen erzielen (Zhong et al., 2010). Auch in den Versuchen von Ries et al. (2013) zeigte sich eine deutliche Differenz zwischen PBMCs, welche mit freier mtDNA inkubierten und denen, welchen die mtDNA mittels DOTAP transferiert wurde. In Abwesenheit von DOTAP konnte keine relevante Zellantwort beobachtet werden. Nach Lipofektion hingegen zeigte sich eine IFN α -Sekretion, die etwa 30 % des zum positiven Vergleich dienenden CpG-A-ODN-Effekts entsprach. Auch pDCs ließen sich nur durch DOTAP-Transfektion ausreichend stimulieren. In den Cal-1-Versuchsreihen dieser Arbeit hingegen konnte trotz Lipofektion der mitochondrialen DNA mittels DOTAP keine signifikante Zellantwort erzielt werden. Während durch Transfektion von K-ODN die IL-6-Expression beinahe verdoppelt werden konnte, blieb ein vergleichbarer Effekt in der mtDNA-Gruppe aus. Diese Beobachtung lässt vermuten, dass eine unzureichende Aufnahme der mtDNA in das Endosom der Cal-1-Zellen als mögliche Fehlerquelle des Versuchsmodells eher unwahrscheinlich ist.

4.4 Kritische Betrachtung der Rolle des TLR9 in der durch mitochondriale DNA ausgelösten Immunantwort

Die fehlend signifikante Zellantwort der Cal-1-Kultur wirft die Frage auf, ob die bisher angenommene TLR9-vermittelte Signalkaskade eine führende Rolle in der immunologischen Wirkung mitochondrialer DNA spielt. Eine fehlerhafte Versuchsdurchführung oder generelle Stimulationsschwierigkeiten der Zellkultur sind aufgrund der aussagekräftigen Ergebnisse der K-ODN-Vergleichsgruppe eher auszuschließen. Auch wurden, wie bereits diskutiert, unterschiedliche Maßnahmen beleuchtet, welche die Stimulationsbedingungen verbessern könnten. Es wäre somit zu erwarten, dass eine TLR9-vermittelte Zellaktivierung der Cal-1-Kultur durch mtDNA ähnliche Ergebnisse aufweisen müsste, wie sie in der K-ODN-Vergleichsgruppe beobachtet werden konnte.

Die Annahme, dass mitochondriale DNA genauso wie CpG-DNA über den TLR9 wirkt, wurde zahlreich publiziert. Jedoch fehlen bisher valide Nachweise im humanen Zellmodell. Ein Großteil der Daten, die diese Theorie stützen, basiert auf Versuchen mit Ratten oder Mäusen. Wie bereits in Absatz 1.2.2. beschrieben diente Schäfer et al. (2016) ein TLR9-Knockout-Maus-Modell als Grundlage zur Bestätigung der Hypothese. Es konnte so im Vergleich zu der Wild-Typ-Gruppe eine TLR9-abhängige immunologische Wirkung mitochondrialer DNA demonstriert werden. Es ist jedoch nicht zu vernachlässigen, dass einige bedeutende Differenzen zwischen dem murinen und humanen TLR9 existieren. Die Aminosäure-Sequenz des murinen TLR9 unterscheidet sich beispielsweise von der humanen um 24% (Hemmi et al., 2000). Zudem reagiert der TLR9 in Mäusen vermehrt auf andere CpG-Sequenzen als sein humanes Äquivalent. Dies zeigten Versuche, in denen humanen embryonalen Nierenzellen (HEK-293) entweder ein muriner oder ein humaner TLR9 transfiziert wurden. Der murine Rezeptor reagierte besonders auf das CpG Motiv GACGGT, während die humane Variante die Sequenz GTCGTT bevorzugte (Takeshita et al., 2004). Auch die Expressionsverbreitung des Toll-like Rezeptor 9 unterscheidet sich deutlich zwischen den beiden Spezies. Bei Mäusen wird zum Beispiel eine besonders hohe Rezeptordichte auf Zellen der Milz beschrieben, während bei Menschen das Vorkommen einer immunrelevanten Menge nur auf B-Zellen und pDCs bekannt ist (Hornung et al., 2002; Takeshita et al., 2004). Ebenfalls zeigten Versuche mit isolierten

Rattenmakrophagen nicht nur eine erhöhte Sekretion von TNF α und IL-6 nach Stimulation mit mtDNA, sondern auch eine gesteigerte TLR9-Expression (Zhang et al., 2013). Humane Makrophagen hingegen besitzen keine relevante TLR9-Expression und sind demnach isoliert nicht über diesen stimulierbar (Hornung et al., 2002).

Die Versuchsreihen mit humanen Zellkulturen, welche durch mitochondriale DNA stimuliert wurden, bieten bisher keine eindeutigen Beweise für eine TLR9-vermittelte Zellantwort. Die sehr geringe Sekretion von TNF α durch PBMCs nach Inkubation mit mtDNA (Di Caro et al., 2016) stellt keinen spezifischen Marker für den postulierten intrazellulären Signalweg dar. Ebenfalls zeigte Ries et al. (2013), dass mtDNA in PBMCs und pDCs eine IFN α -Erhöhung verursachen kann, wie diese jedoch induziert wird, bleibt unklar. Zudem wurde der Effekt von unmethylierter mtDNA mit *in vitro* methylierten mtDNA-Inseln verglichen. Bei der Versuchsgruppe, welche mit methylierter mtDNA inkubiert wurde, imponierte eine nur geringe Reduktion der IFN α -Produktion in PBMCs. Dies lässt die Schlussfolgerung zu, dass der immunstimulatorische Effekt von mitochondrialer DNA nur begrenzt auf das Vorkommen unmethylierter CpG-Sequenzen zurückzuführen ist (Ries et al., 2013). Auch diese Beobachtung bestärkt die Zweifel an einer TLR9-vermittelten Zellantwort.

Um die Rolle des TLR9 in diesem Sinne besser zu untersuchen, müssten gezielte Versuchsreihen im humanen Zellmodell folgen. Vergleichbare Versuche erfolgten bereits um die TLR9-vermittelte Wirkung von synthetischen CpG-ODN zu belegen. Hierbei wurden unterschiedlichen TLR9 negativen Zelltypen (beispielsweise HEK293) Plasmide mit humanen TLR9 transfiziert. Diese Plasmide trugen zudem eine NF- κ B-abhängige Luciferase. Wurden die Zellen nun mit CpG-ODN stimuliert, zeigte sich ein deutlicher Anstieg der Luciferaseaktivität (Takeshita et al., 2004). Dieses Versuchsmodell ließe sich ebenfalls mit mitochondrialer DNA sowie mtODN durchführen. Blicke hier eine relevante Aktivierung der Luciferase aus, spräche dies deutlich gegen eine TLR9-vermittelte Zellantwort durch mtDNA.

Eine andere Methode, die Rolle des TLR9 zu belegen, wäre eine Blockade des Rezeptors. Mit diesem Modell begründete bereits Zhang et al. (2010a) die TLR9-vermittelte Wirkung mitochondriale DNA auf Granulozyten. In diesen Versuchsreihen sollte das Oligonukleotid TTAGGG als TLR9-Antagonist verwendet werden. Dieses Oligonukleotid blockiert nachweislich die Bindung zwischen CpG-ODN und dem TLR9

im Endosom (Gursel et al., 2003). Es wurde die Expression von p38 und p-p38 (zwei Zwischenprodukte der intrazellulären TLR9-Kaskade) in den Granulozyten nach Inkubation mit purer mtDNA im Vergleich zur Kostimulation mit dem antagonisierenden ODN untersucht. Hierbei konnte ein deutlich abgeschwächter Effekt der Genexpression im Beisein von TTAGGG beobachtet werden (Zhang et al., 2010a). Dies wurde als Beweis für eine TLR9-vermittelte Wirkung angesehen und in folgenden Publikationen zahlreich zitiert. Retrospektiv zeigen sich in dieser Argumentationskette jedoch einige Lücken. Neben dem mangelnden TLR9-Vorkommen in humanen Granulozyten (Steinhagen et al., 2012a), stellt das genutzte Oligonukleotid zudem keinen TLR9-spezifischen Antagonisten dar. So konnte gezeigt werden, dass TTAGGG ebenfalls andere intrazelluläre Signalkaskaden inhibiert (Kaminski et al. 2013; Steinhagen et al., 2018). Des Weiteren spielt p38 ebenfalls in einigen anderen TLR9-unabhängigen Signalkaskaden eine Rolle (Akira et al., 2006). Es konnte demnach dargestellt werden, dass TTAGGG die Wirkung mitochondrialer DNA auf Granulozyten dämpft, jedoch bleibt der genaue intrazelluläre Vorgang weiterhin ungeklärt.

Ein geeigneterer TLR9-Antagonist wäre eher Chloroquin. Aufgrund seiner basischen Eigenschaft, blockiert diese Substanz die pH-abhängige Funktion der im Endosom lokalisierten Toll-like Rezeptoren. So inhibiert Chloroquin auch die Bindung von CpG-DNA mit dem TLR9 und die hierdurch ausgelöste Zellantwort (Rutz et al., 2004; Takeshita et al., 2004). Um einen weiteren Aufschluss über den genaueren Mechanismus der mtDNA induzierten Zellantwort in PBMCs zu erhalten, wären weitere Versuchsreihen mit Chloroquin interessant. Ließe sich die Interleukinproduktion durch mtDNA-Stimulation mittels dieser Substanz antagonisieren, spräche diese Beobachtung wiederum für eine TLR9-vermittelte Reaktion.

Eine weitere Grundlage für die Vermutung, dass andere Signalwege in der immunologischen Wirkung mitochondrialer DNA eine Rolle spielen, bieten veröffentlichte Versuchsreihen mit anderen TLR9-negativen humanen Zellkulturen. Wie zuvor beschrieben nutzen Zhang et al. (2010a; 2010b) polymorphkernige Leukozyten für ihre Studien. Weitere Daten zeigen, dass sich ebenfalls humane Monozyten durch eine Inkubation mit mtDNA aktivieren lassen (Schäfer et al., 2016). Dieser Nachweis wurde unter anderem durch Verwendung von THP-1-Zellen erbracht. Diese Zellkultur, etabliert aus peripherem Blut eines Patienten mit akuter Leukämie, ist ein gängiges Modell für die

Untersuchung der Funktionsweise von Monozyten und Makrophagen (Chanput et al., 2013). Nach 6-stündiger Inkubation mit 1 µg mtDNA konnte eine signifikante Erhöhung der Expressionsrate von TNF α , IL-1 β und HIF-1 α beschrieben werden (Schäfer et al., 2016). Auch zeigte sich, dass die Internalisierungsrate von mtODN in primären humanen Monozyten genauso hoch ist wie die in pDCs (Ries et al., 2013). Weder THP-1-Zellen noch primäre humane Monozyten besitzen jedoch eine immunrelevante Expression von TLR9 (Chanput et al., 2013; Hornung et al., 2002; Kadowaki et al., 2001). Die beobachtete Reaktion der Monozyten auf mitochondriale DNA ließ sich mit CpG-ODN nicht reproduzieren. So zeigte sich, dass primäre humane Monozyten in isolierter Form durch CpG-ODN nicht stimulierbar sind.

Im PBMC-Verbund, in Anwesenheit von pDCs, konnte jedoch eine deutliche Zellaktivierung beschrieben werden. Unter anderem zeigte sich hier eine deutliche Freisetzung von IL6 und TNF α durch die Monozyten (Hornung et al., 2002; Krieg, 2002). Die eindeutig TLR9-vermittelte Wirkung von CpG-DNA zeigt also ein anderes Reaktionsmuster als die mtDNA bedingte Zellreaktion.

In Betrachtung der vorliegenden Datenlage bleiben demnach deutliche Zweifel an der bisher postulierten Meinung, dass mitochondriale DNA wie bakterielle DNA im humanen Zellmodell hauptsächlich über den TLR9-Rezeptor ihren immunologischen Effekt ausbildet.

4.5 Alternative intrazelluläre Signalwege

Neben den Toll-like Rezeptoren existieren noch weitere Sensor-Systeme in den Zellen des angeborenen Immunsystems. Einige von ihnen befinden sich nicht auf der äußeren Zellmembran oder im Endosom, sondern liegen intrazellulär vor (Murphy und Weaver, 2018). Unter dem Konfokalmikroskop konnte neben der Lokalisation mitochondrialer DNA im Endosom von pDCs, auch eine deutliche Ansammlung von mtDNA im Zytosol sichtbar gemacht werden (Ries et al., 2013). Es sollen im Folgenden mögliche andere intrazelluläre Signalwege diskutiert werden, welche eine mtDNA-induzierte Immunreaktion begründen könnten.

4.5.1 Das zytosolische DNA-Sensor-System cGAS/STING

Ein wichtiges intrazelluläres Erkennungssystem für bakterielle und virale DNA stellt der cGAS/STING-Signalweg dar (Abbildung 26). Das Protein cGAS (zyklische GMP-AMP Synthase) ist im Zytoplasma lokalisiert und dient als Sensor für doppelsträngige DNA. Bindet nun Doppelstrang-DNA an cGAS, wandelt dieses Enzym ATP und GTP in zyklisches GMP-AMP (cGAMP) um. Im weiteren Verlauf wird cGAMP von STING (Stimulator von Interferongen), ein auf dem Endoplasmatischen Retikulum befindlicher Sensor, gebunden. Eine durch die Aktivierung von STING ausgelöste Signalkaskade endet in der vermehrten Expression von Typ-I-Interferon. Neben Interferon werden zudem weitere IRF3-abhängige inflammatorische Mediatoren, wie beispielsweise TNF α und IL-6 exprimiert.

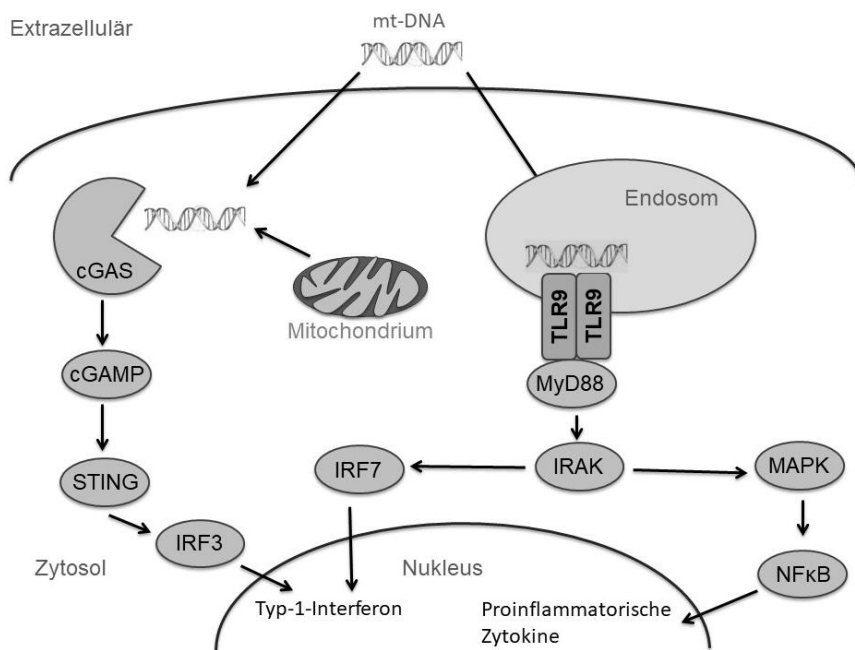


Abb. 26: Vergleich des intrazellulären Signalweges von TLR9 und cGAS/STING in Bezug auf die immunologische Wirkung von mtDNA

cGAS bindet internalisierte freie mtDNA sowie freigesetzte zelleigene mtDNA im Zytoplasma. Durch die Bildung von cGAMP kommt es zu einer Aktivierung von STING und somit zu einer IRF3-vermittelten Produktion von Typ-I-Interferon. Im Vergleich die vermutete TLR9-Signalkaskade: mtDNA bindet nach Aufnahme im Endosom an den TLR9. Durch die Stimulation von MyD88 kommt es zu einer Aktivierung von IRAK1 und -4. Es folgt durch MAP-Kinasen die Freisetzung des Transkriptionsfaktor NF κ B, welcher die Synthese von proinflammatorischen Zytokinen anregt. Des Weiteren bindet IRAK1 an das Protein IRF7 und führt somit zu einer vermehrten Expression von Typ-I-Interferon-Genen. Abb. modifiziert nach Kawai und Akira (2010) und Chen et al. (2016).

STING kann auch direkt durch prokaryotische zyklische Di-Nukleotide wie zyklisches di-GMP oder di-AMP aktiviert werden. Aus diesem Grund wird STING zu der Gruppe der PRRs gezählt (Ablasser und Chen, 2019; Chen et al., 2016). Ein besonderer Aspekt von cGAS besteht in der universalen Bindung von Doppelstrang-DNA. Im Gegensatz zu anderen PRRs löst sich dieser Rezeptor somit von dem Prinzip der pathogen spezifischen Mustererkennung. Es wird nicht nur Fremd- sondern auch zelleigene DNA gebunden (Ablasser und Chen, 2019). Zahlreiche Studien zeigen, dass ebenfalls mitochondriale DNA über diesen zytosolischen Sensor erkannt wird und den damit assoziierten Signalweg aktivieren kann (Rongvaux, 2018).

Im Zusammenhang mit der Entdeckung der cGAS/STING Signalkaskade wurde auch eine Caspase-unabhängige Form der Apoptose erkannt. Durch die Permeabilität der äußeren mitochondrialen Membran wird zelleigene mtDNA in das Zytosol freigesetzt und führt zu einer Aktivierung der cGAS/STING-Kaskade. Diese Form der Apoptose unterscheidet sich von der Caspase-vermittelten Variante durch eine den Zelltod begleitende Inflammation (Riley et al., 2018). Der direkte Zusammenhang zwischen zelleigener mtDNA-Freisetzung aus den Mitochondrien und der Aktivierung von cGAS konnte durch Versuche mit Ethidiumbromid bewiesen werden. Wird das Nährmedium von Zellen mit dieser Substanz angereichert, kommt es zu einer signifikanten Hemmung der mtDNA Replikation. Die im Nukleus befindliche genomische DNA bleibt von diesem Prozess unbeeinflusst (Hashiguchi und Zhang-Akiyama, 2009). Solche mtDNA-verarmten Zellen präsentierten eine deutlich geringere Interferonexpression durch Induktion der cGAS/STING Signalkaskade als die unbehandelte Vergleichsgruppe (Maekawa et al., 2019; Rongvaux et al., 2014).

Neben zelleigener mitochondrialer DNA kann ebenfalls internalisierte zellfremde mtDNA eine deutliche Zellaktivierung auslösen. In Versuchen mit THP-1-Zellen als Modell für humane Monozyten zeigte sich eine signifikante Erhöhung der Interferonexpression nach Inkubation mit mtDNA (Steinhagen et al., 2018). In weiteren Experimenten mit cGAS-Knockout-Zellen konnte gezeigt werden, dass dieser Effekt eindeutig über die Aktivierung dieses zytosolischen Rezeptors ausgelöst wird (Steinhagen et al., 2018). Diese Beobachtungen erklären, weshalb, wie bereits in Absatz 4.4. beschrieben, in humanen TLR9-negativen monozytären Zelllinien eine durch mtDNA induzierte Zellantwort beobachtet werden konnte (Schäfer et al., 2016). Aus dem Reaktionsprofil

von cGAS ergeben sich auch weitere Erklärungen für die unterschiedliche Stimulationsfähigkeit der verschiedenen Zelltypen durch mtDNA und CpG-ODN. So zeigte sich, dass Einzelstrang-DNA genauso wie Doppelstrang-RNA von cGAS zwar gebunden wird, jedoch keine cGAMP-Bildung bewirkt (Ablasser und Chen, 2019). Damit lässt sich auch die Wirkungslosigkeit von synthetischen CpG-ODN auf cGAS und dementsprechend auf TLR9-negative Zellen begründen. Eine weitere Eigenschaft des Rezeptors ist eine potentere Wirkweise nach Stimulation mit längeren DNA-Fragmenten im Vergleich zu kürzeren Fragmenten (Ablasser und Chen, 2019). In dieser Hinsicht unterscheidet sich die Affinität von cGAS von der des TLR9. Somit lässt sich auch die deutliche Zellaktivierung durch native mitochondriale DNA in den PBMC-Versuchsreihen dieser Arbeit begründen.

In den durch Steinhagen et al. (2018) veröffentlichten THP-1-Versuchen wird die inhibitorische Wirkung des Oligonukleotides TTAGGG auf die cGAS-abhängige STING-Aktivierung beschrieben. Durch diese Erkenntnis lassen sich die zuvor beschriebenen PMN-Daten (Absatz 4.4.) von Zhang et al. (2010a) weiterführend interpretieren. Der postulierte Nachweis einer mtDNA-induzierten TLR9-Signaltransduktion kann hiermit relativiert werden. Ebenso könnte es sich bei dieser Beobachtung um eine Blockade der cGAS-vermittelten Antwort der PMN-Zellkultur handeln.

Vor diesem Hintergrund lässt sich die in dieser Arbeit beschriebene Zellreaktion der PBMCs mit der mtDNA-vermittelten Aktivierung des cGAS/STING Signalweges begründen. Unklar bleibt jedoch, weshalb die Cal-1-Zellkultur sich nicht durch mitochondriale DNA stimulieren ließ. Es zeigte sich, dass einige humane Zelltypen, wie Hepatozyten oder T-Zellen keine cGAS/STING-Aktivität aufweisen (Chen et al., 2016). Demnach ist an dieser Stelle die cGAS-Aktivität in pDCs und Cal-1-Zellen genauer zu betrachten. Tatsächlich konnte demonstriert werden, dass primäre humane pDCs auf eine Inkubation mit doppelsträngiger DNA mit einer erhöhten IFN α -Sekretion reagierten. Auch zeigte sich, dass diese Zellantwort auf die Aktivierung von cGAS zurückzuführen war (Bode et al., 2016). Diese Beschreibung deckt sich mit den Beobachtungen von Ries et al. (2013). Hier wurde bereits gezeigt, dass die IFN α -Sekretion von PBMCs nach Stimulation mit transfizierter doppelsträngiger Genom-DNA genauso hoch ist wie mit mitochondrialer DNA. Es liegt nahe, dass sich auch diese Interferon-Freisetzung als Ergebnis einer cGAS-abhängigen STING-Aktivierung interpretieren lässt. Durch

Inhibitionsversuche mit Chloroquin konnte zusätzlich eine TLR9-unabhängige Sekretion des Interferons bewiesen werden. Die Cal-1-Zellkultur zeigte hinsichtlich dieses Zellreaktionsmusters äquivalente Ergebnisse (Bode et al., 2016). Da somit ein Vorkommen des cGAS/STING-Signalweges in pDCs und Cal-1-Zellen gesichert werden konnte, bleibt unklar, weshalb mtDNA in den Versuchsreihen dieser Arbeit keine signifikante Zellreaktion provoziert werden konnte. Bode et al. (2016) beschreibt eine Versuchsdurchführung mittels zytosolischer Transfektion der doppelsträngigen DNA. Eine solche Transfektion könnte beispielsweise mit Hilfe von Lipofectamin erfolgen. Hierbei handelt es sich um ein kationisches Liposom, welches ähnlich wie DOTAP die intrazelluläre Aufnahme von DNA begünstigt (Dalby et al., 2004). Die Durchführung von erneuten Cal-1-Versuchsreihen mit zytosolisch transfizierter mtDNA könnte demnach weiteren Aufschluss über die fehlende cGAS-Aktivierung in dieser Zellkultur geben.

4.5.2 Die Rolle des Inflammasom in der immunregulatorischen Wirkung mitochondrialer DNA

Einen weiteren Bestandteil des angeborenen Immunsystems stellt das sogenannte Inflammasom dar. 2002 erfolgte durch Martinon et al. die Erstbeschreibung dieses Multienzymkomplexes. Inflammasome sind zytosolisch lokalisierte Komplexe aus typischerweise drei Komponenten: einem spezialisierten Sensorprotein, dem ASC (apoptosis-associated Speck-like protein) mit Caspase-tragenden C-Terminus und der Pro-Caspase-1 (Rongvaux, 2018).

Kommt es zu einer Stimulation des Inflammasoms, folgt die Aktivierung von Pro-Caspase-1 zu Caspase-1 (Abbildung 27). Die aktive Caspase-1 fördert die Sekretion von proinflammatorischen Zytokinen, insbesondere IL-1 β und IL-18 (Latz et al., 2013). Die Konsequenz dieser intrazellulären Signalkaskade ist die Pyroptosis, eine spezielle Form des programmierten Zelltods. Hierbei kommt es durch Anschwellung des Zytoplasmas zu einer Ruptur der Zellmembran und somit zu einem inflammatorischen Zelltod (Broz und Dixit, 2016). Auch die Sekretion von IL-1 β provoziert eine stark pyrogene systemische Immunreaktion (Dinarello, 2009). Klassischerweise geht dieser gesamten Kaskade ein Initiationsschritt voraus. Dies kann beispielsweise eine Toll-like Rezeptor induzierte Aktivierung der Inflammasombildung sein. Dieser Signalschritt verstärkt die Inflammasomwirkung während systemischen Infektionen (Murphy und

Weaver, 2018). Die Sensorproteine des Inflammasoms stellen unterschiedliche Arten von zytosolischen PRRs dar (Broz und Dixit, 2016), welche deutliche strukturelle Ähnlichkeiten zu NODs (nukleotidbindende Oligomerisierungsdomäne) aufweisen (Martinon et al., 2002). Dies sind zytosolische Sensoren, welche spezifische Pathogene binden und so als NOD-like Rezeptoren (NLR) inflammatorische Reaktionen auslösen können (Murphy und Weaver, 2018). Die Rezeptoren des Inflammasoms stellen eine Unterart dieser NLRs dar.

Ein Vertreter der Inflammasom-aktivierenden Sensoren ist beispielsweise die NLRP (Nucleotid-binding domain leucine-rich repeat-containing receptor)-Familie. Das NLRP-3-Inflammasom ist die bisher am ausführlichsten erforschte Variante (Broz und Dixit, 2016; Latz et al., 2013). In diversen Studien konnte demonstriert werden, dass zytosolische mitochondriale DNA die Inflammasomwirkung über NLRP-3 maßgeblich beeinflussen kann (Rongvaux, 2018; Sandhir et al., 2017). Es zeigte sich, dass mtDNA, nicht nur durch eine erhöhte Permeabilität der äußeren mitochondrialen Membran ins Zytosol gelangen kann (Patrushev et al., 2004), sondern auch eine vorhergehende Stimulation von Zellen mit PAMPs wie beispielsweise LPS den Gehalt von zytosolischer mtDNA signifikant steigert (Nakahira et al., 2011). So wiesen Makrophagen, welche zuvor mit LPS inkubiert wurden, eine deutlich höhere mtDNA Freisetzung als unbehandelte Zellen auf. Der Gehalt von nukleärer DNA blieb hingegen unbeeinflusst. Auch zeigte Nakahira et al. (2011), dass mtDNA in diesen Makrophagen deutlich zu einer NLRP-3-vermittelten IL-1 β - und IL-18-Sekretion beitrug. Besonders oxygenierte mitochondriale DNA aktiviert das NLRP-3-Inflammasom. Zu der Freisetzung von oxygenierter mtDNA kommt es hauptsächlich während des Apoptose-Vorganges (Shimada et al., 2012).

Ein weiterer Vertreter der Inflammasom-aktivierenden Rezeptoren stellt die PYHIN (pyrin and HIN domain-containing protein)-Familie dar. Eins dieser PYHIN-Proteine ist AIM2 (absent in melanoma 2), welches intrazelluläre doppelsträngige DNA erkennt (Broz und Dixit, 2016; Murphy und Weaver, 2018). Auch transfizierte mitochondriale DNA ist in der Lage über AIM2 eine Inflammasom-Aktivierung zu provozieren. So fand sich in Versuchen mit Makrophagen eine deutliche AIM2-induzierte IL-1 β -Sekretion nach zytosolischer Transfektion von zellfremder mtDNA. Im Gegensatz zu NLRP-3 wurde jedoch zelleigene oxygenierte DNA, welche durch Apoptose freigesetzt wurde,

nicht erkannt (Shimada et al., 2012). Es gibt somit einen Unterschied in der Erkennung endogener und exogener mtDNA durch die Zellen. In beiden Fällen endet die intrazelluläre Kaskade jedoch in der Aktivierung des Inflammasoms und somit in der Freisetzung von inflammatorischen Zytokinen (Abbildung 27). Als führende Produkte dieser Zytokin-Sekretion gelten, wie zuvor beschrieben, IL-1 β und IL-18 (Broz und Dixit, 2016; Latz et al., 2013). Es konnte jedoch ebenfalls eine Inflammasom-induzierte Produktion von Typ-I-Interferon nachgewiesen werden. In Versuchen mit Monozyten im THP-1-Modell zeigte sich eine deutliche IFN- β -Produktion, welche durch ILI16 (Interferon- γ -induzierbares Protein 16) ausgelöst wurde (Unterholzner et al., 2010). ILI16 zählt ebenfalls zu den Inflammasom-aktivierenden Sensorproteinen und gehört zu der PYHIN-Familie. Wie AIM2 erkennt dieser Rezeptor doppelsträngige DNA (Murphy und Weaver, 2018). Es zeigte sich, dass die Stimulation von ILI16 eine Aktivierung der STING-Kaskade bewirkt (Abbildung 27) und somit die Produktion von Typ-I-Interferon auslöst (Unterholzner et al. 2010).

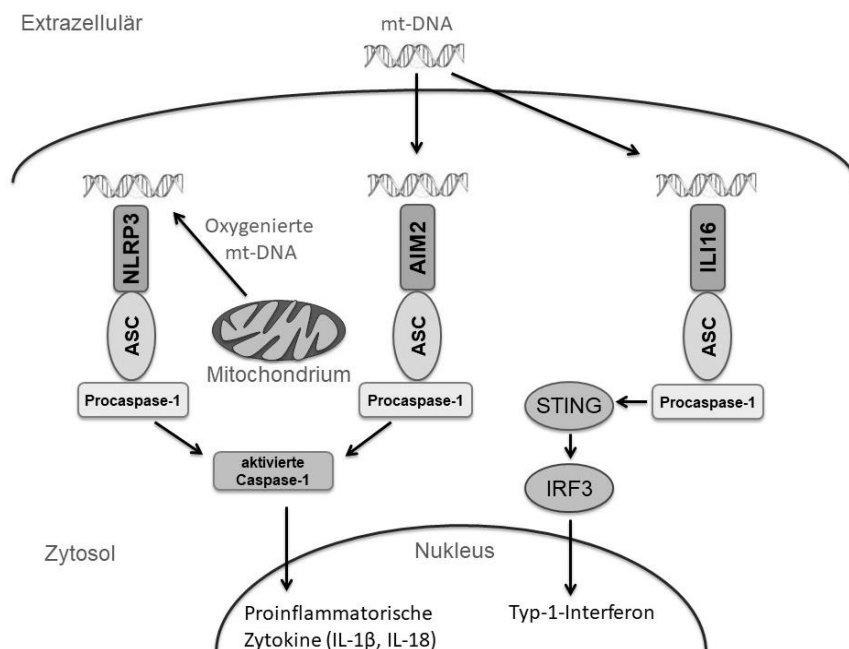


Abb. 27: Inflammasom-vermittelte Wirkung von mtDNA

Zelleigene oxygeniierte mtDNA wird im Zytosol durch das NLRP3-Inflammasom erkannt. Das AIM2-Inflammasom bindet hingegen bevorzugt internalisierte mtDNA. Die Stimulation beider Inflammasom-Komplexe führt durch die Aktivierung von Caspase-1 zu einer Synthese von proinflammatorischen Zytokinen, bevorzugt IL-1 β und IL-18. Im Vergleich hierzu die mögliche Wirkung über den ILI16-Rezeptor, welcher STING aktiviert und so die Typ-I-Interferon-Produktion anregt. Abb. modifiziert nach Broz und Dixit (2016).

IL16 imponiert mit dieser Erkenntnis neben cGAS als ein wichtiger Regulator der STING-vermittelten Interferonproduktion in Immunzellen. Auch konnte gezeigt werden, dass eine vermehrte Sekretion von Typ-I-Interferonen den Gehalt von AIM2 im Zytosol erhöht (Storek et al., 2015). Somit wird durch eine vermehrte Detektion doppelsträngiger DNA ein positiver Regulationsmechanismus gewährleistet.

In Zusammenschau dieser Ergebnisse lässt sich demnach postulieren, dass durch Infektionen Zellen nicht nur vermehrt mitochondriale DNA freisetzen, sondern dieses DAMP auch Inflammation-vermittelt zu einer weiteren erschwerten systemischen Inflammation beiträgt. Die beobachtete Zellreaktion in den PBMC-Versuchen dieser Arbeit könnte demnach neben cGAS-STING- ebenfalls Inflammation-induziert zu werden sein. Auch die in Absatz 4.3.3. diskutierte Notwendigkeit diverser Adjuvantien für eine erfolgreiche Stimulation von unterschiedlichen Zelltypen mit mitochondrialer DNA ließe sich somit begründen. Diese Koinkubation könnte demnach den zuvor beschriebenen Stimulationsschritt der Zelle für eine verbesserte Aktivierung des Inflammation-induzierers darstellen. Dafür spräche zum Beispiel die Tatsache, dass IL-37 die Interferon-Sekretion durch doppelsträngige mtDNA steigern kann, jedoch keinen Einfluss auf die Wirkung von einzelsträngigen mtODN hat (Ries et al., 2013).

Es zeigte sich zudem, dass das inhibitorische Oligonukleotid TTAGGG durch Bindung an AIM2 auch die Inflammation-Wirkung hemmen kann (Kaminski et al. 2013). Somit wäre eine weitere Erklärung der durch Zhang et al. (2010a) beschriebenen Reaktion der PMN ebenfalls die Aktivierung des AIM2-Inflammation-induzierers durch mitochondriale DNA. Interessant wären des Weiteren Versuche, in denen die mtDNA-vermittelte Wirkung auf IL16 und damit einer cGAS-unabhängigen Form der STING-Aktivierung untersucht werden könnte. Aufgrund der engen Kooperation von TLR-, cGAS- und Inflammation-induziererswirkung (Murphy und Weaver, 2018; Storek et al., 2015), lassen sich zum aktuellen Stand der Forschung in Hinblick auf den immunologischen Effekt mitochondrialer DNA die drei Signalwege nicht eindeutig isoliert betrachten.

4.6 Schlussfolgerung und Aussicht

Die in dieser Arbeit dargestellten Ergebnisse und die Diskussion der veröffentlichten Datenlage zeigt, dass für das tiefergehende Verständnis der immunmodulatorischen Wirkung von mitochondrialer DNA noch weitere Forschungsarbeit geleistet werden muss. Die eindeutige klinische Relevanz dieses DAMP kann vielseitig gezeigt werden. Wie bereits in Absatz 1.2.2. ausgeführt, spielt mtDNA in SIRS und Sepsis eine nachweisbare Rolle, welche unmittelbar mit einer gesteigerten Mortalitätsrate einhergeht (Schäfer et al. 2016; Nakahira et al., 2013). Es konnte belegt werden, dass mtDNA vermehrt durch infektiöse Stimuli freigesetzt wird und im Folgenden seine proinflammatorische Wirkung unter anderem über den cGAS/STING-Signalweg und zum anderen Inflammasom-vermittelt entfaltet (Nakahira et al., 2011; Rongvaux et al., 2014; Steinhagen et al., 2018; Storek et al., 2015). Auch konnte im Blutserum von Sepsis-Patienten ein deutlich erhöhter Gehalt von IL-1 β und IL-18 nachgewiesen werden, was auf eine starke Inflammasomwirkung hinweist (Nakahira et al., 2011). Die Pyroptose als Konsequenz der Inflammasom-Aktivierung (Broz und Dixit, 2016) lässt Rückschlüsse auf eine Ursache für die Entstehung von Gewebeschäden sowie Mikrozirkulationsstörungen und ein damit einhergehendes Multiorganversagen im septischen Verlauf zu (Steinhagen et al., 2020). Auch zeigte sich, dass durch eine Aktivierung des STING-Signalweges Apoptose gefördert wird. Die Kommunikation der Zellen über Gap Junction verursacht eine Signalweitergabe in umliegendes Gewebe und somit ebenfalls eine Ausbreitung des Zellunterganges (Ablasser und Chen, 2019). Ein genaues Verständnis über die exakten Pathomechanismen könnte helfen, diesen Teufelskreis zu durchbrechen und neue therapeutische Ansätze zu finden. Die bisher bekannten Abläufe und Komplikationen im septischen Geschehen sind komplex und fordern neue therapeutische Ansätze (Steinhagen et al., 2020). Es zeigt sich jedoch, dass mitochondriale DNA nicht nur im Verlauf von SIRS und Sepsis relevant ist. Auch konnte demonstriert werden, dass eine Freisetzung dieses DAMP für die Entstehung des akuten Organversagen eine bedeutende Rolle spielt. So beschrieb beispielsweise Wu et al. (2019), dass mitochondriale DNA Inflammasom-vermittelt ein akutes Lungenversagen auslösen kann. Auch konnte gezeigt werden, dass mitochondriale DNA im akuten Nierenversagen nicht nur vermehrt freigesetzt wird, sondern auch über den

cGAS/STING-Signalweg eine inflammatorische Reaktion der Zellen bewirkt (Maekawa et al., 2019).

Ein Ansatz in der Suche nach alternativen therapeutischen Möglichkeiten stellt beispielsweise die Verwendung von inhibitorischen Oligonukleotiden dar. In murinen Versuchsreihen konnten bereits Nachweise der Wirksamkeit von TTAGGG erbracht werden. So zeigte sich, dass der inhibitorische Effekt dieses Oligonukleotides nicht nur die Entwicklung eines septischen Schocks reduzieren kann, sondern auch effektiv die inflammatorische Reaktion diverser Autoimmunerkrankungen wie Arthritis und systemischen Lupus Erythematoses senkt (Klinman et al., 2008). Wie bereits diskutiert lässt sich mittels TTAGGG ebenfalls die Wirkung mitochondrialer DNA auf den cGAS/STING-Signalweg sowie das AIM2-Inflammasome inhibieren (Kaminski et al., 2013; Steinhagen et al., 2018). Es zeigt sich demnach, dass die Kenntnis der genauen zellulären Signalkaskaden eine Möglichkeit für die weitere Entwicklung therapeutischer Ansätze im klinischen Alltag bietet. Die Relevanz von mitochondrialer DNA als DAMP in Hinblick auf die Aktivierung des angeborenen Immunsystems ist, wie dargelegt, eindeutig bewiesen und rechtfertigt die Notwendigkeit als weiterführender Forschungsinhalt präsent zu bleiben.

5. Zusammenfassung

Das angeborene Immunsystem reagiert auf unterschiedliche PAMPs mit einer inflammatorischen Zellantwort, welche schwere systemische Schäden bis hin zum Multiorganversagen verursachen kann. Durch diesen Zelluntergang finden sich wiederum vermehrt körpereigene Strukturen in der Blutbahn, welche als DAMP ebenfalls Immunzellen stimulieren. Ein bekanntes DAMP ist die mitochondriale DNA. Im Blutserum von Trauma- sowie Sepsis-Patienten kann mtDNA zum einen in erhöhter Menge nachgewiesen werden, zum anderen stellt ihr Gehalt einen relevanten Indikator für die Mortalitätsrate bei diesen Krankheitsbildern dar. Auch kann die Freisetzung von mtDNA direkt mit der Entstehung von akutem Organversagen in Verbindung gebracht werden. Wie andere PAMPs und DAMPs erkennen die Zellen des angeborenen Immunsystems mtDNA über PRRs. Durch das gehäufte Vorkommen unmethylierter CpG-Sequenzen besteht eine starke molekulare Ähnlichkeit von mtDNA mit bakterieller DNA. Aus diesem Grund wurde bisher postuliert, dass die immunologische Wirkung von mtDNA ebenfalls durch Stimulation des TLR9 ausgelöst wird. Diese Theorie konnte im humanen Zellmodell bisher jedoch nicht eindeutig bewiesen werden. In dieser Arbeit wurde daher die Zellantwort der Cal-1-Zellkultur, als pDC-Modell, mit der Reaktion von PBMCs auf die Exposition mit mtDNA verglichen. Als positive Kontrollgruppe diente synthetisches CpG-ODN, welches nachweislich eine TLR9-vermittelte Synthese von Interleukinen und Typ-I-Interferonen verursacht.

Es zeigte sich, dass mitochondriale DNA, im Gegensatz zu CpG-ODN, keine signifikante Genexpression von inflammatorischen Mediatoren wie IL-6 und IFN β in der Cal-1-Zellkultur verursacht. Auch die Stimulation mit kleineren DNA-Fragmenten oder CpG-reichen PCR-Produkten erzielte keinen relevanten Effekt. Um die Internalisierung des Substrates zu sichern, wurde eine intrazelluläre Transfektion mittels DOTAP durchgeführt. Eine vermehrte Zytokin- oder Interleukin-Expression durch mtDNA konnte dadurch dennoch nicht beobachtet werden. In PBMCs hingegen fand sich eine eindeutig dosisabhängige Zellreaktion nach Inkubation mit mtDNA über 24 Stunden. Hier konnte demonstriert werden, dass native mtDNA eine signifikante Sekretion von IL-6 und IL-8 durch primäre mononukleäre Zellen verursacht. Wegen der fehlenden Zellantwort der Cal-1-Kultur auf die Exposition mit mtDNA, sollte die bisher angenommene isolierte TLR9-Wirkung kritisch betrachtet werden. Die deutlichen Stimulationsergebnisse in den

PBMC-Versuchsreihen sprechen eher für die Relevanz einer Interaktion der unterschiedlichen Zellarten in Hinblick auf die immunologische Wirkung von mtDNA. Ebenfalls kommen andere intrazelluläre Signalwege als Auslöser der beobachteten Zellantwort in Betracht. So konnte in zahlreichen Publikationen die vermehrte Sekretion von inflammatorischen Mediatoren durch mtDNA mit der cGAS/STING-Kaskade sowie dem Inflammasom in Verbindung gebracht werden. Für ein differenzierteres Verständnis der genauen intrazellulären Wirkweise von mtDNA und der Rolle des TLR9, muss weiterführende Forschungsarbeit geleistet werden. Die Sinnhaftigkeit lässt sich durch die sichtbare klinische Relevanz eindeutig begründen. So könnten weitere Erkenntnisse eine wichtige Grundlage für die Entwicklung neuer therapeutischer Ansätze, unter anderem in der Behandlung von Sepsis und SIRS, darstellen.

6. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Übersicht TLR-Unterarten und deren Liganden	11
Abb. 2: TLR9-Signalweg	13
Abb. 3: Aufbau eines Mitochondriums	15
Abb. 4: Das mitochondriale Genom	16
Abb. 5: Auftrennung der Blutbestandteile nach Dichtegradientenzentrifugation	29
Abb. 6: Absorptionskurve der spektrophotometrischen Konzentrations-Messung von mtDNA	31
Abb. 7: Agarose-Gelelektrophorese mitochondrialer PCR-Genprodukte	34
Abb. 8: Agarose-Gelelektrophorese der mtDNA	35
Abb. 9: Funktionsprinzip der quantitativen Echtzeit-PCR	39
Abb. 10: Funktionsprinzip eines Sandwich-ELISA	40
Abb. 11: IL-6 und IFN β Expression nach Stimulation der Cal-1-Zellen	44
Abb. 12: IL-6 und IFN β Expression nach Stimulation der Cal-1-Zellen mit fragmentierter mtDNA	45
Abb. 13: IL-6 und IFN β Expression nach Stimulation der Cal-1-Zellen mit PCR-Produkten mitochondrialer Gene	47
Abb. 14: IL-6 und IFN β Expression nach Transfektionsversuchen der nativen mtDNA mit DOTAP in Cal-1-Zellen	48
Abb. 15: Expression des IL-6-Gens nach Stimulation der PBMCs mit mtDNA nach 3 und 24 Stunden	49
Abb. 16: Sekretion von IL-6 nach Stimulation der PBMCs mit mtDNA	50
Abb. 17: Expression nach Stimulation der PBMCs mit mtDNA nach 3 und 24 Stunden	51
Abb. 18: Endotoxin-Nachweis mittels Limulus-Assey in DEPC-Wasser und der darin gelösten mtDNA	52
Abb. 19: Vergleich der IL-6-Sekretion von PBMCs nach Stimulation mit LPS bzw. der fraglich kontaminierten mtDNA-Proben	53
Abb. 20: Vergleich der IL-6-Sekretion von PBMCs nach Stimulation mit LPS bzw. mit mtDNA-Proben in dem fraglich kontaminierten DEPC-Wasser	54
Abb. 21: Vergleich der TNF α -Sekretion von PBMCs nach Stimulation mit LPS bzw. der fraglich kontaminierten mtDNA-Proben	55

Abb. 22: Vergleich der TNF α -Sekretion von PBMCs nach Stimulation mit LPS bzw. mit mtDNA-Proben in dem fraglich kontaminierten DEPC-Wasser	56
Abb. 23: Vergleichende Endotoxin-Testung der kontaminierten Proben zu der endotoxinfrei präparierten mtDNA	57
Abb. 24: Vergleich der IL-6-Sekretion von PBMCs nach Stimulation mit LPS bzw. mit endotoxin-freier mtDNA	58
Abb. 25: Vergleich der TNF α -Sekretion von PBMCs nach Stimulation mit LPS bzw. mit endotoxin-freier mtDNA	59
Abb. 26: Vergleich des intrazellulären Signalweges von TLR9 und cGAS/STING in Bezug auf die immunologische Wirkung von mtDNA	74
Abb. 27: Inflammasom-vermittelte Wirkung von mtDNA	79

7. Literaturverzeichnis

Abdelsadik A, Trad A. Toll-like receptors on the fork roads between innate and adaptive immunity. *Hum Immunol* 2011; 72: 1188-1193

Ablasser A, Chen ZJ. cGAS in action: Expanding roles in immunity and inflammation. *Science*. 2019; 363: 6431

Akira S, Uematsu S, Takeuchi O. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* 2006; 124: 783-801

Anderson S, Bankier AT, Barrell BG, de Bruijn MH, Coulson AR, Drouin J, Eperon IC, Nierlich DP, Roe BA, Sanger F, Schreier PH, Smith AJ, Staden R, Young IG. Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature* 1981; 290: 457-465

Andreu AL, Martí R, Hirano M. Analysis of human mitochondrial DNA mutations. In: Potter NT, ed. *Neurogenetics Methods and Protocols*. Totowa, NJ: Humana Press Inc., 2003: 185-197

Autissier P, Soulas C, Burdo TH, Williams KC. Evaluation of a 12-color flow cytometry panel to study lymphocyte, monocyte, and dendritic cell subsets in humans. *Cytometry A* 2010; 77: 410-419

Banchereau J, Steinman RM. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 1998; 392: 245-52

Bauer S, Kirschning CJ, Häcker H, Redecke V, Hausmann S, Akira S, Wagner H, Lipford GB. Human TLR9 confers responsiveness to bacterial DNA via species-specific CpG motif recognition. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98: 9237-9242

Bode C, Fox M, Tewary P, Steinhagen A, Ellerkmann RK, Klinman D, Baumgarten G, Hornung V, Steinhagen F. Human plasmacytoid dendritic cells elicit a Type I Interferon

response by sensing DNA via the cGAS-STING signaling pathway. *Eur J Immunol* 2016; 46: 1615-1621

Bowie A, O'Neill LA. The interleukin-1 receptor / Toll-like receptor superfamily: signal generators for pro-inflammatory interleukins and microbial products. *J Leukoc Biol* 2000; 67: 508-514

Broz P, Dixit VM. Inflammasomes: mechanism of assembly, regulation and signalling. *Nat Rev Immunol* 2016; 16: 407-420

Bustin SA, Benes V, Nolan T, Pfaffl MW. Quantitative real-time RT-PCR--a perspective. *Mol Endocrinol* 2005; 34: 597-601

Cardon LR, Burge C, Clayton DA, Karlin S. Pervasive CpG suppression in animal mitochondrial genomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994; 91: 3799-3803

Chanput W, Mes JJ, Wichers HJ. THP-1 cell line: an in vitro cell model for immune modulation approach. *Int Immunopharmacol* 2014; 23: 37-45

Chen Q, Sun L, Chen ZJ. Regulation and function of the cGAS-STING pathway of cytosolic DNA sensing. *Nat Immunol* 2016; 17: 1142-1149

Coch C, Busch N, Wimmenauer V, Hartmann E, Janke M, Abdel-Mottaleb MM, Lamprecht A, Ludwig J, Barchet W, Schlee M, Hartmann G. Higher activation of TLR9 in plasmacytoid dendritic cells by microbial DNA compared with self-DNA based on CpG-specific recognition of phosphodiester DNA. *J Leukoc Biol* 2009; 86: 663-670

Dalby B, Cates S, Harris A, Ohki EC, Tilkins ML, Price PJ, Ciccarone VC. Advanced transfection with Lipofectamine 2000 reagent: primary neurons, siRNA, and high-throughput applications. *Methods* 2004; 33: 95-103

Desjardins P, Conklin D. NanoDrop Microvolume Quantitation of Nucleic Acids. *J Vis Exp* 2010; 45: 2565

Di Caro V, Walko TD, R. Bola RA, Hong JD, Pang D, Hsue V, Au AK, Halstead ES, Carcillo JA, Clark RSB, Aneja RK. Plasma Mitochondrial DNA—A Novel Damp in Pediatric Sepsis. *Shock* 2016; 45: 506–511

Dinarello CA. Immunological and inflammatory functions of the interleukin-1 family. *Annu Rev Immunol* 2009; 27: 519-550

Dromparis P, Michelakis ED. Mitochondria in vascular health and disease. *Annu Rev Physiol* 2013; 75: 95-126

Dürr UH, Sudheendra US, Ramamoorthy A. LL-37, the only human member of the cathelicidin family of antimicrobial peptides. *Biochim Biophys Acta* 2006; 1758: 1408-1425

Gray MW. Mitochondrial evolution. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2012; 4: a011403

Gürsel M, Verthelyi D, Gürsel I, Ishii KJ, Klinman DM. Differential and competitive activation of human immune cells by distinct classes of CpG oligodeoxynucleotide. *J Leukoc Biol* 2002; 71: 813-820

Gursel I, Gursel M, Yamada H, Ishii KJ, Takeshita F, Klinman DM. Repetitive elements in mammalian telomeres suppress bacterial DNA-induced immune activation. *J Immunol* 2003; 171: 1393-1400

Hashiguchi K, Zhang-Akiyama QM. Establishment of human cell lines lacking mitochondrial DNA. *Methods Mol Biol* 2009; 554: 383-891

Hemmi H, Takeuchi O, Kawai T, Kaisho T, Sato S, Sanjo H, Matsumoto M, Hoshino K, Wagner H, Takeda K, Akira S. A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature* 2000; 408: 740-745

Hornung V, Rothenfusser S, Britsch S, Krug A, Jahrsdörfer B, Giese T, Endres S, Hartmann G. Quantitative expression of toll-like receptor 1-10 mRNA in cellular subsets of human peripheral blood mononuclear cells and sensitivity to CpG oligodeoxynucleotides. *J Immunol* 2002; 168: 4531-4537

Ivanov S, Dragoi AM, Wang X, Dallacosta C, Louten J, Musco G, Sitia G, Yap GS, Wan Y, Biron CA, Bianchi ME, Wang H, Chu WM. A novel role for HMGB1 in TLR9-mediated inflammatory responses to CpG-DNA. *Blood* 2007; 110: 1970-1981

Iyer SS, Ghaffari AA, Cheng G. Lipopolysaccharide-Mediated IL-10 Transcriptional Regulation Requires Sequential Induction of Type I IFNs and IL-27 in Macrophages. *J Immunol* 2010; 185: 6599–6607

Kadowaki N, Ho S, Antonenko S, Malefyt RW, Kastelein RA, Bazan F, Liu YJ. Subsets of human dendritic cell precursors express different toll-like receptors and respond to different microbial antigens. *J Exp Med* 2001; 194: 863-869

Kaisho T, Akira S. Toll-like receptor function and signaling. *J Allergy Clin Immunol* 2006; 117: 979-987

Kaminski JJ, Schattgen SA, Tzeng TC, Bode C, Klinman DM, Fitzgerald KA. Synthetic oligodeoxynucleotides containing suppressive TTAGGG motifs inhibit AIM2 inflammasome activation. *J Immunol* 2013; 191: 3876-3883

Kawai T, Akira S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat Immunol* 2010; 11: 373-384

Kerkmann M, Rothenfusser S, Hornung V, Towarowski A, Wagner M, Sarris A, Giese T, Endres S, Hartmann G. Activation with CpG-A and CpG-B oligonucleotides reveals two distinct regulatory pathways of type I IFN synthesis in human plasmacytoid dendritic cells. *J Immunol* 2003; 170: 4465-4474

Klinman D, Shirota H, Tross D, Sato T, Klaschik S. Synthetic oligonucleotides as modulators of inflammation. *J Leukoc Biol* 2008; 84: 958-964

Krieg AM. CpG motifs in bacterial DNA and their immune effects. *Annu Rev Immunol* 2002; 20: 709-60

Krug A, Rothenfusser S, Hornung V, Jahrsdörfer B, Blackwell S, Ballas ZK, Endres S, Krieg AM, Hartmann G. Identification of CpG oligonucleotide sequences with high induction of IFN-alpha/beta in plasmacytoid dendritic cells. *Eur J Immunol* 2001; 31: 2154-2163

Latz E, Schoenemeyer A, Visintin A, Fitzgerald KA, Monks BG, Knetter CF, Lien E, Nilsen NJ, Espevik T, Golenbock DT. TLR9 signals after translocating from the ER to CpG DNA in the lysosome. *Nat Immunol* 2004 Feb; 5: 190-198.

Latz E, Xiao TS, Stutz A. Activation and regulation of the inflammasomes. *Nat Rev Immunol*. 2013; 13: 397-411

Lüllmann-Rauch R. Taschenlehrbuch Histologie. Stuttgart: Thieme, 2009

Maeda T, Murata K, Fukushima T, Sugahara K, Tsuruda K, Anami M, Onimaru Y, Tsukasaki K, Tomonaga M, Moriuchi R, Hasegawa H, Yamada Y, Kamihira S. A novel plasmacytoid dendritic cell line, CAL-1, established from a patient with blastic natural killer cell lymphoma. *Int J Hematol* 2005; 81: 148-154

Maekawa H, Inoue T, Ouchi H, Jao TM, Inoue R, Nishi H, Fujii R, Ishidate F, Tanaka T, Tanaka Y, Hirokawa N, Nangaku M, Inagi R. Mitochondrial Damage Causes

Inflammation via cGAS-STING Signaling in Acute Kidney Injury. *Cell Rep* 2019; 29: 1261-1273

Malka F, Lombès A, Rojo M. Organization, dynamics and transmission of mitochondrial DNA: focus on vertebrate nucleoids. *Biochim Biophys Acta* 2006; 1763: 463-472

Margulis L. Origin of eukaryotic cells. New Haven, CT: Yale University Press, 1970

Martinon F, Burns K, Tschopp J. The inflammasome: a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL-beta. *Mol Cell* 2002; 10: 417-426

Murphy K, Weaver C. *Janeway Immunologie*. Berlin: Springer Spektrum, 2018

MVZ Martinsried GmbH Zentrum für Humangenetik und Laboratoriumsdiagnostik. 2020. <https://www.medizinische-genetik.de/index.php?id=real-time-pcr-qpcr#c57861>

Nakahira K, Haspel JA, Rathinam VA, Lee SJ, Dolinay T, Lam HC, Englert JA, Rabinovitch M, Cernadas M, Kim HP, Fitzgerald KA, Ryter SW, Choi AM. Autophagy proteins regulate innate immune responses by inhibiting the release of mitochondrial DNA mediated by the NALP3 inflammasome. *Nat Immunol* 2011; 12: 222-230

Nakahira K, Kyung SY, Rogers AJ, Gazourian L, Youn S, Massaro AF, Quintana C, Osorio JC, Wang Z, Zhao Y, Lawler LA, Christie JD, Meyer NJ, Mc Causland FR, Waikar SS, Waxman AB, Chung RT, Bueno R, Rosas IO, Fredenburgh LE, Baron RM, Christiani DC, Hunninghake GM, Choi AM. Circulating mitochondrial DNA in patients in the ICU as a marker of mortality: derivation and validation. *PLoS Med* 2013; 10: e1001577; Epub 2013 Dec 31

Nass MM, Nass S. Intramitochondrial fibres with DNA characteristics. I. Fixation and electron staining Reaction. *J Cell Biol* 1963; 19: 593-611

Patil S, Pincas H, Seto J, Nudelman G, Nudelman I, Sealfon SC. Signaling network of dendritic cells in response to pathogens: a community-input supported knowledgebase. *BMC Syst Biol* 2010; 4: 137-150

Patrushev M, Kasymov V, Patrusheva V, Ushakova T, Gogvadze V, Gaziev A. Mitochondrial permeability transition triggers the release of mtDNA fragments. *Cell Mol Life Sci* 2004; 61: 3100-3103

Ries M, Schuster P, Thomann S, Donhauser N, Vollmer J, Schmidt B. Identification of novel oligonucleotides from mitochondrial DNA that spontaneously induce plasmacytoid dendritic cell activation. *J Leukoc Biol* 2013; 94: 123-135

Riley JS1, Quarato G, Cloix C, Lopez J, O'Prey J, Pearson M, Chapman J, Sesaki H, Carlin LM, Passos JF, Wheeler AP, Oberst A, Ryan KM, Tait SW. Mitochondrial inner membrane permeabilisation enables mtDNA release during apoptosis. *EMBO J* 2018; 37: Epub 2018 Jul 26

Rivas-Santiago B, Hernandez-Pando R, Carranza C, Juarez E, Contreras JL, Aguilar-Leon D, Torres M, Sada E. Expression of cathelicidin LL-37 during *Mycobacterium tuberculosis* infection in human alveolar macrophages, monocytes, neutrophils, and epithelial cells. *Infect Immun* 2008; 76: 935-941

Rodríguez-Nuevo A, Zorzano A. The sensing of mitochondrial DAMPs by non-immune cells. *Cell Stress* 2019; 3: 195-207

Rongvaux A, Jackson R, Harman CC, Li T, West AP, de Zoete MR, Wu Y, Yordy B, Lakhani SA, Kuan CY, Taniguchi T, Shadel GS, Chen ZJ, Iwasaki A, Flavell RA. Apoptotic caspases prevent the induction of type I interferons by mitochondrial DNA. *Cell*. 2014; 159: 1563-1177

Rongvaux A. Innate immunity and tolerance toward mitochondria. *Mitochondrion*. 2018; 41: 14-20

Rutz M, Metzger J, Gellert T, Lupp P, Lipford GB, Wagner H, Bauer S. Toll-like receptor 9 binds single-stranded CpG-DNA in a sequence- and pH-dependent manner. *Eur J Immunol* 2004; 34: 2541-2550

Sandhir R, Halder A, Sunkaria A. Mitochondria as a centrally positioned hub in the innate immune response. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis* 2017; 1863: 1090-1097

Schäfer ST, Franken L, Adamzik M, Schumak B, Scherag A, Engler A, Schönborn N, Walden J, Koch S, Baba HA, Steinmann J, Westendorf AM, Fandrey J, Bieber T, Kurts C, Frede S, Peters J, Limmer A. Mitochondrial DNA: An Endogenous Trigger for Immune Paralysis. *Anesthesiology* 2016; 124: 923-933

Schiffmann E, Corcoran BA, Wahl SM. N-formylmethionyl peptides as chemoattractants for leucocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1975; 72: 1059-1062

Shimada K, Crother TR, Karlin J, Dagvadorj J, Chiba N, Chen S, Ramanujan VK, Wolf AJ, Vergnes L, Ojcius DM, Rentsendorj A, Vargas M, Guerrero C, Wang Y, Fitzgerald KA, Underhill DM, Town T, Arditi M. Oxidized mitochondrial DNA activates the NLRP3 inflammasome during apoptosis. *Immunity* 2012; 36: 401-414

Siegal FP, Kadowaki N, Shodell M, Fitzgerald-Bocarsly PA, Shah K, Ho S, Antonenko S, Liu YJ. The nature of the principal type 1 interferon-producing cells in human blood. *Science* 1999; 284: 1835-1837

Sino Biological. 2020. <http://www.sinobiological.com/category/sandwich-elisa>

Steinhagen F, Kinjo T, Bode C, Klinman DM. TLR-based immune adjuvants. *Vaccine* 2011; 29: 3341-3355

Steinhagen F, Meyer C, Tross D, Gursel M, Maeda T, Klaschik S, Klinman DM. Activation of type I interferon-dependent genes characterizes the "core response" induced by CpG DNA. *J Leukoc Biol* 2012; 92: 775-785

Steinhagen F, Zillinger T, Peukert K, Fox M, Thudium M, Barchet W, Putensen C, Klinman D, Latz E, Bode C. Suppressive oligodeoxynucleotides containing TTAGGG motifs inhibit cGAS activation in human monocytes. *Eur J Immunol* 2018; 48: 605-611

Steinhagen F, Schmidt SV, Schewe JC, Peukert K, Klinman DM, Bode C. Immunotherapy in sepsis - brake or accelerate? *Pharmacol Ther* 2020: Epub 2020 Jan 10

Stojanovski D, Rissler M, Pfanner N, Meisinger C. Mitochondrial morphology and protein import - a tight connection? *Biochim Biophys Acta* 2006; 1763: 414-421

Storek KM, Gertsvolf NA, Ohlson MB, Monack DM. cGAS and Ifi204 cooperate to produce type I IFNs in response to *Francisella* infection. *J Immunol* 2015; 194: 3236-3245

Taanman JW. The mitochondrial genome: structure, transcription, translation and replication. *Biochim Biophys Acta* 1999; 1410: 103-123

Takeshita F, Gursel I, Ishii KJ, Suzuki K, Gursel M, Klinman DM. Signal transduction pathways mediated by the interaction of CpG DNA with Toll-like receptor 9. *Semin Immunol* 2004; 16: 17-22

Unterholzner L, Keating SE, Baran M, Horan KA, Jensen SB, Sharma S, Sirois CM, Jin T, Latz E, Xiao TS, Fitzgerald KA, Paludan SR, Bowie AG. IFI16 is an innate immune sensor for intracellular DNA. *Nat Immunol* 2010; 11: 997-1004

Verthelyi D, Ishii KJ, Gursel M, Takeshita F, Klinman DM. Human peripheral blood cells differentially recognize and respond to two distinct CPG motifs. *J Immunol* 2001; 166: 2372-2377

Wu G, Zhu Q, Zeng J, Gu X, Miao Y, Xu W, Lv T, Song Y. Extracellular mitochondrial DNA promote NLRP3 inflammasome activation and induce acute lung injury through TLR9 and NF- κ B. *J Thorac Dis* 2019; 11: 4816-4828

Yang H, Wang H, Czura CJ, Tracey KJ. The cytokine activity of HMGB1. *J Leukoc Biol* 2005; 78: 1-8

Yuan JS, Wang D, Stewart CN Jr. Statistical methods for efficiency adjusted real-time PCR quantification. *Biotechnol J*. 2008; 3: 112-123

Zabner J. Cationic lipids used in gene transfer. *Adv Drug Deliv Rev* 1997; 27: 17-28

Zhang JZ, Liu Z, Liu J, Ren JX, Sun TS. Mitochondrial DNA induces inflammation and increases TLR9/NF- κ B expression in lung tissue. *Int J Mol Med* 2014; 33: 817-824

Zhang Q, Raouf M, Chen Y, Sumi Y, Sursal T, Junger W, Brohi K, Itagaki K, Hauser CJ. Circulating mitochondrial DAMPs cause inflammatory responses to injury. *Nature* 2010; 464: 104-107

Zhang Q, Itagaki K, Hauser CJ. Mitochondrial DNA is released by shock and activates neutrophils via p38 map kinase. *Shock* 2010; 34: 55-59

Zhong Q, Chinta DM, Pamujula S, Wang H, Yao X, Mandal TK, Luftig RB. Optimization of DNA delivery by three classes of hybrid nanoparticle/DNA complexes. *J Nanobiotechnology* 2010; 8: 6

8. Danksagung

Herrn PD. Dr. Sven Klaschik danke ich ganz besonders, da er mir die Mitarbeit in seiner Forschungsgruppe ermöglichte und mich somit an das wissenschaftliche Denken und Arbeiten in dem Fachgebiet der Immunologie einführte.

Herrn Prof. Dr. Wolfram Sigmar Kunz danke ich für die Übernahme des Koreferats.

Von ganzem Herzen möchte ich mich bei Frau PD. Dr. rer. nat. Stilla Frede bedanken. Bereits im ersten Gespräch konnte sie mich mit ihrer Begeisterung für die interessante Fragestellung dieser Promotion anstecken. Von Beginn bis zum Ende dieser Arbeit war sie mit voller Anteilnahme für mich da und fand stets die passenden Worte.

Großer Dank gebührt Herrn PD Dr. Folkert Steinhagen für seine Unterstützung in der konzeptionellen Planung der Versuche. Seine Ratschläge und die konstruktiven Gespräche waren für das Projekt ein Gewinn.

Ganz herzlich möchte ich mich auch bei dem gesamten Laborteam bedanken. Dies gilt insbesondere für Alexandra Casalter, Frank Splettstösser, Susanne Schulz und Mario Fox, die mich mit viel Geduld in die experimentellen Methoden eingearbeitet haben.

Nicht zuletzt geht mein persönlicher Dank an meine Familie für ihre Unterstützung in all den zurückliegenden Jahren: meine Eltern, die mir das Studium ermöglicht und mich zu dieser Doktorarbeit ermutigt haben; meine Schwester Friederike für ihre große Hilfe bei der Korrektur und der stetigen moralischen Unterstützung; sowie Matthias, der es geschafft hat, mich durchgehend zu motivieren.