

**Technische Universität München**

Institut für Medizinische Mikrobiologie,  
Immunologie und Hygiene

## **Immunstimulatorische Eigenschaften von RNA**

Svetlana Hamm

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Chemie der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

**Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)**

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. J. Buchner

Prüfer der Dissertation:

1. Univ.-Prof. Dr. Dr. A. Bacher
2. Univ.-Prof. Dr. St. Bauer (Philipps-Universität Marburg)

Die Dissertation wurde am 16.03.2006 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Chemie am 10.07.2006 angenommen.

Die vorliegende Doktorarbeit wurde in der Zeit von August 2002 bis Januar 2006 am Institut für Medizinische Mikrobiologie, Immunologie und Hygiene der Technischen Universität München angefertigt.

Für die Unterstützung dieser Arbeit möchte ich mich herzlich bedanken:

Bei Herrn Prof. Dr. Dr. A. Bacher für die Übernahme der externen Betreuung der Dissertation und Herrn Dr. H. Wagner für die Möglichkeit, diese Arbeit an seinem Institut durchzuführen.

Bei Herrn Dr. S. Bauer für seine intensive fachliche Betreuung und seine stete Diskussionsbereitschaft.

Bei Antje Heit, Katharine Huster, Martina Koffler und Christian Stemberger für die Hilfe mit Mausexperimenten.

Bei allen im Labor: insbesondere bei Steffi K., Tanja, Doris, Christine und Thomas für die Hilfe im Laboralltag. Bei Trixi, Heili, Mark, Steffi P., Nelly und Dr. Hubertus Hochrein für die fachliche und menschliche Unterstützung.

Schließlich gilt mein Dank meinen Eltern, die mich immer unterstützt und so mein Studium ermöglicht haben und meinem Freund für sein Verständnis und seine Hilfe.

---

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG</b>	<b>1</b>
1.1	Aufbau und Mechanismen des Immunsystems	1
1.2	Toll-like Rezeptoren	3
1.2.1	Toll-like Rezeptor 4	5
1.2.2	Toll-like Rezeptoren 1, 2 und 6	6
1.2.3	Toll-like Rezeptor 5	6
1.2.4	Toll-like Rezeptoren 3, 7, 8 und 9	6
1.3	TLR-Signalwege	8
1.4	Funktion der Dendritischen Zellen	10
1.4.1	Subpopulationen Dendritischer Zellen	11
1.5	TLR-abhängige und unabhängige Erkennung der Nukleinsäuren	12
1.5.1	DNA und TLR9	12
1.5.2	TLR3-abhängige und unabhängige Erkennung der doppelsträngigen RNA	13
1.5.3	Erkennung von einzelsträngiger RNA	14
1.6	TLR-Liganden als Adjuvantien	14
1.7	Aktivierung des Immunsystems durch siRNA	15
1.8	Ziel der Doktorarbeit	17
<b>2</b>	<b>MATERIALIEN UND METHODEN</b>	<b>19</b>
2.1	Materialien	19
2.1.1	Geräte	19
2.1.2	Chemikalien, Enzyme und Stimuli	20
2.1.3	Verwendete Oligonukleotide	21
2.1.4	Medien und Medienzusätze	22
2.1.5	Verwendete Plastikware	23
2.2	Zellkultur	24
2.2.1	Zellkulturen und Zelllinien	24
2.2.2	Bestimmung der Zellzahl	24
2.2.3	Kultivierung der Zelllinien	25
2.2.3.1	Zellpassage	25
2.2.3.2	Kryokonservierung der Zellen	25
2.2.4	Gewinnung und Kultivierung primärer Zellen	26

---

2.2.4.1	<i>Isolierung von murinem Knochenmark</i>	26
2.2.4.2	<i>Generierung der M-CSF-Makrophagen</i>	27
2.2.4.3	<i>Generierung der GM-CSF-Dendritischen Zellen</i>	27
2.2.4.4	<i>Generierung von Flt3L-Dendritischen Zellen</i>	27
2.2.4.5	<i>Aufreinigung von PBMC</i>	27
2.2.5	Stimulation der Zellen	28
2.2.5.1	<i>Stimulation mit RNA</i>	29
<b>2.3</b>	<b>ELISA (Enzyme-Linked-Immunosorbent Assay)</b>	<b>30</b>
2.3.1	Prinzip des ELISA	30
2.3.2	Verwendete ELISA-Systeme	30
2.3.3	Durchführung	32
<b>2.4</b>	<b>Durchflusszytometrie</b>	<b>33</b>
2.4.1	Prinzip der Durchflusszytometrie	33
2.4.2	Analyse der eGFP-Expression	34
2.4.3	Färbung und Analyse von Oberflächenantigenen	34
2.4.3.1	<i>Färbung zur Phänotyp-Bestimmung der Flt3-L DZ</i>	35
2.4.3.2	<i>Färbung muriner Flt3-L DZ nach Stimulation</i>	36
<b>2.5</b>	<b>Reverse Transkription-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR)</b>	<b>36</b>
2.5.1	Das Prinzip der RT-PCR und allgemeine Arbeitspraktiken	36
2.5.2	Herstellung der cDNA	37
2.5.3	Real Time Quantitative PCR	37
2.5.3.1	<i>Das Prinzip der Real Time quantitativen PCR</i>	37
2.5.3.2	<i>Praktische Durchführung</i>	38
2.5.3.3	<i>Quantifizierung der Proben</i>	38
<b>2.6</b>	<b>Transfektion der Zellen mittels Elektroporation</b>	<b>39</b>
2.6.1	Das Prinzip der Transfektion durch Elektroporation	39
2.6.2	Elektroporation der HEK293	40
2.6.3	Elektroporation der primären Zellen	40
<b>2.7</b>	<b>siRNA</b>	<b>40</b>
2.7.1	<i>Annealing der siRNA-Oligonukleotide</i>	40
2.7.2	Gelelektrophorese der siRNA	41
<b>2.8</b>	<b>Mäuse</b>	<b>41</b>
2.8.1	Genotypisierung der Tlr-knockout-Mäusen	41
2.8.1.1	<i>Isolierung der DNA aus Mausschwanzspitzen</i>	41

---

2.8.1.2	<i>Genotypisierung-PCR</i>	42
2.8.2	Immunisierungsexperimente	43
2.8.2.1	<i>Vorbereitung der Injektionen</i>	43
2.8.2.2	<i>Injektion der Mäuse</i>	43
2.8.2.3	<i>MHC-Tetramerfärbung</i>	43
2.8.2.4	<i>In vivo kill-Assay</i>	44
2.8.2.5	<i>Intrazelluläre Färbung der Zytokine</i>	45
2.8.2.6	<i>ELISA gegen Ovalbuminspezifische Antikörper</i>	46
2.8.2.7	<i>Listerieninfektion der immunisierten Mäuse</i>	46
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>48</b>
<b>3.1</b>	<b>Eigenschaften von RNA als Adjuvans</b>	<b>48</b>
3.1.1	Impfung mit RNA als Adjuvans induziert eine zelluläre Immunantwort	49
3.1.2	RNA induziert die Produktion spezifischer Antikörper vom T <sub>H</sub> 2-Typ	52
3.1.3	Impfung mit RNA schützt bei einer Listerien-Infektion	53
3.1.4	Injektion mit RNA führt zu keiner Splenomegalie	55
3.1.5	Tlr7-Abhängigkeit von der RNA-induzierten Immunantwort	56
<b>3.2</b>	<b>Tlr7-unabhängige Erkennung von RNA</b>	<b>57</b>
3.2.1	Stimulation mit PD-RNA ist nicht vollständig Tlr7-abhängig	58
3.2.2	Tlr7-unabhängige PD-RNA-Stimulation in verschiedenen Typen der Immunzellen	62
3.2.3	PD-RNA-Stimulation ist MyD88-abhängig	64
3.2.4	Endosomale Reifung ist erforderlich für die PD-RNA-Stimulation	66
3.2.5	Tlr3 ist nicht für die Erkennung von PD-RNA verantwortlich	67
3.2.6	Tlr9 ist ein weiterer Rezeptor für PD-RNA	69
3.2.7	Expression von Tlr7, 8 und 9 in verschiedenen Dendritischen Zellen	71
<b>3.3</b>	<b>Die Methylierung des Sense-Stranges von siRNA verhindert ihre unerwünschte Immunstimulation</b>	<b>72</b>
3.3.1	SiRNA stimuliert das Immunsystem über Tlr7	73
3.3.2	Durch die Methylierung einzelner Stränge der siRNA kann die Immunstimulation vermieden werden	74
3.3.3	Die Methylierung des Sense-Stranges beeinflusst nicht die <i>Silencing</i> -Aktivität der siRNA in HEK293-Zellen	75
3.3.4	Methylierung des Sense-Stranges verhindert bei bleibender <i>Silencing</i>	

---

Aktivität die Immunstimulation durch die siRNA _____	77
<b>4 DISKUSSION _____</b>	<b>80</b>
<b>4.1 Immunstimulatorische Eigenschaften von RNA als Adjuvans _____</b>	<b>80</b>
4.1.1 RNA als Adjuvans induziert eine gemischte T <sub>H</sub> 1/T <sub>H</sub> 2-Immunantwort_	80
4.1.2 Die Impfung mit RNA induziert ein immunologisches Gedächtnis und schützt bei einer Infektion mit <i>Listeria monocytogenes</i> _____	81
4.1.3 Die Verwendung der RNA als Adjuvans ist sicherheitstechnisch unbedenklich _____	82
4.1.4 Die Tlr7-Abhängigkeit der RNA als Adjuvans _____	82
<b>4.2 Tlr9 erkennt Phosphodiester-RNA in Zellen myeloiden Ursprungs __</b>	<b>83</b>
4.2.1 Tlr9 ist ein neuer Rezeptor für PD-RNA _____	83
4.2.2 Nur myeloide Immunzellen erkennen PD-RNA Zellen über Tlr9 ____	85
<b>4.3 Die Methylierung des Sense-Stranges verhindert die unerwünschte Immunstimulation durch siRNA _____</b>	<b>86</b>
4.3.1 Die Methylierung nur eines Stranges von siRNA verhindert die Immunstimulation durch siRNA _____	86
4.3.2 Die Methylierung des <i>Antisense</i> -Stranges verhindert die <i>Silencing</i> -Aktivität von siRNA _____	88
<b>5 ZUSAMMENFASSUNG _____</b>	<b>89</b>
<b>6 LITERATURVERZEICHNIS _____</b>	<b>91</b>

---

 Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
Abb	Abbildung
AK	Antikörper
Amp	Ampicilin
APC	Allophycocyanin
APZ	Antigen präsentierende Zelle
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
bzw	beziehungsweise
C	Cytosin
CD	<i>cluster of differentiation</i>
cDC	konventionelle Dendritische Zelle
CpG	Deoxycytidylat-Phosphat-Deoxyguanylat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMEM	Dulbeccos Modifiziertes Eagle Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ds	doppelsträngig
DZ	Dendritische Zelle
eGFP	<i>enhanced green fluorescent protein</i>
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
FACS	Fluoreszenz aktivierter Zellsorter
FCS	fötale Kälberserum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
Flt3-Ligand	Fms-verwandte Tyrosinkinase-3-Ligand
G	Guanin
GM-CSF	Granulozyten-Makrophagen-Kolonie stimulierender Faktor
h	Stunde
HPR	Meerrettich Peroxidase ( <i>horseradish peroxidase</i> )
IKK	I $\kappa$ B Kinasekomplex
IL	Interleukin
INF	Interferon
IPS-1	<i>Interferon-<math>\beta</math> promoter stimulator</i>
IRAK	IL-1-Rezeptor assoziierte Kinase
IRF	Interferon regulierender Faktor
kb	kilobase
KO	<i>knock out</i>
l	Liter
LGP2	<i>Lysosomal glycoprotein 2</i>
LPS	Lipopolysaccharid
LRR	Leucin reiche Regionen ( <i>leucin rich repeats</i> )
Mal	<i>MyD88-adaptor-like protein</i>
MALP-2	Mykobakterielles Lipoprotein
MAVS	<i>Mitochondrial anti-viral signaling protein</i>
M-CSF	Makrophagen-Kolonie stimulierender Faktor
MDA5	<i>Melanoma differentiation associated gene 5</i>
mg	Milligramm
MHC	Haupt-Histokompatibilitätskomplex
min	Minute

---

ml	Milliliter
MOI	Viruspartikel pro Wirtszelle ( <i>multiplicity of infection</i> )
mRNA	Boten RNA ( <i>messenger RNA</i> )
MyD88	myeloider Differenzierungsmarker 88
neg	negative
NF- $\kappa$ B	nukleärer Faktor $\kappa$ B
NK-Zelle	Natürliche Killer Zelle
ODN	Oligodesoxyribonukleotid
ORN	Oligoribonukleotid
Pam3CysK4	(S-(2,3-bis(palmitoyloxy)-(2-RS)-propyl)-N-palmitoyl-(R)-Cys-(S)-Ser-(S)-Lys(4))
PAMPs	Pathogen assoziierte molekulare Muster
PBMC	mononukleäre Zellen aus dem peripheren Blut ( <i>peripheral blood mononuclear cells</i> )
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung
PC	Polycarbonyl
PD	Phosphodiester
pDC	plasmazytoide Dendritische Zelle
PE	Phycoerythrin
PFA	para-Formaldehyd
PFU	Plaque bildende Einheit ( <i>plaque forming unit</i> )
PI	Propidium Jodid
PKR	ds RNA-aktivierte Serin/Threonin-Proteinkinase
poly(I:C)	Poly-Inosin:poly-Cytidyl-Säure
pos	positive
POX	Peroxidase
PRR	Muster erkennender Rezeptor ( <i>pattern recognition receptor</i> )
PTO	Phosphorothioat
R-848	Resiquimod
RE	Restriktionsenzym
RIG-I	<i>retinoic acid inducible gene 1</i>
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	<i>revolution per minute</i>
RT	Raumtemperatur
RT	Reverse Transkriptase
sec	Sekunde
ss	einzelsträngig ( <i>single stranded</i> )
T	Thymin
TF	Transkriptionsfaktor
T <sub>H</sub> -Zelle	T-Helfer-Zelle
TICAM	<i>TIR-containing-adaptor-molecule</i>
TIR	Toll/IL-1 Rezeptor
TIRAP	<i>TIR-domain-containing-adaptor protein</i>
TLR	Toll-like Rezeptor
TNF	Tumor Nekrose Faktor
TRAF-6	TNF-Rezeptor assoziierter Faktor 6
TRAM	<i>Trif-related-adaptor-molecule</i>
TRIF	<i>TIR-domain-containing-adaptor-inducing-IFN-<math>\beta</math></i>
u	Einheit ( <i>unit</i> )
ÜN	über Nacht
UV	Ultraviolett

---

WEHI	<i>Walter and Eliza Hall Institute</i>
WT	Wildtyp
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter

# 1 Einleitung

## 1.1 Aufbau und Mechanismen des Immunsystems

Säugetiere besitzen ein komplexes Immunsystem zur Abwehr von Pathogenen. Dieses unterteilt man traditionell in eine angeborene und eine erworbene Komponente. Das Eindringen eines Pathogens wird durch das angeborene Immunsystem erkannt und kontrolliert, bis der erworbene Teil des Immunsystems nach einigen Tagen eingreifen kann. Dabei ist die angeborene Komponente sowohl für die Aktivierung der Zellen des erworbenen Teils als auch für die Bestimmung der Art der Immunreaktion verantwortlich.

Die Zellen der erworbenen Immunität sind B- und T-Lymphozyten, die alle jeweils einen einzigartigen gegen Pathogenantigene gerichteten Rezeptor besitzen. Dieser entsteht durch somatische Rekombination in jeder Zelle unabhängig, so dass das Repertoire der gesamten Population sehr groß und extrem divers ist. Dadurch wird die Wahrscheinlichkeit erhöht, möglichst viele antigene Strukturen zu erkennen. Trifft ein Lymphozyt unter Infektionsbedingungen das passende Antigen, so wird er aktiviert und proliferiert klonal, wobei durch somatische Mutationen Antigenrezeptoren verändert werden und sich Zellen mit höheraffinen Rezeptoren durchsetzen. Nach drei bis fünf Tagen sind genügend antigenspezifische Lymphozyten entstanden und zu Effektorzellen differenziert, um die Infektion wirkungsvoll zu bekämpfen.

Die Antigenrezeptoren der B-Zellen (BZR) können nach der Aktivierung auch als Antikörper (Immunglobuline) sekretiert werden, die das spezifische Pathogen als Fremdkörper markieren. Dieses kann dann aus dem Körper eliminiert werden (=humorale Immunität). Die Rezeptoren der T-Zellen (TZR) erkennen ihre Antigene nicht direkt wie die BZR, sondern nur als acht bis 13 Aminosäuren lange Peptide in Kombination mit den speziellen Präsentationsrezeptoren, den sogenannten MHC-Molekülen (*major histocompatibility complex*). MHC-Klasse-I-Moleküle werden von allen Körperzellen exprimiert und von dem TZR der sogenannten zytotoxischen T-Zellen (T<sub>Z</sub>-Zellen) erkannt. Diese Zellen erkennen infizierte Körperzellen und zerstören sie (=zelluläre Immunität). Zur zweiten großen Gruppe der T-Zellen gehören die T-Helfer-Zellen (T<sub>H</sub>-Zellen), die die auf den Immunzellen exprimierten MHC-Klasse-II-Moleküle erkennen. Sie können direkt die B-Zellen aktivieren, produzieren aber auch Zytokine und Chemokine und tragen so zum Zytokinmilieu

bei, das die Richtung der Immunantwort beeinflusst.

Die Mechanismen der angeborenen Immunität sind deutlich breiter gefächert. Als erste Barriere gegen Pathogene dienen Haut und Schleimhäute, wobei die mukosalen Epithelzellen zusätzlich antibakterielle Peptide, die sogenannten Defensine, und das die Bakterienzellwand zerstörende Lysozym produzieren. Die antikörperunabhängige Aktivierung des Komplementsystems und die Phagozytose durch z. B. Makrophagen gehören ebenfalls zur ersten Abwehr, genauso wie die Produktion von entzündungsvermittelnden Zytokinen und Chemokinen. Neben den Makrophagen gehören Neutrophile Leukozyten, Natürliche Killerzellen und Dendritische Zellen zur zellulären Ausstattung der angeborenen Immunität, wobei letztere am stärksten die erworbene Immunität beeinflussen. Im Unterschied zu den B- und T-Zellen, die somatisch kodierte BZR und TZR tragen, exprimieren diese Zellen eine Reihe spezieller in der Keimbahn kodierter Rezeptoren.

Diese Rezeptoren, die sogenannten *pattern recognition receptors* (PRR), erkennen wenige stark konservierte molekulare Muster der Pathogene (*pattern associated molecular patterns*, PAMPs), also molekulare Strukturen, die nur bei den mikrobiellen Pathogenen und nicht in Säugetieren vorkommen und außerdem unersetzlich für das Überleben der Mikroben sind. Lipopolysaccharid (LPS) und Peptidoglykan etwa werden nur von Bakterien und nicht vom Wirt produziert und sind für diese essentiell. Ein anschauliches Beispiel dafür bietet die Penicillinresistenz: Penicillin greift in die Peptidoglycansynthese der Zellwand ein. Penicillinresistente Bakterien verändern nicht das Peptidoglycan, sondern entwickeln einen Weg, Penicillin zu inaktivieren. Oft repräsentieren PAMPs die molekulare Signatur einer Pathogenklasse. Zum Beispiel besitzen alle Gram-negativen Bakterien LPS und alle Gram-positiven Bakterien Lipoteichonsäure. Die Erkennung dieser PAMPs signalisiert nicht nur das Vorhandensein einer Infektion, sondern liefert zusätzlich die Information über den Typ des Pathogens, so dass das Immunsystem auf die Infektion optimal reagieren kann. Funktionell sind die PRR an mehreren Mechanismen wie:

- der Opsonierung von Bakterien und Viren für die Phagozytose oder den alternativen Komplementweg (z. B. das Mannan-bindende Lectin, das Bakterien und Hefe bindet),
- an der Aufnahme der Pathogene durch Dendritische Zellen und Phagozyten (z. B. LPS bindender *Scavenger*-Rezeptor) und
- an der Auslösung der Signalwege, die zur Transkription inflammatorischer Gene führen,

beteiligt. Zu der zuletzt genannten Gruppe gehören die Toll-like Rezeptoren (TLR) (Medzhitov and Janeway, 2000a; Medzhitov and Janeway, 2000b).

## 1.2 Toll-like Rezeptoren

Toll-like Rezeptoren gehören zu der Interleukin-1-Rezeptor/Toll-like-Rezeptor Superfamilie, dessen gemeinsames Merkmal die zytoplasmatische Toll-IL-1-Domäne (TIR-Domäne) ist (Ishii et al., 2005). Die extrazellulären Bereiche dieser zwei Gruppen sind allerdings unterschiedlich: Toll-like Rezeptoren besitzen 18-24 Leucinreiche Aminosäuremotive, während der extrazelluläre Teil des IL-1 Rezeptors aus drei Immunglobulin-ähnlichen Domänen besteht (Akira et al., 2001).

Der erste Rezeptor der Toll-Familie wurde in *Drosophila* als eine Komponente des Signalweges identifiziert, der die dorsoventrale Entwicklung des Embryos kontrolliert (Hashimoto et al., 1988; Medzhitov et al., 1997). Zusätzlich zu Entwicklungsstörungen bewirkten *loss-of-function*-Mutationen im *toll*-Gen eine Überempfindlichkeit für Pilz-Infektionen. Mittlerweile wurden in *Drosophila* sieben weitere *toll-like* Rezeptoren gefunden, die allerdings nicht immunrelevant sind (Imler et al., 2004).

Bei Säugetieren wurden bis zum heutigen Zeitpunkt elf Mitglieder der TLR-Familie eingehender beschrieben. Das Spektrum der TLR-Liganden ist vielfältig und komplex: TLR erkennen nicht nur Liganden, die von den mikrobiellen Pathogenen abstammen, sondern auch endogene Liganden, die bei der Zerstörung der körpereigenen Zellen entstehen. Das breite Ligandenspektrum kommt zustande, weil einige TLR mehrere Liganden erkennen können und außerdem mehrere TLR bei der Erkennung der molekularen Strukturen mit anderen TLR oder anderen PRR kooperieren. Ein Zusammenfassung über Toll-like Rezeptoren und ihre Liganden ist in der Tabelle 1 zu finden.

TLR kommen in unterschiedlichen Kompartimenten der Zelle vor: TLR1, TLR2, TLR4, TLR5 und TLR6 sind an der Zelloberfläche exprimiert, während sich TLR3, TLR7, TLR8 und TLR9 in den intrazellulären Kompartimenten befinden. Möglicherweise erleichtert die Lokalisation den TLR das Zusammentreffen mit ihren Liganden. Während etwa TLR4 einen Bestandteil der äußeren Bakterienmembran LPS und TLR5 den Geißelbaustein Flagellin erkennen, reagieren intrazelluläre TLR auf bakterielle und virale Nukleinsäuren, die nach der Degradierung der Bakterien und Viren hauptsächlich im endosomal-lysosomalen Kompartiment anzutreffen sind.

Die Lokalisation der Toll-like Rezeptoren 3, 7, 8 und 9 in diesem Kompartiment verhindert außerdem die Erkennung der endogenen Nukleinsäuren, die normalerweise nicht ins Endosom gelangen.

TLR	Ligand		Organismus	Referenz
	exogenes	endogenes		
TLR1+	Triacyllipopeptide		Bakterien	Takeuchi et al., 2002
TLR2	Lipoarabinomannan		Mykobakterien	Tapping and Tobias, 2003
TLR2	Lipopeptide/Lipoproteine		Bakterien	Aliprantis et al., 1999
	Peptidoglykan		Bakterien	Schwandner et al., 1999
	Lipoteichonsäure		Grampositive Bakterien	Schroder et al., 2003
	LPS		<i>P.gingivales</i> <i>L.interrogans</i>	Hirschfeld et al., 2001 Werts et al., 2001
	GPI		<i>T.cruzi</i> <i>P.falciparum</i>	Campos et al., 2001 Krishnegowda et al., 2005
	Zymosan		Pilze	Underhill et al., 1999
TLR2+ TLR6	Diacyllipopeptide		<i>Mycoplasma</i>	Takeuchi et al., 2001
TLR3	dsRNA		Westnil Virus, murines Cytomegalovirus	Alexopoulou et al., 2001 Wang et al., 2004 Tabeta et al., 2004
	siRNA		synthetisch	Kariko et al., 2004a
		mRNA	Wirt	Kariko et al., 2004b
TLR4	LPS		Gram-negative Bakterien	Poltorak et al., 1998 Hoshino et al., 1999 Qureshi et al., 1999
	Taxol		Pflanzen	Kawasaki et al., 2001 Byrd-Leifer et al., 2001
	Peptidoglykan		Mykobakterien	Uehori et al., 2005
	RSV Fusionprotein		RSV	Kurt-Jones et al., 2000
	Hüllprotein		Murines Brustkrebsvirus (MMTV)	Rassa et al., 2002
	Hsp60		<i>Chlamydia pneumoniae</i>	Bulut et al., 2002
		Hsp60 Hsp70	Wirt	Johnson et al., 2002 Weatherill et al., 2005

Tab. 1 (Teil 1): Übersicht über TLR und ihre Liganden (nach Ishii et al., 2005).

TLR	Ligand		Organismus	Referenz
	exogenes	endogenes		
TLR5	Flagellin		Bakterien	Hayashi et al., 2001
TLR7	ssRNA		Influenza, HIV-1, synthetisch	Diebold et al., 2004 Heil et al., 2004
	Imidazaquinoline		synthetisch	Hemmi et al., 2002 Heil et al., 2003
	siRNA		synthetisch	Hornung et al., 2005
TLR8	Imidazaquinoline		synthetisch	Jurk et al., 2002
TLR9	CpG-DNA		Bakterien, syn- thetische ODN	Bauer et al., 2001 Hemmi et al., 2000 Takeshita et al., 2001
			DNA Viren	Krug et al., 2004a Krug et al., 2004b
	Hemazoin		<i>P.falciparum</i>	Coban et al., 2005
TLR11	Profilin-ähnliche Moleküle		<i>Toxoplasma gondii</i>	Yarovinsky et al., 2005

Tab. 1 (Teil 2): Übersicht über TLR und ihre Liganden (nach Ishii et al., 2005).

### 1.2.1 Toll-like Rezeptor 4

Der erste bei den Säugetieren beschriebene Toll-like Rezeptor war TLR4 (Medzhitov et al., 1997). TLR4 erkennt zusammen mit einem Komplex aus dem LPB (Lipopolysaccharid *binding protein*), CD14 und MD-2 Lipopolysaccharid (LPS) von Gram-negativen Bakterien (Akira et al., 2001; Hoshino et al., 1999; Poltorak et al., 1998; Qureshi et al., 1999; Shimazu et al., 1999).

LPS besteht aus einem hydrophilen Polysaccharid und einer hydrophoben Domäne, dem LipidA, das für die biologische Aktivität von LPS verantwortlich ist (Ishii et al., 2005). LipidA ist allerdings nicht ein definiertes Molekül und unterscheidet sich in verschiedenen Gram-negativen Bakterien, so dass nicht jedes LPS von TLR4 erkannt wird. Die Erkennung von LPS aus *Porphyromonas gingivales* und *Leptospira interrogans* etwa wird von TLR2 übernommen (Hirschfeld et al., 2001; Werts et al., 2001).

Weitere Beispiele für TLR4-Liganden sind endogenes und prokaryotisches Hitzeschockprotein (Hsp) 60, endogenes Hsp 70 (Bulut et al., 2002; Johnson et al., 2002; Weatherill et al., 2005), pflanzliches Taxol (Byrd-Leifer et al., 2001; Kawasaki

---

et al., 2001), Peptidoglycan von Mycobakterien (Uehori et al., 2005) und einige virale Oberflächenproteine (Kurt-Jones et al., 2000; Rassa et al., 2002).

### **1.2.2 Toll-like Rezeptoren 1, 2 und 6**

TLR2 erkennt eine Reihe von bakteriellen Komponenten wie Lipoproteine (Aliprantis et al., 1999), Lipoteichonsäure und Peptidoglycan Gram-positiver Bakterien (Schroder et al., 2003; Schwandner et al., 1999), Glycophosphatidylinositol (GPI) der Protozoen (Campos et al., 2001; Krishnegowda et al., 2005), Zymosan der Hefe (Underhill et al., 1999) und bestimmte Formen von LPS (Hirschfeld et al., 2001; Werts et al., 2001).

Das breite Spektrum an Liganden ist auf die Fähigkeit von TLR2 zurückzuführen, mit TLR1 und TLR6 zu dimerisieren. Die Assoziation mit TLR1 erlaubt das Erkennen von Triacyl-Lipopeptiden, also Proteinen und Peptiden, die an ein triacetyliertes Lipid kovalent gebunden sind, während TLR2/TLR6-Heterodimere diacetylierte Lipopeptide erkennen können (Takeuchi et al., 2001; Takeuchi et al., 2002).

### **1.2.3 Toll-like Rezeptor 5**

TLR5 erkennt das Flagellin Gram-positiver und Gram-negativer Bakterien (Hayashi et al., 2001). Flagellin ist ein 55 kD großes Protein-Monomer, aus dem Bakteriengeißeln bestehen. Dabei ist sowohl von begeißelten Bakterien freigesetztes monomeres Flagellin als auch gereinigtes Protein imstande, die Immunreaktion über TLR5 zu induzieren (Eaves-Pyles et al., 2001; Smith et al., 2003; Steiner et al., 2000).

### **1.2.4 Toll-like Rezeptoren 3, 7, 8 und 9**

Toll-like Rezeptoren 3, 7, 8 und 9 sind im endosomal-lysosomalen Kompartiment lokalisiert und erkennen bakterielle und virale Nukleinsäuren.

Doppelsträngige RNA gelangt bei einer Infektion mit Viren, die dsRNA als Erbinformation besitzen, ins Endosom und wird über TLR3 erkannt. TLR3 kann dabei mit ganzen Viren genauso wie mit dem syntetischen dsRNA-Analogon Poly-Inosin:poly-Cytidyl-Säure (pI:C) stimuliert werden (Alexopoulou et al., 2001; Tabeta et al., 2004; Wang et al., 2004). *Small interfering* RNA (siRNA) und endogene mRNA

sind als weitere Liganden für TLR3 beschrieben worden (Kariko et al., 2004a; Kariko et al., 2004b).

TLR9 reagiert auf bestimmte Sequenzmotive in der DNA. Diese besitzen im Kern ein CG-Dinukeotid und werden CpG-Motive genannt (Bauer et al., 2001; Hemmi et al., 2000; Takeshita et al., 2001). Die CpG-DNA bietet aus mehreren Gründen ein gutes Unterscheidungsmerkmal zwischen DNA von Prokaryonten und Säugetieren: Das Vorkommen des Dinukleotids CG ist bei Säugetieren mit einer Häufigkeit von 1/80 stark supremiert, außerdem ist das Cytosin-Nukleotid in der Sequenz in 90% der Fälle methyliert. Bei Bakterien entspricht das Vorkommen der CG-Sequenz meistens dem statistischen Durchschnitt (1/16). Auch der Methylierungsgrad des Cytosins ist mit 10-15% wesentlich niedriger (Wagner, 1999). Wie bei TLR3 können sequenzoptimierte synthetische Oligonukleotide für die Stimulation von TLR9 verwendet werden (Bauer et al., 2001). Neuerdings sind auch DNA-Viren und Hemazoin, durch die Infektion mit *P. falciparum* entstehende Abbauprodukt von Hämoglobin, als Liganden für TLR9 identifiziert worden (Coban et al., 2005; Krug et al., 2004a; Krug et al., 2004b).

Einzelsträngige (ss) virale RNA und synthetische Imidazoquinoline (Diebold et al., 2004; Heil et al., 2004), die schon einige Zeit als antivirale und antitumorale Therapeutika verwendet werden (Richwald, 1999), wurden als Liganden für die Toll-like Rezeptoren 7 und 8 beschrieben (Heil et al., 2003; Hemmi et al., 2002; Jurk et al., 2002). Endogene RNA, die ebenfalls als Ligand von TLR 7 und 8 vorstellbar wäre, entgeht der Erkennung dadurch, dass sie normalerweise nicht in das endosomale Kompartiment gelangt, da sie durch membrangebundene und extrazelluläre RNasen relativ schnell zerstört wird. Virale RNA wird dagegen durch die Hüllproteine des Viruspartikels geschützt, und gelangt über die Rezeptorvermittelte Endozytose in das Endosom. Dort werden die viralen Partikel degradiert und setzen virale RNA frei. Außerdem wird Wirts-RNA möglicherweise durch ein Methylierungsmuster vor der Erkennung durch TLR7 und 8 geschützt (Ishii and Akira, 2005; Sugiyama et al., 2005).

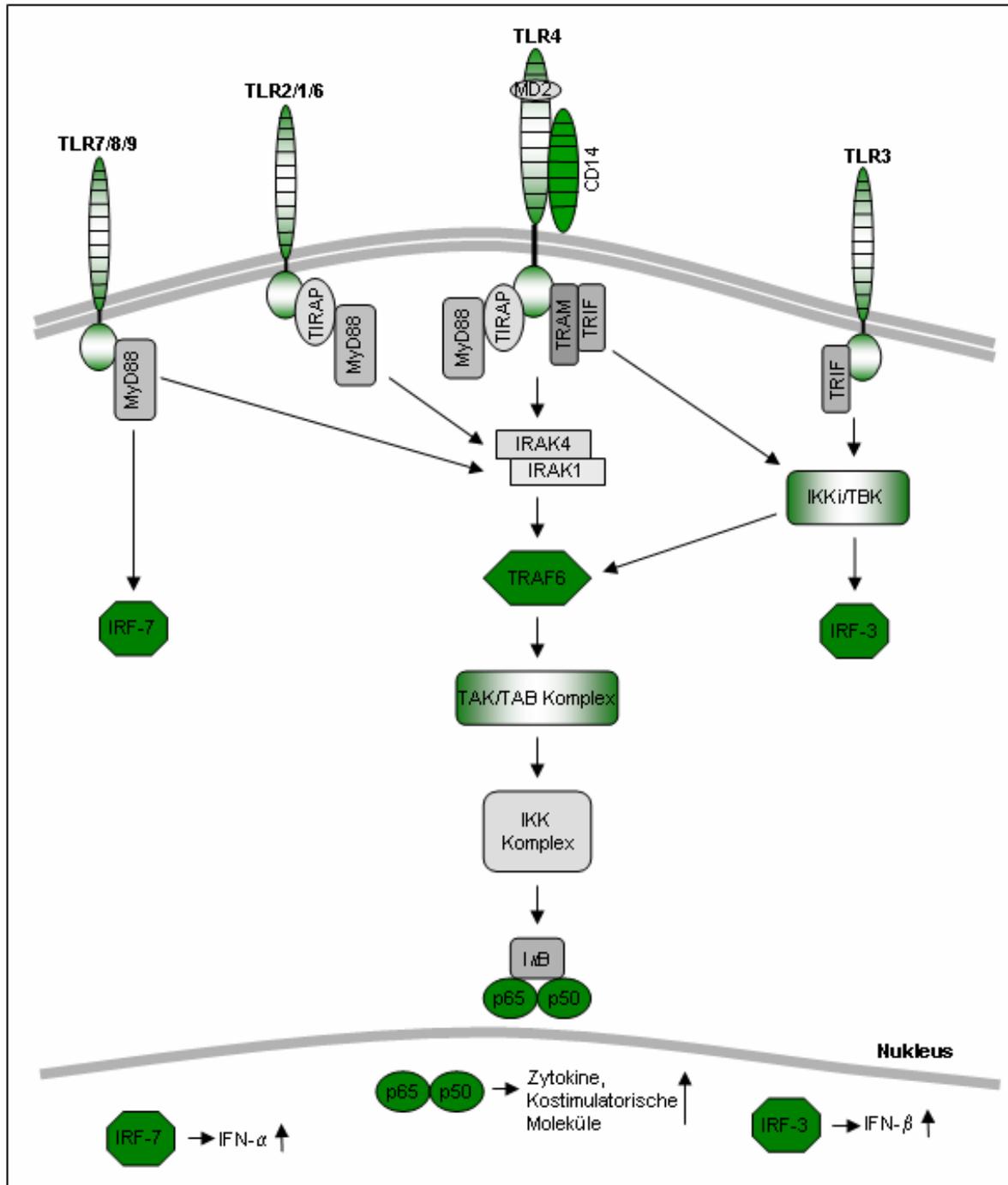
Die optimale Erkennungssequenz der einzelsträngigen RNA wurde zuerst als GU- oder U-reich beschrieben, mittlerweile sind auch andere immunstimulative Sequenzen bekannt (Hornung et al., 2005; Sugiyama et al., 2005).

### 1.3 TLR-Signalwege

Die Aktivierung der TLR führt zur Expression einer Reihe von inflammatorischen Genen. Je nach Zelltyp kann dadurch der Aktivierungszustand der Zelle geändert, die Zytokinsekretion induziert und die Expression von kostimulatorischen Molekülen erhöht werden. Durch die Bindung des Liganden rekrutiert ein TLR das Adaptormolekül MyD88 (*myeloid differentiation factor 88*) (Medzhitov et al., 1998; Muzio et al., 1998). MyD88 enthält N-terminal die sogenannte *death domain* und C-terminal die TIR-Domäne (Hardiman et al., 1996). Die TIR-Domäne vermittelt die Interaktion mit der TIR-Domäne des TLR, während die *death domain* von MyD88 mit derselben von einer Kinase der IRAK-Familie (IL-1-assoziierten Kinase) interagiert. Zur IRAK-Familie gehören vier Kinasen, davon sind IRAK-1 und IRAK-4 katalytisch aktiv und sorgen für die Aktivierung einer weiteren Komponente des Signalweges TRAF6 (*TNF-receptor associated factor 6*) (Cao et al., 1996). IRAK-2 und IRAK-M, die katalytisch inaktiv sind, inhibieren den Signalweg (Muzio et al., 1997; Wesche et al., 1999). TRAF6 wird durch eine Ubiquitinierung aktiviert und kann mit einem Kinasekomplex aus TAK1-TAB1-TAB2 interagieren. Dieser Komplex aktiviert IKK-Komplex (I $\kappa$ B Kinase Kinase) und führt letztendlich zur Aktivierung von I $\kappa$ B-Kinasen und zur Phosphorylierung des NF- $\kappa$ B-Translokationsinhibitors I $\kappa$ B (Wang et al., 2001). Nach der Phosphorylierung wird I $\kappa$ B durch das Proteasom abgebaut, wodurch NF- $\kappa$ B freigesetzt wird und im Kern die Transkription von inflammatorischen Genen aktiviert.

Während die Bindung der Liganden an TLR5, 7, 8 und 9 zur Signalübertragung allein über MyD88 führt, benutzen die restlichen TLR mehrere Adaptormoleküle. Neben MyD88 sind drei weitere Adaptormoleküle bekannt: TIRAP, TRIF und TRAM (Fitzgerald et al., 2001; Horng et al., 2001; Yamamoto et al., 2002).

TLR4 etwa rekrutiert zwei Kombinationen an Adaptormolekülen: Einerseits bindet aktiviertes TLR4 MyD88 und TIRAP, die zusammen die frühe Phase der NF- $\kappa$ B-Aktivierung induzieren, welche in der Produktion von proinflammatorischen Zytokinen, der Reifung der Dendritischen Zellen und der Hochregulation der kostimulatorischen Moleküle resultiert. Andererseits wird durch die Bindung von TRIF und TRAM die späte Phase der NF- $\kappa$ B-Aktivierung und über TRIF ein zweiter Signalweg aktiviert, der zur Produktion von IFN- $\beta$  führt.



**Abb. 1.1: Signalwege der Toll-like Rezeptoren (nach Dunne and O'Neill, 2005).**

NF- $\kappa$ B-Aktivierung erfolgt über die Bindung von TRIF an TRAF6, während die IFN- $\beta$ -Produktion über die Aktivierung von IRF-3 (*interferon regulatory factor 3*) induziert wird. Für die IRF-3-Aktivierung ist die Bindung von TRIF an die nicht-kanonischen Kinasen IKKi und TBK1 notwendig (Sasai et al., 2005).

Auch TLR2 rekrutiert neben MyD88 TIRAP als Adaptor (Takeuchi et al., 2001; Takeuchi et al., 2002). TLR3 dagegen benutzt nur TRIF als Adaptormolekül, das nach der Aktivierung durch TLR3 die TBK1- und IKKi-Kinasen aktiviert, die ihrerseits

die Aktivierung von IRF-3 bewirken (Dunne and O'Neill, 2005). Die Stimulation von TLR7, 8 und 9 kann ebenfalls zur Interferon-Produktion führen; in diesem Fall interagiert MyD88 und TRAF6 direkt mit einem weiteren IFN-regulierenden Faktor IRF-7, um Interferon- $\alpha$  zu induzieren (Kawai et al., 2004).

## 1.4 Funktion der Dendritischen Zellen

Die Aufgabe der Dendritischen Zellen (DZ) besteht darin, eine Infektion zu erkennen und die Immunantwort gegen den eingedrungenen Keim zu steuern. Im unreifen Stadium residieren sie in peripheren Geweben und nehmen dort ständig Antigene auf. Dabei können sie über die Toll-like Rezeptoren mikrobielle Produkte oder Zeichen geschädigten Gewebes erkennen. Wird eine Dendritische Zelle über ein TLR aktiviert, reduziert sie die Aufnahme der Antigene, reguliert die Expression der kostimulatorischen Moleküle hoch und kann nun antigenspezifische T-Zellen aktivieren. Die drei dafür erforderlichen Signale sind erstens die Erkennung desprozessierten Antigen als Peptid-MHC-Komplex durch den T-Zell-Rezeptor, zweitens die Kostimulation durch die Interaktion von CD80 oder CD86 auf der DZ und CD28 auf der T-Zelle und drittens die Sekretion von bestimmten Zytokinen. Die T-Helfer-Zellen polarisieren nach der Aktivierung in zwei Subpopulationen, die unterschiedliche Arten der Immunantwort vermitteln:  $T_H1$ - und  $T_H2$ -Immunantwort. Die Polarisierung wird hauptsächlich über das von den Dendritischen Zellen erzeugte Zytokinmilieu, aber auch über das Mengenverhältnis von den Dendritischen Zellen zu den T-Zellen (Akira et al., 2001) festgelegt. Die Zytokinzusammensetzung wird einerseits durch die Art des Pathogens und andererseits durch die Zugehörigkeit der Dendritischen Zelle zu einer Subpopulation bestimmt. Man unterscheidet mehrere DZ-Subpopulationen, die sich außer in ihrem Zytokinrepertoire auch in der Fähigkeit unterscheiden, Pathogene zu erkennen.

Produziert die Dendritische Zelle nach dem Pathogenkontakt Interleukin 12 (IL-12), so wird die  $T_H1$ -Differenzierung gefördert,  $T_H1$ -Zellen sekretieren daraufhin Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) und vermitteln hauptsächlich die zelluläre Immunität. Die  $T_H2$ -Antwort wird über IL-4 induziert,  $T_H2$ -Zellen produzieren IL-4, IL-5, IL-10 und IL-13 und sind für die Vermittlung der humoralen Immunität zuständig. Infektionen mit intrazellulären Parasiten führen bevorzugt zu einer  $T_H1$ -Antwort, die von den meisten intrazellulären Parasiten und Viren schützt, während eine Wurm-Infektion eine  $T_H2$ -Antwort induziert.

### 1.4.1 Subpopulationen Dendritischer Zellen

In der Milz einer gesunden Maus können anhand des T-Zell-Markers CD8 drei Subtypen unterschieden werden: konventionelle CD8<sup>+</sup>- (CD11c<sup>+</sup>, CD11b<sup>-</sup>, CD8<sup>+</sup>) und CD8<sup>-</sup>-Dendritische Zellen (CD11c<sup>+</sup>, CD11b<sup>+</sup>, CD8<sup>-</sup>), die beide CD11c<sup>+</sup> sind, und CD8<sup>-</sup> CD11c<sup>-</sup>-plasmazytoide Dendritische Zellen (CD11c<sup>-</sup>CD11b<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup>) (Pulendran et al., 2001; Shortman and Liu, 2002). Im humanen System erfolgt die Unterscheidung anhand der Expression von CD11c in CD11c<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup> myeloide Dendritische Zellen und CD11c<sup>-</sup>CD11b<sup>-</sup> plasmazytoide Dendritische Zellen (Res et al., 1999; Spits et al., 2000). Die plasmazytoiden Dendritischen Zellen zeichnen sich durch die Produktion großer Mengen der Typ-I-Interferone aus, während die konventionellen DZ IL-12 produzieren können; beide Zytokine induzieren eher eine T<sub>H</sub>1-Antwort (Shortman and Liu, 2002). Allerdings können Pathogene die regulatorische Funktion der DZ modulieren. Unterschiedliche Formen des Pilzes *Candida albicans* etwa induzieren in unreifen Dendritischen Zellen entweder IL-12- oder IL-4-Sekretion, was zu einer T<sub>H</sub>1- oder einer T<sub>H</sub>2-Antwort führt (d'Ostiani et al., 2000). Auch LPS zweier unterschiedlicher Bakterienklassen können verschiedene Klassen von Immunantworten auslösen: Das LPS von *Escherichia coli*, welches über TLR4 erkannt wird, induziert eine T<sub>H</sub>1-Antwort, während das nicht TLR4-abhängige LPS von *Porphyromonas gingivalis* eher eine T<sub>H</sub>2-Antwort auslöst (Pulendran et al., 2001).

Die Subpopulationen der Dendritischen Zellen haben unterschiedliche Ausstattungen an TLR, die mit der unterschiedlichen Reaktivität der DZ-Typen auf verschiedene Pathogene korrespondieren. Die mRNA-Expression von Toll-like Rezeptoren in den humanen DZ und pre-DZ ist in der Abbildung 1.2 dargestellt (Kadowaki et al., 2001). CD11c<sup>+</sup>-unreife DZ (=DC1) exprimieren hohe Mengen an TLR 1, 2 und 3, niedrige Mengen an TLR 5, 6, 8 und 10 und keine TLR 4, 7 und 9. Im Kontrast dazu exprimieren plasmazytoide pre-DZ (pDC2) hohe Mengen an TLR9 und TLR7 und niedrigere Mengen an TLR 1, 6 und 10; die mRNA von TLR 2, 3, 4, 5 oder 8 konnte nicht nachgewiesen werden. Entsprechend reagieren myeloide Dendritische Zellen gut auf etwa LPS und Peptidoglykan, während plasmazytoide DZ hauptsächlich pathogenen Nukleinsäuren erkennen.

Um die Eigenschaften von Subpopulationen der Dendritischen Zellen untersuchen zu können, werden reine Populationen benötigt. Da allerdings die ex-vivo-Isolierung der DZ in großer Zahl relativ aufwendig ist, werden für Experimente oft *in vitro*

expandierte und kultivierten Primärzellen verwendet. Mit Flt3L (*Fms-Like-Tyrosin-Kinase-3-Ligand*) können aus dem murinen Knochenmark konventionelle und plasmazytoide Dendritische Zellen generiert werden, die den DZ aus der Mausmilz funktionell und morphologisch äquivalent sind (Naik et al., 2005).

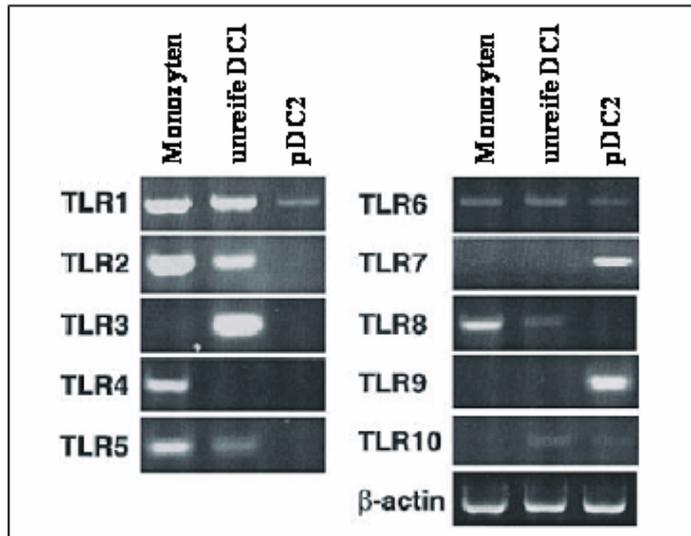


Abb. 1.2: mRNA-Expression der Toll-like Rezeptoren in unterschiedlichen DC-Subpopulationen (Kadowaki et al., 2001)

## 1.5 TLR-abhängige und unabhängige Erkennung der Nukleinsäuren

### 1.5.1 DNA und TLR9

Unmethylierte CpG-DNA tritt häufiger im Genom von Bakterien und bestimmten Viren auf als im Genom von Säugetieren. Dieser Unterschied nutzt das Immunsystem zur Unterscheidung von fremder und endogener DNA. Allerdings kann auch eigene Wirts-DNA unter bestimmten Bedingungen erkannt werden. Gelangt die DNA, die normalerweise im Inneren der Zelle für das Immunsystem nicht erreichbar ist, aus den geschädigten Zellen in den intra- und extrazellulären Raum, kann sie durch Immunzellen wie Makrophagen und Dendritischen Zellen aufgenommen werden und das Immunsystem über TLR9, den Rezeptor für CpG-DNA, stimulieren. IFN- $\alpha$ -induzierende DNA-Immunglobulin-Komplexe etwa sind dafür bekannt, an der Pathogenese von Systemischem Lupus Erythematodes (SLE) beteiligt zu sein. Diese Induktion erfolgt TLR9-abhängig (Marshak-Rothstein et al., 2004; Vallin et al., 1999), TLR9 kann also zusätzlich zur Pathogen-DNA auch CpG- oder noch unbekannte

Motive in der Wirts-DNA erkennen. Nach neusten Berichten scheint das Vorkommen eines CpG-Motivs für die TLR9-vermittelte Stimulation allerdings nicht notwendig zu sein (Sano et al., 2003; Vollmer et al., 2004; Yasuda et al., 2006; Yasuda et al., 2005).

Mehrere Gruppen berichten neuerdings von immunsuppressiven Elementen in der Wirts-DNA (Ishii et al., 2004; Krieg et al., 1998b). Diese sind reich an poly-G- und GC-Sequenzen, wobei das optimale Motiv mit der Sequenz der Telomere (TTAGGG) identisch ist (Gursel et al., 2003). Die suppressiven Oligonukleotide intervenieren nicht mit der CpG-DNA-Aufnahme, sondern blockieren eher die von der CpG-DNA induzierte Signalkaskade, und zwar oberhalb der Translokation von NF- $\kappa$ B in den Nukleus (Yamada et al., 2002). Außerdem binden sie die Transkriptionsaktivatoren STAT1 und STAT4 und inhibieren so TLR9-unabhängig die Aktivierung des Immunsystems (Shirota et al., 2005; Shirota et al., 2004).

Wenn die doppelsträngige Form der DNA (dsDNA) nicht sofort von Nukleasen verdaut wird, kann auch sie, unabhängig vom ihrem Ursprung, immunologisch aktiv wirken. Komplextiert mit kationischen Transfektionsreagenzien, die Ihren Transport durch die Zellmembran erleichtern, reguliert sie in Nicht-Immunzellen und in Makrophagen und Dendritischen Zellen die Expression von IFN-induzierbaren Genen wie MHC-Klasse-I, CD80, 86 und 40 hoch (Ishii et al., 2001; Suzuki et al., 1999). Dabei ist zumindest für die dsDNA-induzierte IFN- $\alpha$ -Produktion die TLR9-Unabhängigkeit gezeigt worden (Yasuda et al., 2005). Mittlerweile ist bekannt, dass der Transkriptionsfaktor IRF-3 und ein cytoplasmatisches Adaptormolekül IPS-I für die Erkennung von dsDNA notwendig sind (Ishii et al., 2006; Stetson and Medzhitov, 2006).

### **1.5.2 TLR3-abhängige und unabhängige Erkennung der doppelsträngigen RNA**

Die Stimulation mit dsRNA ist überwiegend, aber nicht vollständig, TLR3-abhängig. So können auch TLR3-defiziente Dendritische Zellen mit synthetischer Poly-Inosin:poly-Cytidyl-Säure (pI:C) stimuliert werden, wobei für die optimale Stimulation eine Kombination der dsRNA mit Transfektionsreagentien nötig ist. Transfektionsreagentien wie etwa kationische Lipide komplexieren negativ geladenen RNA und erleichtern ihren Transport durch die Zellmembran. Vor kurzem wurde RIG-I, eine CARD-Domäne (*Caspase recruitment domain*) tragende Helicase,

beschrieben, die nach dsRNA-Stimulation IRF3 phosphoryliert wird und dadurch IFN- $\beta$  induziert (Yoneyama et al., 2004). Yoneyama et al. (2004) beschrieben außerdem zwei weitere RNA-Helikasen Lgp2 und Mda5, wobei Lgp2 keine CARD-Domäne besitzt und eher inhibitorisch wirkt.

Interessanterweise war die dsRNA-induzierte Stimulation in RIG-I-defizienten konventionellen Dendritischen Zellen, aber nicht in plasmazytoiden DZ beeinträchtigt (Kato et al., 2005). Für die Erkennung von dsRNA scheinen in konventionellen DZ also beide Moleküle – TLR3 und RIG-I – verantwortlich zu sein. In plasmazytoiden DZ scheint RIG-I dagegen keine Rolle zu spielen.

### 1.5.3 Erkennung von einzelsträngiger RNA

Humane Toll-like Rezeptoren 7 und 8 und muriner Tlr7 erkennen einzelsträngige virale RNA. Auch kurze einzelsträngige RNA-Oligonukleotide mit der geeigneten Sequenz können zur Stimulierung eingesetzt werden (Heil et al., 2004). Allerdings aktiviert auch doppelsträngige *small interfering* RNA (siRNA), die zunächst als TLR3-Ligand beschrieben wurde, plasmazytoide Dendritische Zellen über TLR7 (Hornung et al., 2005).

In krankheitsbedingten Situationen wie etwa bei *Systemischem Lupus Erythematodes* konnte die Erkennung von Wirts-RNA in Form von Autoantikörpern nachgewiesen werden. Diese stimulieren das Immunsystem ebenfalls TLR7-abhängig (Savarese et al., 2005; Vollmer et al., 2005). TLR7- und TLR8-unabhängige Stimulation mit einzelsträngiger RNA ist dagegen bis lang nicht beschrieben worden.

## 1.6 TLR-Liganden als Adjuvantien

Aus Sicherheitsgründen bestehen die modernen Impfstoffe nicht mehr aus abgeschwächten oder abgetöteten Pathogenen, sondern aus rekombinanten Protein- oder Peptidbestandteilen des Pathogens, die mit immunstimulatorischen Adjuvantien kombiniert werden. Die einzigen für den Menschen bislang zugelassenen Adjuvantien sind Aluminiumsalze, wie etwa Aluminiumhydroxid, allgemein Alum genannt. Die Verwendung von Alum ist für die Sicherheit des Patienten unbedenklich, aus vergleichenden Studien weiß man allerdings, dass Alum eher ein schwaches Adjuvans ist. Außerdem erzeugen Alum-Impfungen mit der Induktion von

IL-4, IL-5, IL-6 und IL-10 eher eine  $T_H2$ -Antwort. Für die Bekämpfung vieler Pathogene ist aber eine  $T_H1$ -Antwort adäquater, die mit der IFN- $\gamma$ -Sekretion und Induktion von antigenspezifischen zytotoxischen T-Zellen zur Zerstörung der intrazellulären Pathogene und der befallenen Zellen führt (O'Hagan et al., 2001).

Wie in Abschnitten 1.2 bis 1.4 beschrieben, induzieren viele TLR-Liganden mit der Induktion von IFN- $\alpha$  und IL-12 eher eine  $T_H1$ -Antwort und werden daher als mögliche Adjuvantien gehandelt. MPL (monophosphoryl LipidA, TLR4) etwa, ein von LPS abgeleitetes Adjuvans, generiert eine  $T_H1$ -Antwort, induziert aber eine schwache Antikörperproduktion (Gustafson and Rhodes, 1992; Ulrich and Myers, 1995). Vor kurzem ist von der Eignung des TLR5-Liganden Flagellin als Adjuvans berichtet worden. Intranasal verabreicht induzierte Flagellin von *Vibrio vulnificus* einen guten mukosalen (IgA) und systemischen (IgG) Schutz (Lee et al., 2006).

Der potenteste  $T_H1$ -Immunität induzierende TLR-Ligand im Mausmodell ist allerdings CpG-DNA. Gemessen an der Fähigkeit zur Differenzierung von zytotoxischen und IFN- $\gamma$  produzierenden T-Zellen induziert sie sogar eine stärkere B- und T-Zell-Antwort als das Freud'sche Adjuvans (Krieg, 2002). Dabei können kurze synthetische CpG-Oligonukleotide (ODN) genauso gut wie größere Fragmente bakterieller DNA (Krieg et al., 1995) verwendet werden. Die CpG-Oligonukleotide aktivieren Dendritische Zellen und sollten daher an der gleichen Stelle wie das Antigen injiziert werden, allerdings nicht zwingend zur gleichen Zeit; die Verabreichung des Antigens eine Woche nach der CpG-Injektion führt ebenso zu einer guten Immunreaktion auf das Antigen (Lipford et al., 2000). Eine stärkere spezifische Immunreaktion wird allerdings durch die kovalente Bindung des Antigens an das CpG-Oligonukleotid erreicht (Maurer et al., 2002). CpG-DNA kann für Vakzinierungen durch subcutane und intramuskuläre Injektionen, aber auch für mukosale und orale Vakzinierungen verwendet werden (Krieg, 2002).

Die Eignung der immunstimulatorischen RNA-Oligonukleotide als Adjuvans wurde mittlerweile ebenfalls untersucht (Scheel et al., 2004), die Stärke und die Art der erfolgten Immunantwort wurden dabei jedoch nicht genau erforscht.

## 1.7 Aktivierung des Immunsystems durch siRNA

RNA Interferenz (RNAi) wurde zuerst 1998 in *Caenorhabditis elegans* beschrieben (Fire et al., 1998). Dabei wurde durch die Injektion langer doppelsträngiger RNA-Fragmente (dsRNA) in das adulte Tier die Expression homologer Gene

herunterreguliert. Dieses Phänomen wird *Silencing* genannt. Mittlerweile wurden ähnliche Beobachtungen in Pflanzen, *Drosophila melanogaster* und in murinen embryonalen Stammzellen beschrieben (Baulcombe, 2004; Mello and Conte, 2004; Yang et al., 2001). Gelangen lange dsRNAs in das Cytoplasma, so werden sie durch ein RNaseIII-Enzym, das sogenannte Dicer, in 21-Nukleotide (nt) lange Stücke mit 2 nt langen Überhängen, die *small interfering RNAs* (siRNA), geschnitten. SiRNA wird dann in das RNA-induzierte *Silencing* Komplex (RISC) integriert, welches die Degradierung der zur siRNA komplementären mRNA vermittelt. Dadurch kommt es zum *Silencing* der Genexpression (siehe Abb. 1.3). Um die siRNA therapeutisch einzusetzen, mussten allerdings zunächst Techniken entwickelt werden, siRNA effizient in das Cytoplasma zu bringen. Dabei fiel auf, dass siRNA Zellen des Immunsystems aktivieren und die Produktion von Zytokinen *in vitro* und *in vivo* induzieren kann (Kariko et al., 2004a; Sioud and Sorensen, 2003).

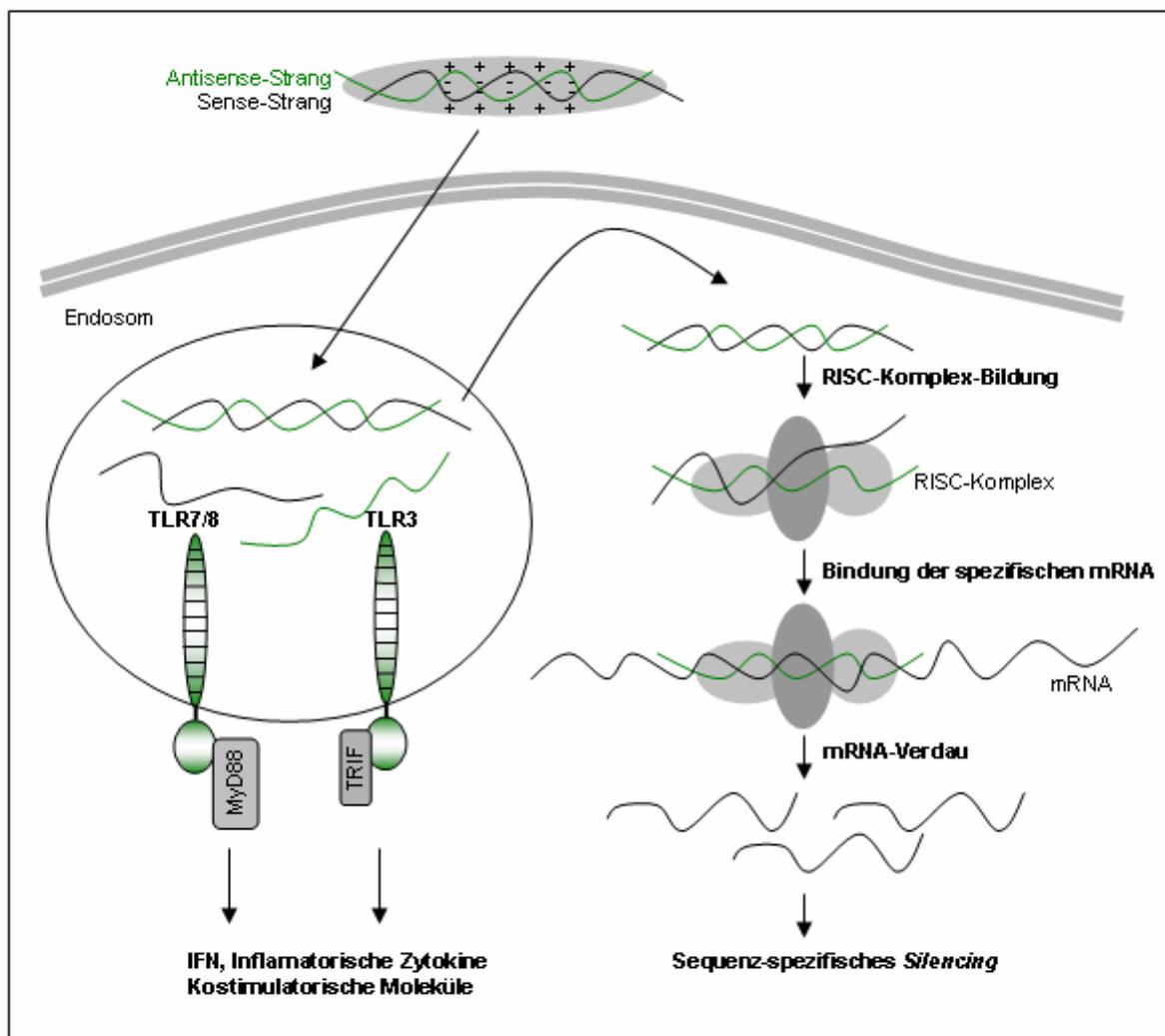


Abb. 1.3: Immunstimulation und *Silencing* durch die siRNA.

Zum Beispiel hatten Mäuse, die mit immunstimulatorischer siRNA injiziert wurden, erhöhte Werte an Entzündungsmediatoren im Blut und eine reduzierte Zahl an Lymphozyten und Thrombozyten (Judge et al., 2005). Zwar ist vorstellbar, dass die Aktivierung des Immunsystems durch siRNA, etwa bei der Behandlung von viralen Infektionen oder Tumoren, erwünscht ist, meistens wären diese immunstimulatorischen Nebenwirkungen aber eher störend.

Inzwischen ist bekannt, dass je nach Zelltyp TLR7 oder TLR3 die Erkennung der siRNA vermitteln (Hornung et al., 2005; Kariko et al., 2004a; Sioud, 2005). Dabei scheinen vorzugsweise G- und U-reiche Sequenzen immunstimulatorisch zu sein. Allerdings wurden auch Sequenzen, die keine GU-reichen Motive besitzen, als immunstimulatorisch beschrieben (Hornung et al., 2005; Sioud, 2005).

Indessen wurde nach Möglichkeiten gesucht, die siRNA so zu modifizieren, dass sie das *Silencing*-Potenzial behält, aber nicht mehr fähig ist, Immunantworten zu induzieren. *Locked-nucleic-acid*(LNA)-Modifikation etwa kann die Immunaktivität der siRNA aufheben, jedoch sollten die Position und die Ausdehnung der Modifikation genauer untersucht werden, da sie auch Auswirkungen auf die *Silencing*-Aktivität haben können (Hornung et al., 2005).

Es ist bekannt, dass die 2'-O-Methylierung der Ribose und die Basenmethylierung von RNA zum Verlust ihrer immunstimulatorischen Aktivität führt (Ishii and Akira, 2005; Kariko et al., 2005; Sugiyama et al., 2005). So sollte die Möglichkeit, durch die Methylierung von siRNA Immunstimulation zu verhindern, erwägt und hinsichtlich ihrer Auswirkungen auf die *Silencing*-Aktivität untersucht werden

## 1.8 Ziel der Doktorarbeit

In dieser Arbeit wurden immunstimulatorische Eigenschaften von RNA unter verschiedenen Aspekten untersucht:

Zuerst wurden die Möglichkeiten geprüft, ob RNA als Adjuvans bei Impfprotokollen verwendet werden kann. Dafür wurden Mäuse verschiedener Stämme mit Hühnereiovalbumin als Antigen und RNA und CpG-DNA als Adjuvantien subkutan injiziert. Nach einer zweiten Injektion wurde die Immunreaktion hinsichtlich der zytotoxischen T-Zell-Antwort, Antikörperproduktion und erworbenen Immunität untersucht.

Der zweite Abschnitt dieser Arbeit befasst sich mit dem Phänomen der Tlr7-unabhängigen Stimulation von einzelsträngiger RNA (ssRNA). Nachdem die

---

physiologische RNA mit dem Phosphodiester-Gerüst (PD-RNA) chemisch recht labil ist, wurden die frühen Untersuchungen zur TLR-Abhängigkeit von ssRNA mit synthetischen Oligonukleotiden durchgeführt, die ein stabileres Phosphorothioat-modifiziertes Gerüst hatten (PTO-RNA). Diese stimulierten Mauszellen Tlr7-abhängig. Bei der Arbeit mit einzelsträngiger PD-RNA fiel allerdings auf, dass die physiologische PD-RNA auch in Tlr7-defizienten Zellen eine relativ starke Stimulation hervorruft. Dieses Phänomen zu untersuchen und den für die Tlr7-unabhängige Stimulation verantwortlichen Rezeptor zu finden war das zweite Ziel dieser Arbeit. Dafür wurden *ex-vivo*-Kulturen verschiedener *knockout*-Mäuse mit PTO- und PD-RNA-Oligonukleotiden stimuliert und die Zytokinproduktion und der Aktivierungszustand der Zellen untersucht.

Die Eliminierung von unerwünschter Immunstimulation durch siRNA war ein weiteres Projekt dieser Doktorarbeit. In dieser Arbeit wurden die Auswirkungen der 2'-O-Ribose-Methylierung auf die immunstimulatorische und *Silencing*-Aktivität von siRNA untersucht: Als Beispiel wurden zwei siRNA-Modelle verwendet: eGFP-spezifische siRNA in eGFP-transgenen Immunzellen und eine gegen murines Mikroglobulin- $\beta$ 2 gerichtete siRNA in murinen Immunzellen.

## 2 Materialien und Methoden

### 2.1 Materialien

#### 2.1.1 Geräte

Produkt	Firma, Firmensitz
Autoklav	Variklav, H+B Labortechnik GmbH, Oberschleißheim
Elektroporationsapparatur	GenePulser Xcell, BioRad, München
Gelelektrophorese-Kammern	Horizon 11.14™, Gibco (BRL Life Technologies) Invitrogen GmbH, Karlsruhe; Mini-sub® cell GT, BioRad, München; Biometra® Agarose Mini, Biometra, Göttingen
Heizblock	Liebisch, Bielefeld
Inkubatoren	Heraeus Instruments, Hanau
Luminometer	Berthold Detection Systems, Pforzheim
Mikrowellenherd	Panasonic
ELISA-Reader	MWG, Bielefeld
ELISA-Wacher	Skatron, Norwegen
Photometer	Pharmacia, Freiburg
Pipetten	Biohit, Köln; Gilson, Camberg
Schüttelinkubator	INFORS AG, Bottmingen
Spannungsquellen	Biometra, Göttingen; Renner GmbH, Dannstadt
Sterilbank	Lamin Air HB 2472, HERA safe, Heraeus Instruments, Hanau
TaqMan	ABIPRISM™ 7700 Sequence Detector, Perkin Elmer, Freiburg
Termocycler	DNA Thermal Cycler, Perkin Elmer, Freiburg; iCycler, Biorad, München
Tischzentrifuge	Fuge-Vortex 2400, BIOSAN Laboratories, Inc., Warren, USA
UV-Leuchttisch	Hitachi, Düsseldorf

Videodokumentation	Video copy processor, Mitsubishi; Bildschirm, Hitachi, Düsseldorf; Belichtungsmesser, CS1 Cybertech, Berlin
Zentrifugen	Omnifuge 2.ORS, Megafuge 3.OR, Biofuge fresco, Biofuge pico, Biofuge 13, Heraeus, Hanau; Beckman J2-HC, Beckman, München
Durchflußzytometrie	FACSCallibur, FACSTFlow Supply System, Becton Dickinson, Heidelberg

**Tab. 2.1: Für die Arbeit verwendete Geräte.**

### 2.1.2 Chemikalien, Enzyme und Stimuli

Wenn nicht anders angegeben, wurden Laborchemikalien und Laborgeschirr von Roth (Karlsruhe) bezogen. Besondere Chemikalien und Enzyme sind in der Tabelle 2.2 angegeben.

Produkt	Firma	Firmensitz
Agarose	Roth	Karlsruhe
1kb DNA Leiter	Gibco Invitrogen GmbH	Karlsruhe
Antikörper	BD Biosciences	Heidelberg
Dotap	Roche	Mannheim
Flt3-Ligand	freundliche Gabe von M. O'Keeffe, WEHI	Melbourne, Australien
Interferon- $\gamma$	PeproTech	London, England
LPS	Sigma-Aldrich	Taufkirchen
mGM-CSF	PeproTech	London, England
mM-CSF	PeproTech	London, England
M-MLV RT	Promega	Mannheim
Pam3CysK4	EMC microcollections GmbH	Tübingen
PBS	PAA Laboratories GmbH	Cölbe
PCR Master Mix	Qiagen	Hilden
Poly(I:C)	Invivogen	Toulouse, Frankreich
Propidium Jodid (PI)	Sigma-Aldrich	Taufkirchen

R848	freundliche Gabe von G. Lipford, Coley Pharmaceuticals	Düsseldorf
<i>random primers</i>	Promega	Mannheim
Red blood cell lysis buffer	Sigma-Aldrich	Taufkirchen
SYBR GREEN	Applera GmbH	Darmstadt
TriReagent	Sigma-Aldrich	Frankfurt am Main
Tween20	Roth	Karlsruhe

**Tab. 2.2: Verwendete Chemikalien und Reagenzien.**

### 2.1.3 Verwendete Oligonukleotide

Hier sind sowohl die Sequenzen von Oligonukleotiden, die zur Stimulation verwendet wurden, als auch die Sequenzen von den zur Herstellung von siRNA verwendeten RNA-Oligonukleotide aufgeführt. RNA-Oligonukleotide wurden von CureVac, Tübingen, DNA-Oligonukleotide von TIB Molbiol, Berlin hergestellt.

Name	Typ	Sequenz
ODN1668	DNA	5'-TsCsCsAsTsGsAsCsGsTsTsCsCsTs GsAsTsGsCsTs-3'
ODN2216	DNA	5'-GsGsGGGACGATCGTCGsGsGsGsGsG- 3'
RNA63PD	RNA	5'-CAGGUCUGUGAsU-3'
RNA63PTO	RNA	5'-CsAsGsGsUsCsUsGsUsGsAsU-3'
RNA40PD	RNA	5'-GCCCGUCUGUUGUGUGACUsC-3'
RNA40PTO	RNA	5'-GsCsCsCsGsUsCsUsGsUsUGsUsGs UsGsAsCsUsC-3'
RNA35	RNA	5'-GGU GCA UCG AUG CAG GGG GsG-3'
RNA37GC	RNA	5'-GGU GCA UGC AUG CAG GGG GsG-3'
RNA1668	RNA	5'-UCC AUG ACG UUC CUG AUG CsU-3'
RNA1668GC	RNA	5'-UCC AUG AGC UUC CUG AUG CsU- 3'
egfp64/84sense	RNA	5'-GAC GUA AAC GGC CAC AAG UUC-3'
egfp62/82antisense	RNA	5'-ACU UGU GGC CGU UUA CGU CGC-3'
egfp64/84senseM	RNA	5'-G <u>A</u> C <u>G</u> U <u>A</u> <u>A</u> A <u>C</u> <u>G</u> G <u>C</u> <u>C</u> A <u>C</u> <u>A</u> A <u>G</u> <u>U</u> U <u>C</u> -3'
egfp62/82antisenseM	RNA	5'- <u>A</u> C <u>U</u> <u>U</u> G <u>U</u> <u>G</u> G <u>C</u> <u>C</u> G <u>U</u> <u>U</u> U <u>A</u> <u>C</u> G <u>U</u> <u>C</u> G <u>C</u> -3'

mMb232/252sense	RNA	5'-AAG GAC UGG UCU UUC UAU AUC-3
mMb234/254anUisense	RNA	5'-UAU AGA AAG ACC AGU CCU UGC-3'
mMb232/252senseM	RNA	5'- <u>A</u> A <u>G</u> <u>G</u> A <u>C</u> <u>U</u> G <u>G</u> <u>U</u> C <u>U</u> <u>U</u> U <u>C</u> <u>U</u> A <u>U</u> <u>A</u> U <u>C</u> -3
mMb234/254anUisenseM	RNA	5'- <u>U</u> A <u>U</u> <u>A</u> G <u>A</u> <u>A</u> A <u>G</u> <u>A</u> C <u>C</u> <u>A</u> G <u>U</u> <u>C</u> C <u>U</u> <u>U</u> G <u>C</u> -3'

**Tab. 2.3: Sequenzen der verwendeten DNA- und RNA-Oligonukleotide.** s steht für eine Phosphorothioat-Verknüpfung, unterstrichen bedeutet, dass die Basen methyliert wurden.

### 2.1.4 Medien und Medienzusätze

Wenn nicht anders angegeben, wurden die Medien als Vollmedien (Tab. 2.4) mit allen Zusätzen (Tab. 2.5) verwendet.

Medium	Hersteller	Verwendete Zusätze
RPMI-1640	PAA Laboratories, Cölbe	2 mM L-Glutamin 0,05 mM $\beta$ -Mercaptoethanol 10% FCS 100 u/ml Penicillin 100 $\mu$ g/ml Streptomycin
DMEM	PAA Laboratories, Cölbe	2 mM L-Glutamin 7% FCS 100 u/ml Penicillin 100 $\mu$ g/ml Streptomycin

**Tab. 2.4: Verwendete Medien.**

Zusatz	Hersteller
FCS	PAN Biotech GmbH, Aidenbach
$\beta$ -Mercaptoethanol	PAN Biotech GmbH, Aidenbach
L-Glutamin Penicillin Streptomycin	PAA Laboratories, Cölbe

**Tab. 2.5 :Für die Herstellung von Vollmedien verwendete Zusätze.**

### 2.1.5 Verwendete Plastikware

Gefäß	Firma, Firmensitz	Anwendung
14 ml Polystyren Rundboden-Röhrchen	Becton Dickinson, Heidelberg	Zellpassage
15 ml Polypropylen Spitzbodenröhrchen	Greiner bio-one, Frichenhausen	Zellpassage
Cellstar® 50 ml PP Spitzboden-Röhrchen	Greiner bio-one, Frichenhausen	Zellpassage, Aufreinigung von PBMC
Cellstar® 15 ml PP Spitzboden-Röhrchen	Greiner bio-one, Frichenhausen	Zellpassage, Durchflußzytometrie
15 cm Platten, PS, mit 20 mm Netzraster	Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA	Kultivierung der HEK293-Zellen
10 cm Petrischalen	Nunc, Wiesbaden	Kultivierung der GM- CSF- und M-CSF- Zellkulturen
Nuclon™ ZK-Flaschen, 25 cm <sup>2</sup> , PS	Nunc, Wiesbaden	Kultivierung der Suspensionzellen
96-well Platten, Flachboden	Nunc, Wiesbaden	Kultivierung von Makrophagen und adhärenten Zelllinien
6-well Platten	Nunc, Wiesbaden	Stimulation der Suspensionszellen
24-well Platten	Nunc, Wiesbaden	Stimulation der adhärenten Zellen
Spritzen und Kanülen	BD Falcon, Heidelberg	Blutentnahme, Knochenmark- Aufreinigung
Zellsieb ( <i>cell strainer</i> )	BD Falcon, Heidelberg	Knochenmark- Aufreinigung

Tab. 2.6: Für die Arbeit mit Zellen verwendete Plastikware.

## 2.2 Zellkultur

Alle Arbeiten mit Zellen wurden unter Laminar-flow-Arbeitsbänken der Sicherheitsstufe 2 durchgeführt (Heraeus, Hanau). Die Zellen wurden in einem Inkubator (CO<sub>2</sub>-Inkubator, Heraeus, Hanau) bei 37°C, 7% CO<sub>2</sub> und 90% Luftfeuchtigkeit gehalten. Die verwendeten Zellkulturgefäße werden von M&B Stricker vertrieben. Die Herstellungsfirma und die Art der Anwendung sind im Abschnitt 2.1.5 aufgeführt.

### 2.2.1 Zellkulturen und Zelllinien

Es wurde mit den in der Tabelle 2.7 aufgeführten Zellkulturen und Zelllinien gearbeitet.

Name	Ursprung	Art der Kultivierung
HEK293	humane Fibroblasten, Nierengewebe	adhärent, in 15 cm Schalen, in DMEM-Vollmedium
Primäre Makrophagen	Murines Knochenmark	Kultivierung mit M-CSF in 10 cm Petrischalen, adhärent, in RPMI-1640 Vollmedium
GM-CSF-Dedritische Zellen	Murines Knochenmark,	Kultivierung mit GM-CSF in 10 cm Petrischalen, adhärent, in RPMI-1640 Vollmedium
Flt3L-Dedritische Zellen	Murines Knochenmark,	Kultivierung mit Flt3L in 25 ml Zellkultur-flaschen, Suspension, in RPMI-1640 Vollmedium
PBMC ( <i>peripheral blood mononuclear cells</i> )	humanes Blut	Suspension, in RPMI-1640 Vollmedium

Tab. 2.7: Art der Kultivierung der Zelllinien und Zellkulturen.

### 2.2.2 Bestimmung der Zellzahl

Zur Zellzahlbestimmung wurden die Zellen in einem bestimmten Volumen resuspendiert. Um tote Zellen sichtbar zu machen, wurden sie mit einem definierten Volumen Eosin verdünnt. Eosin diffundiert in tote Zellen und färbt sie rosa an,

während lebende Zellen gelblich bleiben. Die Zellzahl wurde in einem Lichtmikroskop bei 2000x Vergrößerung mit Hilfe einer Neubauer-Zellkammer nach folgender Formel bestimmt:

$$N(\text{Zellen/ml}) = \text{Zellen im Großquadrat} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 10^4$$

#### Eosinlösung:

2 g Eosin, 250 mg Natriumazid, 450 ml 0,9 % Natriumchlorid-Lösung und 50 ml FCS werden eingerührt, durch einen Papierfilter filtriert, portioniert und unsteril bei 4°C gelagert.

### **2.2.3 Kultivierung der Zelllinien**

#### 2.2.3.1 Zellpassage

Die adhärennten Zellen wurden nach Erreichen der Konfluenz passagiert, also alle 2 bis 3 Tage. Dafür wurde zuerst das Medium entfernt und auf die 15 cm Platte 10 ml 0,05% Trypsinlösung pipettiert. Nach einer fünfminütigen Inkubation im Brutschrank wurden 10 ml Kulturmedium dazugegeben. Die Zugabe des Vollmediums unterbindet die Enzymwirkung. Die Zellen wurden zentrifugiert und in 8 ml Medium aufgenommen, davon wurde je 1 ml wieder ausgesät.

#### Trypsin-Lösungen:

10 x Trypsinlösung wurde von PAA bezogen, sie enthält: 0.5% Trypsin, 0,2% EDTA. Die Lösung wurde in PBS verdünnt.

#### 2.2.3.2 Kryokonservierung der Zellen

$3-5 \times 10^6$  Zellen wurden pelletiert, in einem Milliliter Einfriermedium aufgenommen und in Kryoröhrchen (Nunc, Wiesbaden) überführt. Die Kryoröhrchen wurden zuerst eine halbe Stunde bei -20°C und dann über Nacht bei -80°C langsam eingefroren. Die Lagerung erfolgte im flüssigen Stickstoff.

Zum Auftauen wurden die Zellen aus dem flüssigen Stickstoff genommen und das Kryoröhrchen schnell aufgetaut (einige Minuten bei 37°C). Die Zellen wurden dann mit 10 ml Medium gewaschen (1400 rpm, 5 min, 4°C), und in 10 bis 15 ml Medium aufgenommen.

Einfriermedium:

90% FCS, 10% DMSO

**2.2.4 Gewinnung und Kultivierung primärer Zellen****2.2.4.1 Isolierung von murinem Knochenmark**

Knochenmarkzellen stellen pluripotente Stammzellen dar, aus denen jede hämatopoetische Zelle generiert werden kann.

Knochenmarkszellen wurden aus dem Ober- und Unterschenkel der Maus isoliert. Dazu wurden der toten Maus beide Hinterbeine entnommen und die Knochen von Fell, Fleisch und Sehnen gesäubert. Anschließende Arbeiten wurden unter Laminar-flow-Sterilbänken durchgeführt.

Arbeitsanleitung zur Knochenmarkisolierung

1. Saubere Knochen in 70%-Ethanol für 1-2 min desinfizieren.
2. Desinfizierte Knochen mit einer in 70%-Ethanol desinfizierten Pinzette steril in frisches RPMI-1640-Vollmedium überführen.
3. Zum Spülen der Knochen eine 20 ml Spritze mit frischem RPMI-1640-Vollmedium befüllen und mit einer 24G, 1" Kanüle bestücken.
4. Mit einer desinfizierten Schere Knochen oben und unten aufschneiden, mit einer sterilen Pinzette über ein steriles 50 ml Röhrchen halten und mit der Spritze solange die Markhöhle spülen bis der gesamte Knochen weiß erscheint. Knochen verwerfen.
5. Gesammelte Zellsuspension bei 1800 rpm und 4°C für 5 min zentrifugieren. Überstand abkippen und das Zellpellet mit 1 ml/Maus Erythrozyten-Lyse-Puffer für 2 min bei RT inkubieren. Danach die Reaktion durch die Zugabe von 20 ml Vollmedium abstoppen.
6. Zellsuspension durch ein Zellsieb filtrieren, und wie oben angegeben zentrifugieren. Zellpellet sollte nach der Ery-Lyse hellrosa sein. Überstand verwerfen, die Zellen in 10 ml Vollmedium resuspendieren und zählen (siehe 2.2.2).
7. Zellen als Suspension können für mehrere Stunden auf Eis gelagert werden.

#### 2.2.4.2 Generierung der M-CSF-Makrophagen

Frisch isolierte Knochenmarkszellen wurden mit RPMI-1640-Vollmedium auf eine Konzentration von  $0,5 \times 10^6$  Zellen/ml eingestellt und mit 50 ng/ml M-CSF in Petrischalen 5-7 Tage kultiviert. Alle drei Tage wurde neues M-CSF dazugegeben. Zum Ablösen der Zellen wurde das Medium abgesaugt und die Zellen mit 5 ml MACS-Puffer 10 min bei 37°C inkubiert. Das Ablösen wurde mit Vollmedium gestoppt, die Zellen gezählt und für weitere Experimente in Flachbodenplatten ausgesät.

#### MACS-Puffer:

2 mM EDTA, 3% FCS in 500 ml PBS

#### 2.2.4.3 Generierung der GM-CSF-Dendritischen Zellen

Zur Generierung von GM-CSF-Dendritischen Zellen wurden frisch isolierte Knochenmarkszellen mit RPMI-1640-Vollmedium auf  $0,3 \times 10^6$  Zellen/ml eingestellt und mit 10 ng/ml GM-CSF in Petrischalen kultiviert. Alle drei Tage wurde neues GM-CSF dazugegeben. Am Tag 7 wurden die Zellen mit MACS-Puffer (siehe 2.2.4) abgelöst, das Ablösen wurde mit Vollmedium gestoppt, die Zellen gezählt und für weitere Experimente in Flachbodenplatten ausgesät.

#### 2.2.4.4 Generierung von Flt3L-Dendritischen Zellen

Frisch isolierte Knochenmarkszellen wurden mit RPMI-1640 Vollmedium auf eine Konzentration von  $1,5 \times 10^6$  Zellen/ml eingestellt, mit 35 ng/ml Flt3-Ligand versetzt und in Kulturflaschen ausgesät. Die Kultivierung der Zellsuspension erfolgte liegend für 8 Tage. Nach dieser Zeit besteht die Kultur aus 30-50% CD45RA<sup>+</sup> CD11c<sup>+</sup> pDZ , 30-50% CD45RA<sup>-</sup> CD11c<sup>+</sup> cDZ und etwa 15% CD11c<sup>-</sup>-Zellen (Im Unterschied zu *ex-vivo*-Isolaten sind pDZ in dieser Kultur CD11c<sup>+</sup>). Die Zellen wurden nach mehrfachem Spülen des Flaschenbodens aus der Flasche pipettiert und für weitere Experimente in U-Boden-Platten ausgesät.

#### 2.2.4.5 Aufreinigung von PBMC

Die PBMC (mononukleare Zellen des peripheren Blutes) wurden aus dem eigenen

oder dem Blut der Kollegen isoliert. Bei der Arbeit mit Humanmaterial müssen Handschuhe getragen und der anfallende Abfall gesondert entsorgt werden.

Soweit nicht anders angegeben wurden alle Schritte bei Raumtemperatur durchgeführt. Das Blut wurde eins zu eins mit dem RPMI-1640 Medium gemischt. Dann wurden 15 ml Lymphozytenseparationsmedium (LSM, PAA Laboratories GmbH, Österreich) je nach Menge des Blutes in zwei bis drei *blue cap*-Röhrchen vorgelegt und vorsichtig mit 30 ml des Gemisches überschichtet.

Durch die Zentrifugation (2200 rpm, 25°C, 25 min, ohne Bremse) können die PBMC von den Granulozyten und restlichen Erythrozyten getrennt werden. Da das Lymphozytenseparationsmedium eine Dichte von 1,09 g/ml hat, sinken die Granulozyten und Erythrozyten, die eine höhere Dichte von 1,09-1,1 g/ml haben, unter die LSM-Schicht ab, während die PBMC mit einer Dichte von 1,06-1,08 auf der LSM-Schicht liegen bleiben.

Diese Phase wurde mit einer 10 ml Pipette vorsichtig entnommen. Die Interphasen einer Person wurden gepoolt, auf 50 ml mit dem RPMI-1640 Medium aufgefüllt und bei 1300 rpm und 4°C 7 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt, das Pellet wurde noch einmal mit 50 ml RPMI-1640 gewaschen, in 25 ml RPMI-1640-Komplett-Medium aufgenommen und die Zellzahl bestimmt.

Die Zellen können schräg liegend über Nacht im Kühlschrank aufbewahrt werden.

### **2.2.5 Stimulation der Zellen**

Soweit im Text nicht anders angegeben, wurden die Stimuli mit den in der Tab. 2.8 aufgeführten Konzentrationen eingesetzt. Für die Stimulation wurden die Zellen in entsprechende 96-well Platten in jeweils 100 µl/well (siehe 2.2.4) folgendermaßen ausgesät: Makrophagen und GM-CSF-DZ  $100 \times 10^3$  Zellen/well, Flt3L-DZ und humane PBMC  $300 \times 10^3$  Zellen/well. Die Stimulationen wurden in Doppelbestimmungen durchgeführt. Anschließend wurden die Kulturüberstände abgenommen und für Zytokinbestimmung (ELISA) verwendet. Die stimulierten Zellen wurden weiterverwendet und ihre Expression von Oberflächenmolekülen im Durchflußzytometer untersucht.

<b>Stimulus</b>	<b>eingesetzte Endkonzentration</b>	<b>Stockkonzentration</b>
CpG-Oligonukleotide	0,5 µM	0,5 mM in Wasser
RNA-Oligonukleotide	5 bis 0,2 µM	1 mM in Liposomenpuffer
LPS	0,5 µg/ml	1 mg/ml in Wasser
Pam3Cys	1 µg/ml	1 mg/ml in Wasser
R848	2 µg/ml	26,5 mg/ml in DMSO
poly(I:C)	50 µg/ml	2 mg/ml in Wasser

**Tab. 2.8: Verwendete Stimuli und ihre Konzentrationen.**

### 2.2.5.1 Stimulation mit RNA

Die Stimulation mit RNA wurden mit dem kationischen liposomalen Transfektionsreaktionsreagenz DOTAP durchgeführt. Die kationischen Lipide bilden Liposomen, die spontan mit negativ geladenen Nukleinsäuren interagieren. Die Lipid-Nukleinsäure-Komplexe fusionieren aufgrund ihres lipophilen Charakters mit der Zellmembran und erleichtern damit den Transport der Nukleinsäuren ins Zellinnere. RNA in den verwendeten Konzentrationen ohne Hilfe von DOTAP ist nicht stimulierend, man verwendet RNA ohne DOTAP als Kontrolle.

Für eine Doppelbestimmung wurde die entsprechende Menge RNA in 50 µl Liposomenpuffer in einem Rundboden-Röhrchen vorgelegt, mit 50 µl DOTAP-Mastermix versetzt und gemischt. Es folgte eine Inkubation bei RT für 15 min. Für die Stimulation ohne DOTAP wurde die entsprechende Menge RNA direkt in 100 µl Liposomenpuffer aufgenommen. Nach der Inkubation wurden zu jedem Ansatz 120 µl Medium dazugegeben und jeweils 100 µl auf die Zellen pipettiert (1 x 100 µl je Doppelbestimmung).

#### Liposomenpuffer:

20 mM HEPES, 150 mM NaCl, pH 7,4, 1/1000 Volumen DEPC, 3h rühren, 2 x autoklavieren

#### DOTAP-Mastermix (für eine Doppelbestimmung):

5 µl DOTAP, 47 µl Liposomenpuffer

## 2.3 ELISA (*Enzyme-Linked-Immunosorbent Assay*)

### 2.3.1 Prinzip des ELISA

Die Technik des ELISA zählt zu den am häufigsten verwendeten Immunoassays. Der ELISA wird in verschiedenen Varianten eingesetzt, deren Basis drei physikalisch-chemische Prozesse darstellen: Als erstes die Adsorption von Antikörper oder Antigen an einer Festphase (Plastikoberfläche), dann die spezifische Interaktion von Antikörper und Antigen und schließlich die enzymatische Nachweisreaktion.

Zum Nachweis von Zytokinen in Kulturüberständen wurden so genannte *Sandwich-ELISAs* durchgeführt. Dazu wird zunächst ein für das zu bestimmende Zytokin spezifischer Antikörper in den Wells einer Mikrotiter-Platte immobilisiert. Dieser Vorgang wird als *coating*, der verwendete Antikörper als *capture*-Antikörper bezeichnet. Freie Bindungsstellen der Plastikoberfläche werden durch Zugabe einer proteinhaltigen Lösung abgesättigt. Danach wird die zu untersuchende Probe zugegeben. Am *capture*-Antikörper gebundene Zytokine werden durch Bindung eines zweiten Antikörpers, der ein anderes Epitop des gesuchten Antigens erkennt, detektiert. Dieser Detektions-Antikörper ist entweder direkt mit einem Enzym konjugiert oder wird in einem weiteren Schritt indirekt nachgewiesen. Diese indirekte Nachweisreaktion erfolgt bei Biotin-konjugierten Detektions-Antikörpern durch Inkubation mit Enzym-gekoppeltem Streptavidin. Im Fall eines nichtmarkierten Detektions-Antikörpers können auch Enzym-konjugierte Antikörper gegen den Fc-Teil des Detektions-Antikörpers eingesetzt werden. Als Enzym wird bevorzugt die Meerrettich-Peroxidase (*horseradish peroxidase*, HRP) eingesetzt. Zuletzt wird ein farbloses Substrat zugegeben, das durch das Enzym in ein farbiges Produkt umgesetzt wird. Die Farbintensität, die photometrisch gemessen wird, ist proportional zur Konzentration des Enzymgebundenen Antikörpers und damit auch zur Konzentration des detektierten Antigens. Die Qualität und Quantität der gemessenen Proben lässt sich im Vergleich zu Standardreihen mit definierten Mengen des untersuchten Proteins bestimmen.

### 2.3.2 Verwendete ELISA-Systeme

Die eingesetzten ELISA-Systeme sind in Tabelle 2.9 angeführt.

<b>Antikörper Nachweisprotein</b>	<b>bzw.</b>	<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Stammkonz.</b>	<b>Engesetzte Endkonz.</b>
<b>Human-IFN-<math>\alpha</math></b>					
<i>Capture</i>		<i>Coating Antibody</i>	Bender MedSystems, Wien, Österreich	100 $\mu\text{g/ml}$	8,3 $\mu\text{g/ml}$
Detektion (HRP- konjugiert)		HRP-Konjugat	Bender MedSystems, Wien, Österreich	nicht angegeben	1:2000
Standard		Recombinant hu-IFN- $\alpha$	PeproTech, London, England	100 ng/ml	8 ng/ml
<b>Human-TNF-<math>\alpha</math></b>					
<i>Capture</i>		Purified mouse- $\alpha$ -human TNF- $\alpha$	BD Pharmingen, Heidelberg	500 $\mu\text{g/ml}$	1 $\mu\text{g/ml}$
Detektion		Biotinylated mouse- $\alpha$ -human TNF- $\alpha$	BD Pharmingen, Heidelberg	500 $\mu\text{g/ml}$	5 $\mu\text{g/ml}$
Enzym		AMDEX <sup>TM</sup> streptavidin-HPR	Amersham Biosciences, Freiburg	1000 $\mu\text{g/ml}$	0,2 $\mu\text{g/ml}$
Standard		Recombinant human-TNF- $\alpha$	BD Pharmingen, Heidelberg	10 $\mu\text{g/ml}$	10 ng/ml
<b>Maus-IFN-<math>\alpha</math></b>					
<i>Capture</i>		Rat- $\alpha$ -mouse IFN- $\alpha$	PBL, New Brunswick, USA	1000 $\mu\text{g/ml}$	1 $\mu\text{g/ml}$
Detektion		Rabbit- $\alpha$ -mouse IFN- $\alpha$	PBL, New Brunswick, USA	2000 units/ml	2 units/ml
Enzym		Donkey- $\alpha$ -rabbit- IgG-HRP	Dianova GmbH, Hamburg	800 $\mu\text{g/ml}$	0,1 $\mu\text{g/ml}$
Standard		Recombinant mouse-IFN- $\alpha$	HyCult Biotechnology, Uden, Niederlande	$1 \times 10^5$ units/ml	500 units/ml
<b>Maus-IL-6</b>					
<i>Capture</i>		Purified rat- $\alpha$ -mouse IL-6	BD Pharmingen, Heidelberg	500 $\mu\text{g/ml}$	2 $\mu\text{g/ml}$
Detektion		Biotinylated rat- $\alpha$ -mouse IL-6	BD Pharmingen, Heidelberg	500 $\mu\text{g/ml}$	2 $\mu\text{g/ml}$
Enzym		AMDEX <sup>TM</sup> streptavidin-HPR	Amersham Biosciences, Freiburg	1000 $\mu\text{g/ml}$	0,2 $\mu\text{g/ml}$
Standard		Recombinant mouse-IL-6	BD Pharmingen, Heidelberg	1 $\mu\text{g/ml}$	5 ng/ml

<b>Maus-IL-12</b>				
Capture	Purified α-mouse IL-12 p40/p70	BD Pharmingen, Heidelberg	1 mg/ml	0,5 µg/ml
Detektion	Biotinylated α-mouse IL-12	BD Pharmingen, Heidelberg	500 µg/ml	0,3 µg/ml
Enzym	AMDEX™ streptavidin-HPR	Amersham Biosciences, Freiburg	1000 µg/ml	0,2 µg/ml
Standard	Recombinant mouse-IL-12	BD Pharmingen, Heidelberg	1 µg/ml	10 ng/ml

**Tab. 2.9: Verwendete ELISA-Systeme.**

### 2.3.3 Durchführung

Zunächst wurde der jeweilige *capture*-Antikörper in der gewünschten Konzentration in 6 ml PBS verdünnt und 50 µl/well in eine MaxiSorp NUNC Platte (Nunc™ Brand Products, Wiesbaden) pipettiert. Es folgte eine Inkubation bei 4°C über Nacht bzw. bei 37°C für 2 h. Die Platte wurde darauf dreimal mit PBS/Tween im ELISA-Washer gewaschen, der Waschpuffer verworfen und 200 µl/well *blocking*-Puffer zugegeben. Nach einstündiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Platte wiederum dreimal gewaschen. Danach wurden die zu untersuchenden Kulturüberstände in einer für jeden ELISA spezifischen Verdünnung aufgetragen (50 µl/well). Gleichzeitig wurde der Standard pipettiert. Dafür wurde die maximale Konzentration des Standards durch Verdünnung mit Detektionspuffer eingestellt und mindestens acht 1:2 Verdünnungsstufen hergestellt. Es wurden zwei Standardreihen (Doppelbestimmung) mit 50 µl/well pipettiert. Die Platten wurden 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach einem weiteren Waschschrift erfolgte die Zugabe des Detektionsantikörpers, der entsprechend der gewünschten Verdünnung im Detektionspuffer aufgenommen wurde. Die Inkubation des Detektionsantikörpers erfolgte bei Raumtemperatur für 1-2 h. Nach erneutem dreimaligen Waschen wurden 50 µl/well HRP-Konjugat in entsprechender Konzentration aufgetragen und für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach sechsmaligem Waschen erfolgte die Entwicklung des ELISAs mit Hilfe des Substrats OPD (Sigma Fast™ o-Phenylendiamine Dihydrochloride Tablet Sets, Sigma-Aldrich, Taufkirchen). Die gelieferten Tabletten wurden nach Angabe des Herstellers in Milli-Q-Wasser gelöst

und 50 µl/well der Lösung wurden auf die Platte aufgetragen. Die enzymatische Reaktion wurde nach etwa 10-20 minütiger, abgedunkelter Inkubation bei Raumtemperatur mit 0,2 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> abgestoppt (17 µl/well). Die Platte wurde mit einem ELISA-Reader mittels des Programms SOFT Max® PRO bei OD490/650 nm eingelesen und ausgewertet.

#### Verwendete Puffer und Lösungen:

Coating-Puffer: PBS

Waschpuffer: PBS, 1% Tween20

Blocking-Puffer: PBS, 1% BSA

Detektionspuffer: PBS, 7% FCS

Verdünnung der Proben: PBS, 7% FCS

## **2.4 Durchflusszytometrie**

### **2.4.1 Prinzip der Durchflusszytometrie**

Mit einer FACS-Analyse (*Fluorescence Activated Cell Sorter*) kann man einzelne Zellen ihrer Fluoreszenz entsprechend sichtbar machen. Dafür werden die Zellen mit fluoreszierenden Antikörpern gegen ein bestimmtes Oberflächenantigen markiert und in einem laminaren Flüssigkeitsstrom einzeln hintereinander durch einen Laserstrahl geführt. Dabei werden die Fluorochrome zur Emission von Fluoreszenzlicht angeregt und zelluläre Eigenschaften der Probe wie Zellgröße, Form und Granularität führen zu einer zusätzlichen Lichtstreuung. Das in einem geringen Winkel (3-10°) gestreute Licht wird als Vorwärtsstreulicht (*forward scatter*, FSC) bezeichnet und gibt im Wesentlichen die Zellgröße wieder. Das um 90° reflektierte Licht wird als Seitwärtsstreulicht (*sideward scatter*, SSC) und wird durch die intrazelluläre Granularität bestimmt.

Das emittierte Fluoreszenzlicht von der Oberflächenmarkierung der Zellen wird in einer Linse gesammelt, durch Filter nach Wellenlängenbereichen aufgeteilt und an verschiedene Detektoren weitergeleitet. So können mehrere verschiedene Fluoreszenzfarbstoffe gleichzeitig bei einer Mehrfachfärbung gemessen werden. Die Auftrennung der verschiedenen Fluoreszenzen gelingt allerdings nicht vollständig, da sich Spektren der eingesetzten Farbstoffe zum Teil überschneiden. Diese Überschneidung kann durch die sogenannte Kompensation korrigiert werden.

Die durchflusszytometrischen Analysen wurden mit einem FACSCalibur (BD, Heidelberg) durchgeführt. Die Anregung der Fluoreszenz erfolgte dabei durch einen 488 nm Argonlaser und einen 635 nm Dioden-Laser. Die Absorptions- und Emissionsmaxima der verwendeten Fluorochrome sind der Tabelle 2.10 zu entnehmen. Die Messdaten wurden mit der CellQuest Pro-Software (BD, Heidelberg) ausgewertet und als zweidimensionale Punktdiagramme (*dot plots*) oder eindimensionale Histogramme dargestellt. In den *dot plots* repräsentiert jeder Punkt eine Zelle. Durch das Setzen von Analysenfenstern (*gaten*) kann die Expressionsanalyse auf bestimmte Zellpopulationen beschränkt werden.

Fluoreszenzkanal	Fluorochrom	Absorptionsmaximum	Emissionsmaximum
FL1	FITC	495 nm	519 nm
FL2	PE	480/565 nm	578 nm
FL3	PI	536 nm	617 nm
FL4	APC	650 nm	660 nm

Tab. 2.10: Absorptions- und Emissionswellenlängen der verwendeten Fluorochrome

#### 2.4.2 Analyse der eGFP-Expression

Für die Analyse der eGFP-Expression (*enhanced green fluorescent protein*) wurden die Zellen abgelöst, in 200 µl MACS-Puffer aufgenommen und im FL1-Kanal des FACSCalibur analysiert.

##### MACS-Puffer:

2 mM EDTA, 3% FCS in PBS

#### 2.4.3 Färbung und Analyse von Oberflächenantigenen

Die zur Färbung eingesetzten Antikörper sind in der Tabelle 2.11 aufgeführt:

Spezifität	Konjugiertes Fluorochrom	Konzentration der Stammlösung	Hersteller
anti-Maus CD11b	FITC	500 µg/ml	BD Pharmigen, Heidelberg
anti-Maus CD11c	APC		
anti-Maus CD40	PE		
anti-Maus CD45R (B220)	APC		
anti-Maus CD45R (B220)	FITC		
anti-Maus CD45RA	PE		
anti-Maus CD62L	FITC		
anti-Maus CD69	FITC		

**Tab. 2.11: Verwendete Antikörper zur Markierung von Oberflächenantigenen**

#### 2.4.3.1 Färbung zur Phänotyp-Bestimmung der Flt3-L DZ

Zur Phänotyp-Bestimmung der Flt3-L DZ wurden vier Mehrfachfärbungen durchgeführt (s. Tabelle 2.12) und die Zellen im Vergleich zu ungefärbten Zellen im FACS analysiert. APC- und PE-konjugierte Antikörper wurden dabei jeweils 1:200 verdünnt eingesetzt (Endkonzentration 2,5 µg/ml), FITC-markierte Antikörper 1:100 verdünnt (Endkonzentration 5 µg/ml). Die Verdünnung der Antikörper erfolgte im MACS-Puffer.

Je Färbung wurden  $5 \times 10^5$  Zellen aus der Kultur entnommen, zentrifugiert (5 min, 8000 rpm, RT) und der Kulturüberstand verworfen. Das Zellpellet wurde mit 1 ml MACS-Puffer gewaschen, erneut zentrifugiert (5 min, 8000 rpm, RT) und der Überstand abgehoben. Die Zellen wurden darauf in 20 µl der entsprechenden Färbelösung gut resuspendiert und 30 min auf Eis im Dunkeln inkubiert. Alle weiteren Arbeitsschritte wurden abgedunkelt durchgeführt. Nicht gebundene Antikörper wurden durch Waschen mit 1 ml MACS-Puffer entfernt. Nach Zentrifugation (5 min, 8000 rpm, RT) und Verwerfen des Überstands wurden die Zellen in 300 µl MACS-Propidiumiodid (MACS-PI) aufgenommen und zur Messung in 5 ml Polystyrol-Rundboden-Röhrchen (BD Falcon™, Heidelberg) überführt. Propidiumiodid wurde zur Färbung toter Zellen eingesetzt. Der Farbstoff dringt durch die löchrige Zellmembran toter Zellen ein und interkaliert in die DNA. Bis zur Messung wurden die Proben im Dunkeln auf Eis gelagert.

<b>Färbung</b>	<b>Verwendete Antikörper</b>
Färbung 1	anti-Maus CD45RA-PE, anti-Maus CD11c-APC FITC
Färbung 2	anti-Maus CD45RA-PE, anti-Maus CD11c-APC, anti-Maus CD45R-FITC
Färbung 3	anti-Maus CD45RA-PE, anti-Maus CD11c-APC, anti-Maus CD11b-FITC
Färbung 4	anti-Maus CD45RA-PE, anti-Maus CD11c-APC, anti-Maus CD62L-FITC

**Tab. 2.12: Färbungen zur Phänotyp-Bestimmung der Flt3-L DZ**

### MACS-PI

MACS-Puffer, 500 ng/ml Propidiumiodid

#### 2.4.3.2 Färbung muriner Flt3-L DZ nach Stimulation

Stimulierte murine Flt3-L DZ wurden hinsichtlich der Expression der Aktivierungsmarker CD40 und CD69 untersucht. Dazu wurde eine Dreifachfärbung mit folgenden Antikörpern durchgeführt: anti-Maus CD45R-APC, anti-Maus CD40-PE, anti-Maus CD69-FITC.

Nach Abnahme der Kulturüberstände wurden die Zellen in den 96-well Rundbodenplatten in 50 µl MACS-Puffer je well resuspendiert, die Doppelbestimmungen gepoolt und die Zellen in eine unsterile Spitzbodenplatte überführt. Die Platten wurden zentrifugiert (4 min, 4000 rpm, 4°C), die Überstände verworfen und die Zellen in 20 µl Färbelösung je well aufgenommen. Es folgte eine Inkubation auf Eis für 30 min. Danach wurden als Waschschrift je well 180 µl MACS-Puffer zugegeben, die Platten zentrifugiert (4 min, 4000 rpm, 4°C) und die Überstände abgehoben. Die Zellen wurden in 200 µl MACS-PI je well aufgenommen, in Messröhrchen überführt und bis zur Messung abgedunkelt auf Eis gelagert.

## **2.5 Reverse Transkription-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR)**

### **2.5.1 Das Prinzip der RT-PCR und allgemeine Arbeitspraktiken**

Bei einer RT-PCT wird aus einer beliebigen RNA zuerst mit Hilfe einer Reversen

Transkriptase (RT) komplementäre DNA (cDNA) synthetisiert und diese anschließend als Template für eine PCR verwendet.

Bei der Arbeit mit RNA ist wegen des ubiquitären Vorkommens der RNasen folgendes zu beachten: Es sind unbedingt Handschuhe zu tragen, Pipettenspitzen, Tubes und andere Materialien sollten nur mit Handschuhen angefaßt werden. Für die Herstellung von Lösungen sollte DEPC-Wasser und RNase-freie Chemikalien verwendet werden.

Zur Herstellung von DEPC-Wasser versetzt man Wasser mit 1/200 Vol Diethylpyrocarbonat (DEPC), mischt, inkubiert über Nacht und autoklaviert anschließend. Das DEPC zerfällt beim Erhitzen zu CO<sub>2</sub> und Ethanol.

### 2.5.2 Herstellung der cDNA

Für die Herstellung der cDNA wurde folgendes Protokoll verwendet: 2-5 µg RNA und 1 µg *Random Primer* (1 µg/µl, Promega, Mannheim) wurden gemischt und zunächst 10 Minuten bei 65°C und dann für 2 Minuten auf Eis inkubiert. Dabei werden die Sekundärstrukturen der RNA aufgeschmolzen und Primer-Dekamere und die RNA aneinandergelagert. Weiterhin wurde in jedes Tube folgendes pipettiert: 1µl M-MLV RT H(-) point mutant (200u/ml, Promega, Mannheim), 4 µl 5x Reaktionspuffer (der RT beiliegend, Promega, Mannheim) und 1µl 10 mM dNTP-Mix. Die Reaktion wurde mit RNase-freiem Wasser auf 20 µl aufgefüllt und in einem Thermocycler bei 45°C für 50 min inkubiert. Zum Abstoppen kann die Reaktion für 5 min auf 95°C erhitzt werden.

### 2.5.3 Real Time Quantitative PCR

Mit Hilfe der quantitativen PCR wurde die Expression von Toll-like Rezeptoren in verschiedenen Zelltypen untersucht. Zusätzlich wurde auch die Expression von β-Aktin untersucht, um die unterschiedlichen Proben vergleichen zu können.

#### 2.5.3.1 Das Prinzip der Real Time quantitativen PCR

Bei einer *real-time* quantitativen PCR wird während eines PCR-Laufs die Menge an entstehendem PCR-Produkt gemessen. Dafür wird zu einer PCR-Reaktion der Farbstoff *SYBR Green* dazugegeben, dessen Emission stark ansteigt, wenn er in die

doppelsträngige DNA einlagert. Diese Emission kann von einem Detektor gemessen werden. SYBR Green bindet an jegliche doppelsträngige DNA, so sollte nach der PCR das entstandene Produkt überprüft werden.

### 2.5.3.2 Praktische Durchführung

Quantitative RT-PCR wurde in dem ABI Prism 7700 Thermocycler durchgeführt. Für einen 25 µl Ansatz wurden 12,5 µl Power SYBR Green PCR MasterMix (AppliedBiosystems, Foster City, USA), je 1,25 µl 20 mM Primer, 1µl cDNA-Probe und 9 µl Wasser pipettiert. Als Negativkontrolle wurde Reaktionen ohne Zugabe von cDNA angesetzt. Die PCR lief mit folgendem Programm:

1. 1 min bei 95°C
2. 15 sec bei 94°C  
30 sec bei 60°C  
1 min bei 72°C, der Zyklus wurde 40 Mal wiederholt
3. abkühlen auf 4°C

Die Sequenzen der verwendeten Primer sind in der Tab. 2.13 aufgeführt.

Name	Sequenz
mtlr7for	5'-CTCCTCCACCAGACCTCTTG-3'
mtlr7rev	5'-TGCTTGTCTGTGCAGTCCAC-3'
mtlr8for	5'-CAGAGTTGGATGTTAAGAGAG-3'
mtlr8rev	5'-CATGCAGTTGACGATGGTTGC-3'
mtlr9for	5'-ATTCTCTGCCGCCAGTTT-3'
mtlr9rev	5'-CGGAGAACCATGTTGGGAGAT-3'
mβAktinvor	5'-ACAGTGTGGGTGACCCCGTC-3'
mβAktinrev	5'-CCCTGTGCTGCTCACCGAG-3'

**Tab. 2.13: Sequenzen der für die quantitative PCR verwendeten Primer.**

### 2.5.3.3 Quantifizierung der Proben

Nach einem Lauf wird für jede Probe die Fluoreszenzintensität im Laufe der PCR-Reaktion dargestellt. Für die Quantifizierung muss zunächst durch alle Proben gleich eine Schwellenlinie gesetzt werden, die im exponentiellen Bereich der PCR-

Amplifikation liegt, wobei die Werte für die Wasserkontrollen die Schwellenlinie nicht übersteigen sollten. Der Schnittpunkt der Fluoreszenzintensität jeder Probe mit dieser Schwellenlinie, die sogenannte Zykluszahl  $C_t$ , wird für weitere Berechnungen verwendet.

Da kein Standard verwendet wurde, können nur relative Werte (F, relative Expression) ermittelt werden. Allerdings werden alle Proben auf die  $\beta$ -Aktin-Expression angepasst. Die Berechnung erfolgt mit Hilfe folgender Formeln:

$$\Delta C_t = C_t(\text{gene of interest}) - C_t(\beta\text{-Aktin})$$

$$F(\text{relative Expression}) = 2^{-\Delta C_t}$$

## 2.6 Transfektion der Zellen mittels Elektroporation

### 2.6.1 Das Prinzip der Transfektion durch Elektroporation

Das Benutzen der Hochspannungselektroschocks für die Transfektion der DNA in die Zellen wurde zuerst von Wong und Neumann für die Fibroblasten beschrieben (Neumann et al., 1982; Wong and Neumann, 1982). Die Elektroporation macht von der Tatsache Gebrauch, dass eine Zellmembran für den elektrischen Strom außer an den Ionenkanälen nicht durchlässig ist. Werden Zellen in ein elektrisches Feld hoher Spannung gebracht, bilden sich in der Membran Poren, durch die Makromoleküle wie DNA, aber auch kleine Moleküle wie ATP, in die Zelle eindringen können. Die Poren schließen sich automatisch, wobei der Prozeß bei 0°C verzögert wird. Für die stabile Transformation benutzt man eher lineare DNA, die *supercoiled* DNA wird leichter in Chromatin eingepackt, und ist für die transiente Genexpression effektiver.

Die Apparatur funktioniert folgendermaßen: Der Kondensator wird bis zur gewählten Spannung aufgeladen und entlädt sich durch die Zell-DNA-Suspension. Da der Stromfluß von dem Widerstand der Probe abhängt, kann die Dauer der Entladung und auch die Effektivität der Transfektion variieren. Dieser Umstand wird durch die sogenannte Zeitkonstante  $\tau$  beschrieben, die durch folgende Formel definiert ist:

$\tau = R \times C$ , wobei C Kapazität in Farad (F) und R Widerstand in Ohm ( $\Omega$ ) ist. Die Zeitkonstante wird in Millisekunden (msec) gemessen und ist genau die Zeit, die benötigt wird, bis sich die geladene Spannung auf 37% reduziert hat. Erfahrungsgemäß sollte die Zeitkonstante bei der Transfektion der Säugetierzellen zwischen 27 und 35 msec liegen.

### 2.6.2 Elektroporation der HEK293

Je  $3 \times 10^6$  Zellen pro Ansatz wurden geerntet, in je 400  $\mu\text{l}$  Elektroporationsmedium aufgenommen. und in die Elektroporationsküvetten (Biozym, Oldendorf, Österreich) pipettiert. Dazu wurden DNA hinzugefügt und die Suspension gemischt. Es wurden folgende Mengen eingesetzt: Die Gesamtmenge der DNA sollte 15  $\mu\text{g}$  betragen, davon 2  $\mu\text{g}$  eGFP-Vektor, 1 bis 4  $\mu\text{g}$  siRNA 10  $\mu\text{g}$  und entsprechend auf 15  $\mu\text{g}$  pcDNA3.1(-)-Leervektor (Invitrogen). Danach wurden die Küvetten in die Elektroporationsapparatur gestellt und bei 1000  $\mu\text{F}$  und 200 V einmal geschockt. Dann wurden die Zellen in 10 ml Medium resuspendiert, ausplattiert und für 24 bis 48 Stunden wachsen gelassen.

#### Elektroporationspuffer:

75% RPMI-1640, 25% FCS

### 2.6.3 Elektroporation der primären Zellen

Für die Elektroporation der mit M-CSF und Flt3L kultivierten Zellen wurden Amaxa (Köln) *mouse macrophages nucleofector kit* und *mouse T-cell nucleofector kit* verwendet. Die Elektroporation erfolgte nach Angaben des Herstellers mit Hilfe des Amaxa Nukleofectors.

## 2.7 siRNA

### 2.7.1 *Annealing* der siRNA-Oligonukleotide

Die 21 bp langen Einzelstränge (siehe 2.1.3) wurden von CureVac (Tübingen) bezogen. Davon wurden je 50  $\mu\text{g}$  in 150  $\mu\text{l}$  10 mM TrisHCl, 20 mM NaCl (pH 7,0) gemischt und auf PCR-Gefäße aufgeteilt. Das Annealing erfolgte in einer PCR-Maschine nach folgendem Programm: 7 min 95°C, von 95°C bis 25°C abkühlen lassen in 210 Zyklen mit 0,3°C Temperaturabfall pro Zyklus. Dann wurde die siRNA vereinigt, ausgefällt, gewaschen und in Wasser gelöst.

### 2.7.2 Gelelektrophorese der siRNA

Zur Visualisierung wurden die RNA-Proben auf einem 8% Polyacrylgel aufgetrennt. Der Lauf erfolgte in einem TBE-Puffer bei 5 V/cm für etwa 30 min. Anschließend wurde das Gel für 15 min im Ethidiumbromidbad gefärbt.

#### Puffer:

10xTBE-Puffer: 108 g TrisOH, 55g Borsäure, 40 ml 0,5 M EDTA auf 1l Wasser, pH8,0

1xTAE-Puffer: 4 µM Tris-Acetat, 1 µM EDTA

#### Polyacrylamidgel:

1 ml 40 % Acrylamid, 4 ml 1x TAE-Puffer, 3 µl TEMED, 25 µl 10% APS-Lösung

## 2.8 Mäuse

Zellkulturen wurden aus dem Knochenmark von C57BL/6-Mäusen (WT) und Tlr-knockout-Mäusen generiert. C57BL/6 Mäuse wurden von Harlan, Borchon bezogen. Tlr-ko-Mäuse wurden von S. Akira erhalten Sie wurden in seinem Labor in CV129-Mäusen hergestellt und 5 Mal auf C57BL/6-*Background* zurückgekreuzt.

Für die Immunisierungsexperimente wurde mit C57BL/6- und BALB/c-Mäusen (Harlan, Borchon) gearbeitet.

### 2.8.1 Genotypisierung der Tlr-*knockout*-Mäusen

#### 2.8.1.1 Isolierung der DNA aus Mausschwanzspitzen

Die Genotypisierung von Mäusen wurde von S. Konold nach folgendem Protokoll durchgeführt. Mäuseschwanzspitzen wurden in 500 µl TNE-Puffer, 1% SDS und 100 µg Proteinase K für 16 h bei 37°C inkubiert. Nach einem Zentrifugationsschritt wurde der Überstand in ein neues Gefäß überführt, mit 500 µl PCI-Lösung gemischt, zentrifugiert und die obere wässrige Phase abgenommen. Diese wurde dann mit 500 µl Chloroform ausgeschüttet, die obere Phase abgenommen, die dann mit 500 µl Isopropanol versetzt, gemischt und bei 4°C abzentrifugiert wurde. Das DNA-Pellet wurde mit 70% Ethanol gewaschen und in 200 µl Wasser aufgenommen.

Puffer und Lösungen:

TNE-Puffer: 10 mM Tris-OH, pH 8.0, 1 mM EDTA

PCI-Lösung: 24,5 ml Phenol, 24,5 ml Chloroform, 1 ml Isoamylalkohol

2.8.1.2 Genotypisierung-PCR

Für den Nachweis der Wildtyp-DNA wurde folgende Primer-Kombinationen benutzt (Sequenzen siehe Tab. 2.14): **WT-Tlr3**: Tlr3a + Tlr3b, **WT-Tlr7**: Tlr7wt + Tlr7extra, **Wt-Tlr9**: Tlr9a + Tlr9b. Für den Nachweis der KO-Formen wurden Primer kombiniert: **Tlr3-ko**: Tlr3b + Tlr3/7neo1500, **Tlr7-ko**: Tlr7extra + Tlr3/7neo1500, **Tlr9-ko**: Tlr9b + Myd-c.

Die PCR für Tlr3 und Tlr7 lief mit folgendem Programm:

1. 1 min bei 95°C
2. 30 sec bei 94°C  
60 sec bei 58°C  
1,5 min bei 72°C, der Zyklus wurde 35 Mal wiederholt
3. 5 min bei 72°C, abkühlen auf 4°C

Tlr9-PCR-Program lief folgendermassen:

1. 1 min bei 95°C
2. 30 sec bei 94°C  
1 min 30 sec bei 67°C  
1 min bei 74°C, der Zyklus wurde 30 Mal wiederholt
3. 8 min bei 74°C, abkühlen auf 4°C

Name	Sequenz
Tlr9a	5'-GAAGGTTCTGGGCTCAATGGTCATGTG-3
Tlr9b	5'-GCAATGGAAAGGACTGTCCAGTTTGTG-3
Myd-c	5'-ATCGCCTTCTATCGCCTTCTTGACGAG-3
Tlr3a	5'-CCAGAGCCTGGCTAAGTTATTGTGCTG-3
Tlr3b	5'-TCCAGACAATTGGCAAGTTATTCGCCC-3
Tlr7wt	5'-ACGTGATTGTGGCGGTCAGAGGATAAC-3
Tlr7extra	5'-CCAGATACATCGCCTACCTACTAGACC-3
Tlr3/7neo1500	5'-ATCGCCTTCTATCGCCTTCTTGACGAG-3

**Tab. 2.14: Sequenzen der für die Genotypisierung verwendeten Primer.**

## 2.8.2 Immunisierungsexperimente

Für die Immunisierungsexperimente, die unter der Tierversuchsnummer: 209.1/211-2531-86/04 genehmigt sind, wurden Hühnereiovalbumin (Ova, Sigma-Aldrich, München) als Antigen und RNA40PD und ODN1668 als Adjuvantien verwendet. Ovalbumin bietet sich als Antigen an, da es MHC-Tetramere gegen Ovalbumin-spezifische zytotoxische T-Zellen zu erwerben gibt und diese so detektiert werden können. In dieser Arbeit wurden MHC-Tetramere gegen das Ova-Peptid SIINFEKL benutzt.

### 2.8.2.1 Vorbereitung der Injektionen

Versuchstiere wurden in Gruppen von 2 bis 3 Mäusen mit folgenden Reagentien gespritzt:

1. Liposomenpuffer, je 100 µl/Maus
2. 200 µg Ovalbumin und 30 µg DOTAP in gesamt 100 µl Liposomenpuffer je Maus,
3. 200 µg Ovalbumin, 30 µg DOTAP und 100 µg RNA40 in gesamt 100 µl Liposomenpuffer je Maus,
4. 200 µg Ovalbumin und 10 nMol ODN1668 in gesamt 100 µl Liposomenpuffer je Maus

### Lösungen:

Ovalbumin: 5 mg/ml in Liposomenpuffer (siehe 2.2.5.1)

RNA: 1 µM = 6,3 µg/ml in Liposomenpuffer

ODN1668: 1 mM in Wasser

### 2.8.2.2 Injektion der Mäuse

Die Mäuse wurden am Schwanzansatz subcutan injiziert.

### 2.8.2.3 MHC-Tetramerfärbung

T-Zellen erkennen Antigen-Fragmente (Epitope) über MHC Moleküle. Einzelne MHC/Epitop Komplexe werden nur schwach von spezifischen T-Zell-Rezeptoren gebunden und dissoziieren schnell von der Oberfläche. Durch Multimerisierung, z.B.

zu MHC-Tetrameren, kann diese Bindung stabilisiert werden. Mit solchen Reagenzien können antigenspezifische T-Zellen direkt sichtbar gemacht werden. Für die MHC-Tetramerfärbung wurde den Mäusen Blut aus der Schwanzvene entnommen, abzentrifugiert und das Serum für Ova-ELISA aufbewahrt. Nach der Erythrozyten-Lyse wurden die Zellen in eine 96-well-V-Boden-Platte überführt, worauf sich eine Tot-Lebendfärbung mit EMA anschloß. Dafür wurden die Zellen in je 30 µl 0,1% EMA-Lösung resuspendiert und für 20 min auf Eis inkubiert. Diese Inkubation erfolgt unter einer hellen Lampe, weil das EMA-Reagenz zur Aktivierung Licht braucht. Nach dem zweimaligen Waschen wurden die Zellen zunächst für etwa 20 min mit je 25 µl SIINFEKL-MHC-Tetramer-PE-Lösung inkubiert, und dann für weitere 30 min mit zusätzlich je 25 µl CD8-APC/CD62L-FITC-Lösung gefärbt. Die gefärbten Zellen wurden in 2% PFA-Lösung fixiert und in einem FACSCalibur gemessen.

Lösungen wurden in MACS-Puffer angesetzt (2.4.2)

Erythrozytenlyse: 2 ml *Red blood cell lysing buffer* (Sigma-Aldrich, Taufkirchen) für 5 min

EMA-Lösung: 0,1% EMA (BD Biosciences, Heidelberg), 10 µg/ml Fc-Block (EBioscience, NatuTec GmbH, Frankfurt)

CD8-APC (1:200, Caltag, Hamburg)

CD62L-FITC (1:100, BD Biosciences, Heidelberg)

SIINFEKL-MHC-Tetramer-PE (1:25, freundliche Gabe von Prof. Dr. med. Dirk Busch)

#### 2.8.2.4 *In vivo kill-Assay*

Mit Hilfe von einem *in vivo kill-Assay* kann das Vorhandensein und die Aktivität der antigenspezifischen zytotoxischen T-Zellen gezeigt werden. Im Prinzip läuft der Versuch folgendermaßen ab: Zwei gleich große Gruppen an syngenen Milzzellen werden unterschiedlich stark mit CFSE gefärbt, ein Teil dann mit SIINFEKL-Peptid beladen und intravenös in die Maus injiziert. Hat die Maus Ova-spezifische zytotoxische T-Zellen, wird die Gruppe, die Ova auf der Oberfläche trägt, im Vergleich zu der nicht-Ova-beladenen-Splenozytengruppe reduziert. Sind Mäuse z. B. mit ODN1668 als Adjuvanz immunisiert worden, werden die Ova-beladenen Zellen nach 20 h beinahe vollständig eliminiert.

Praktisch werden pro zwölf Mäuse zehn syngene Milzen benötigt. Die Milzenzellen wurden durch ein Zellsieb vereinzelt, die Zellsuspension wurde abzentrifugiert und dann die Erythrozyten lysiert. Die Milzzellen wurden dann in zwei gleich große Gruppen geteilt, mit FCS-freiem Medium gewaschen, und mit 5 bzw. 0,5 mM CFSE in 1 ml FCS-freies Medium bei 37°C im Wasserbad gefärbt. Die Färbung wurde nach 10 min durch Zugabe von Vollmedium unterbrochen und die Zellen 2 x mit Vollmedium gewaschen. Danach wurde die 5 mM-CFSE-Gruppe mit 1 µM SIINFEKL (in 1 ml Vollmedium) bei 37°C im Wasserbad 30 min inkubiert. Beide Gruppen wurden 3 x mit PBS gewaschen, sorgfältig gezählt, und 1:1 gemischt. Pro Maus sollten intravenös 30-40x10<sup>6</sup> in je 100 µl PBS Zellen gespritzt werden.

#### 2.8.2.5 Intrazelluläre Färbung der Zytokine

Für die intrazelluläre Färbung der Zytokine wurde BD *Cytofix/Cytoperm Plus Kit with BD Golgi Plug* (BD Pharmingen, Heidelberg) verwendet.

Sieben bis zehn Tage nach der zweiten Injektion werden Milzen herausgenommen, die Zellen durch ein Zellsieb vereinzelt und die Erythrozyten lysiert. Je 2 wells mit 1x10<sup>7</sup> Zellen/ml pro Maus wurden ausgesät und mit entweder 1 µM SIINKEKL oder entsprechend viel DMSO für fünf Stunden stimuliert. Nach zwei Stunden wurden je 2 µl Golgi Plug /1 ml Medium dazugegeben und für weitere 3 Stunden inkubiert. Golgi Plug verhindert die Sekretion von neu synthetisierten Zytokinen.

Nach der Inkubation wurden die Zellen auf drei wells einer 96-well-V-Boden-Platte aufgeteilt und zuerst mit EMA eine Tod-Lebendfärbung durchgeführt. Dafür wurden die Zellen in je 30 µl 0,1% EMA-Lösung resuspendiert und für 20 min auf Eis unter einer hellen Lampe inkubiert. Alle weiteren Schritte erfolgten im Dunkeln. Nach dem zweimaligen Waschen wurden die Zellen für 30 min mit je 30 µl CD8-APC/CD62L-PE-Lösung gefärbt.

Nach dieser Oberflächenfärbung wurden die Zellen permeabilisiert und fixiert. Dafür wurden sie zuerst mit 100 µl/well *Cytofix/Cytoperm* für 20 min inkubiert und dann mit dem Kit beiliegendem *Permwash* 2 x gewaschen. Daran schloss sich die intrazelluläre Zytokinfärbung an. FITC-markierte anti-IFN- $\gamma$ , anti-TNF- $\alpha$  und die Isotypkontrolle (alles BD Pharmingen) wurden dafür 1:500 mit *Permwash* verdünnt, und davon je 50 µl/well auf die Zellen gegeben. Nach einer 30 min Inkubation auf Eis wurden die Zellen 2 x mit *Permwash* und einmal mit MACS-Puffer gewaschen und für die Analyse in Röhrchen überführt.

Lösungen

MACS-Puffer siehe 2.4.2

Erythrozytenlyse: siehe 2.8.2.3

EMA-Lösung: siehe 2.8.2.3

CD8-APC (1:200, Caltag, Hamburg)

CD62L-FITC (1:100, BD Biosciences, Heidelberg)

anti-IFN- $\gamma$ -FITC, anti-TNF- $\alpha$ -FITC und die Isotypkontrolle-FITC (1:500, BD Pharmigen, Heidelberg)

2.8.2.6 ELISA gegen Ovalbuminspezifische Antikörper

Das allgemeine Prinzip des ELISA wurde im Punkt 2.3 vorgestellt. Die Durchführung, Pufferzusammensetzung und Inkubationszeiten können dem Punkt 2.3.3 entnommen werden. Um Ovalbuminspezifische Antikörper zu detektieren muß allerdings das *coating* mit 0,1 mg/ml Ovalbumin erfolgen. Die Seren wurden vor dem Auftragen 1:100.000 in Detektionspuffer verdünnt. Für die Detektion wurden die in der Tabelle 2.15 aufgeführten Antikörper verwendet.

Detektionsantikörper	Isotyp des Ova-spezifischen AK	Firma, Firmensitz
Biotin-SP-conjugated Affinipure goat anti-Maus IgG	Gesamt-IgG	Jackson ImmunoResearch, Hamburg
Biotin anti Maus IgG1	IgG1	Pharmigen, Heidelberg
Biotin anti Maus IgG2a	IgG2a	Pharmigen, Heidelberg

**Tab. 2.15:** Für die Detektion der ovalbuminspezifischen Antikörper verwendete Detektionsantikörper.

2.8.2.7 Listerieninfektion der immunisierten Mäuse

Drei Wochen nach der zweiten Injektion wurden die immunisierten Mäuse mit  $4 \times 10^4$  Ova-exprimierenden Bakterien der Art *Listeria monocytogenes* pro Maus intravenös injiziert. Am Tag drei nach der Injektion wurden Milz und Leber entnommen, die Zellen wurden durch ein Zellsieb vereinzelt und die Zellen in je 5 ml PBS resuspendiert. Davon wurden Verdünnungen in 3 Stufen (1:5000, 1:50000,

1:500000) hergestellt und ausplattiert. Dafür wurde die Zellsuspension entsprechend mit einer 0,1% Tritonlösung gemischt und davon je 10 µl auf BHI -Platten ausgesäht. Die Platten wurden für etwa 20 h bei 37°C inkubiert und ausgezählt.

BHI-Platten:

Brain Heart Infusion (BD Biosciences, Heidelberg) 37 g, 15 g Agar in 1 l Wasser.

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Eigenschaften von RNA als Adjuvans

Nachdem Heil et al. (2004) demonstrierten, dass einzelsträngige RNA immunstimulatorische Eigenschaften besitzt, untersuchten wir, ob RNA als Adjuvans bei Immunisierungen fungieren kann. Dafür führten wir einer Reihe Experimente durch, die die humorale und vor allem die zytotoxische Immunantwort nach der Impfung mit einem Modellantigen und RNA als Adjuvans untersuchten. Für die Injektionen wurde Hühnereiovalbumin (Ova) als Antigen und RNA40 als Adjuvans verwendet. RNA40 ist ein 20 bp langes Oligonukleotid (siehe 2.1.3), das zur Stabilisierung am 3'-Ende eine Phosphorothioat-Modifizierung besitzt. Bei dieser Modifikation wird ein Sauerstoff des Phosphat gegen ein Schwefelatom ausgetauscht, wodurch die Nukleaseresistenz wesentlich erhöht wird.

Je nach Experiment wurden C57BL/6- oder BALB/c-Mäuse subkutan am Schwanzansatz mit einem Gemisch aus dem Antigen und der mit DOTAP komplexierten RNA (siehe 2.2.5.1) injiziert (Ova+DO+RNA). Das kationische Lipid DOTAP bildet mit RNA Komplexe, die diese vor RNasen schützen und ihre Endozytose erleichtern.

Um die Ergebnisse der Impfungsexperimente zu kontrollieren, wurden außerdem drei weitere Gruppen immunisiert: Der ersten Gruppe wurde nur der Liposomenpuffer gespritzt (Kontrolle), Mäuse der zweiten Gruppe bekamen das Antigen und DOTAP in Liposomenpuffer gelöst (Ova+DO) injiziert und Mäuse der dritten Gruppe wurden mit Ova und CpG-DNA ODN1668 (siehe 2.1.3) als Adjuvans behandelt. Drei Wochen nach der ersten Injektion wurde bei allen vier Gruppen die Behandlung wiederholt (2. Injektion). Nach einer weiteren Woche wurden dann die zytotoxischen T-Zellen bezüglich der Menge und der Funktionalität untersucht und der Titer an Ova-spezifischen Antikörpern im Serum untersucht. Zusätzlich wurde das Milzgewicht bestimmt, um die Zeichen einer Splenomegalie, wie sie für CpG-DNA-Behandlung beschrieben wurde (Davila and Celis, 2000) feststellen zu können. Vier Wochen nach der zweiten Injektion wurde außerdem ein Experiment mit Ova-transgenen Listerien durchgeführt, um die durch die Impfung erworbene Immunität zu testen (Abb 3.1).

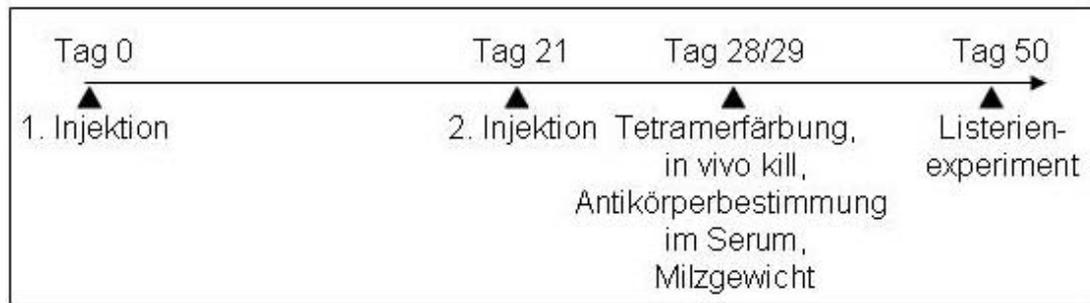
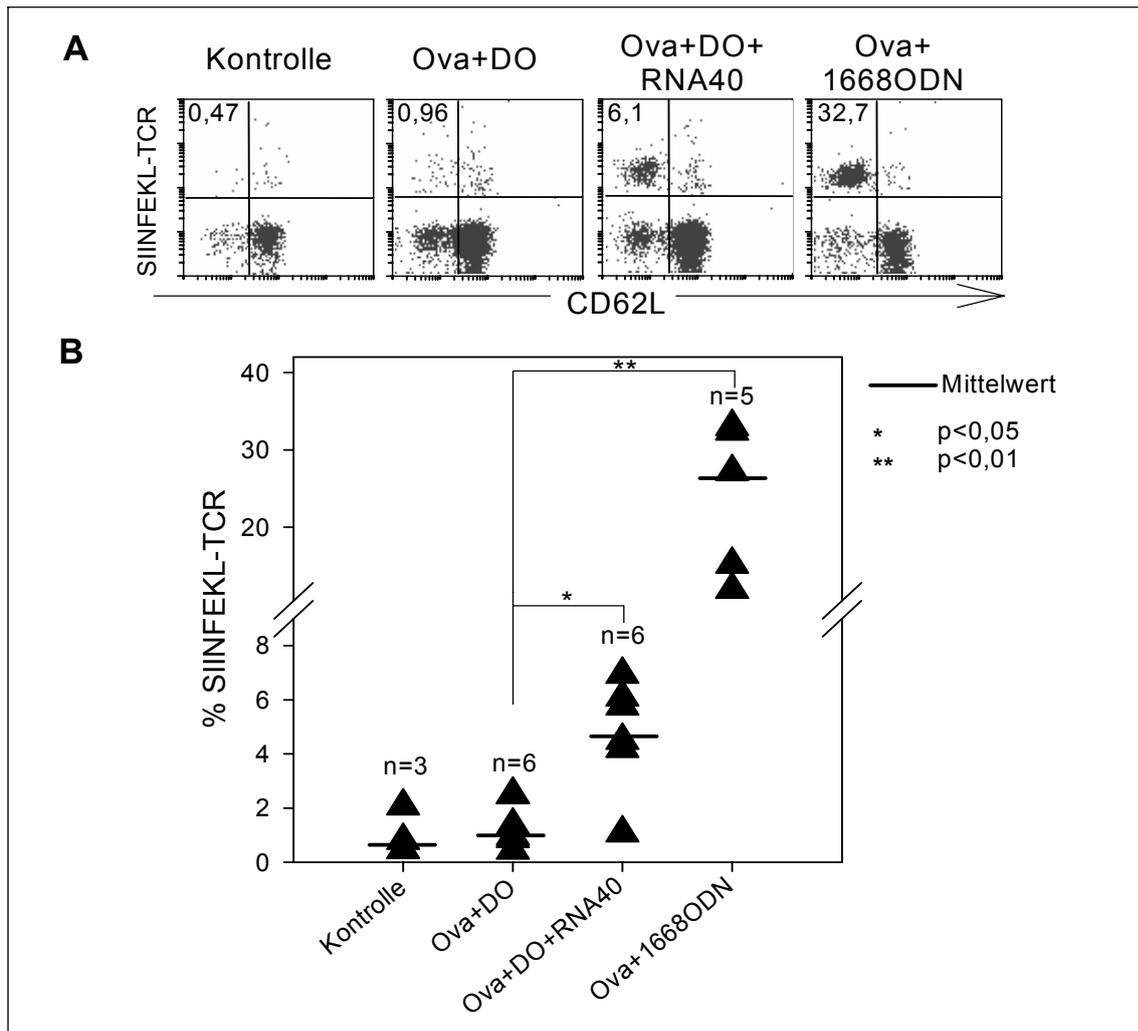


Abb. 3.1: Der zeitliche Ablauf der Experimente mit RNA als Adjuvans.

### 3.1.1 Impfung mit RNA als Adjuvans induziert eine zelluläre Immunantwort

Nach der Aktivierung durch T-Helferzellen und der Erkennung eines Fremdpeptides fahnden CD8-positive zytotoxische T-Zellen nach infizierten Körperzellen und zerstören sie. Die Erkennung dieser Zellen erfolgt über die Interaktion zwischen dem T-Zell-Rezeptor (TCR) auf der T-Zelle und einem Komplex aus dem fremden Peptid und MHC-Klasse-I-Molekül auf der Zielzelle. In C57BL/6-Mäusen ist das Peptid SIINFEKL aus Ovalbumin immundominant. Durch die Bindung von mit SIINFEKL beladenen MHC-Tetrameren an den T-Zell-Rezeptor (siehe 2.8.2.3) können spezifische T-Zellen markiert werden.

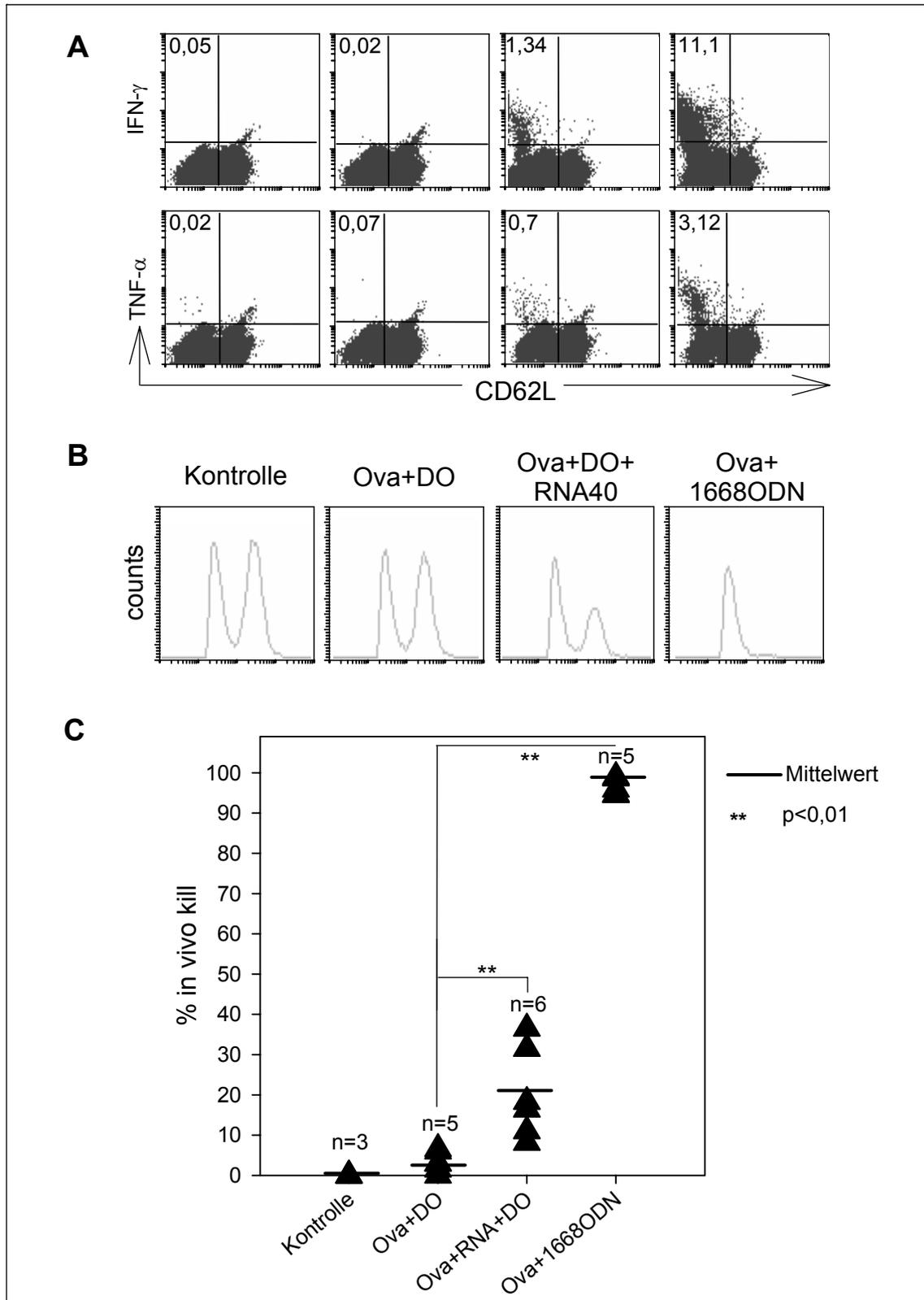
Um die spezifischen CD8-positiven Zellen sichtbar zu machen, wurde den Mäusen eine Woche nach der zweiten Injektion Blut entnommen und die Zellen für die FACS-Analyse gefärbt. In der Abbildung 3.2A ist diese Färbung exemplarisch für je eine Maus aus der Versuchsgruppe dargestellt. Die zytotoxischen T-Zellen sind CD8-positive, CD62L-negative, d. h. aktivierte Zellen, die einen SIINFEKL-spezifischen TCR-Rezeptor tragen. Im Durchschnitt waren im Blut der mit RNA behandelten Mäuse (Ova+DO+RNA) 4,7% aller CD8-positiven, aktivierten Zellen SIINFEKL-positiv. Diese Zahl ist mit  $p < 0,05$  signifikant höher als die Zahl der SIINFEKL-spezifischen CD8-T-Zellen in der Dotap-Kontrollgruppe (Ova+DO). Diese war mit 1,4% ähnlich hoch wie die Anzahl der positiven Zellen in der Kontrollgruppe ohne Antigen (Kontrolle, 1,1%). Da diese Kontrollgruppe kein Ovalbumin bekam, können die Mäuse keine SIINFEKL-spezifischen Zellen entwickelt haben. Der Wert 1,1% kommt also durch die unspezifische Bindung der MHC-Tetramere bei der Färbung zustande und sollte als Basalwert angenommen werden. In der Positiv-Kontrollgruppe der mit CpG-DNA behandelten Mäuse waren etwa 24% aller CD8-Zellen SIINFEKL-spezifisch (Abb. 3.2B).



**Abb. 3.2: Injektion mit RNA als Adjuvans induziert die Entstehung von funktionellen zytotoxischen T-Zellen.** Blutzellen wurden eine Woche nach der 2. Injektion isoliert und mit anti-CD8, anti-CD62L und anti-SIINFEKL-TCR (A, obere Reihe), oder anti-IFN- $\gamma$  (A, mittlere Reihe), bzw. anti-TNF- $\alpha$  (A, untere Reihe) gefärbt. B: Menge der SIINFEKL-spezifischen zytotoxischen T-Zellen in verschiedenen Gruppen. n gibt die Anzahl der Mäuse in einer Gruppe an.

Um die Funktionalität der zytotoxischen T-Zellen zu testen, wurde einerseits ein *in-vivo-kill*-Assay durchgeführt und andererseits intrazellulär die Produktion von Zytokinen nach einer SIINFEKL-Behandlung gemessen.

Für die intrazelluläre Zytokinfärbung wurden Milzzellen zunächst für fünf Stunden mit SIINFEKL-Peptid inkubiert, dann fixiert und mit anti-IFN- $\gamma$ - bzw. anti-TNF- $\alpha$ -Antikörpern gefärbt. Die Zellen aus den mit RNA behandelten Mäusen (Ova+DO+RNA) produzierten ebenso wie die Zellen aus den CpG-DNA behandelten Mäusen (Ova+1668ODN) IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$ , wobei die Zytokinproduktion entsprechend der Zahl der spezifischen zytotoxischen T-Zellen in der RNA-Gruppe niedriger als in der CpG-Gruppe war (Abb. 3.3A).



**Abb. 3.3: Zytotoxizität der T-Zellen.** Um die spezifische Zytotoxizität der T-Zellen festzustellen, wurde ein *in-vivo-kill* Assay durchgeführt. 20 Stunden nach der Injektion wurden Blut- und Milzzellen im FACS analysiert. A: exemplarische FACS-Analyse der verschiedenen Gruppen, B: zusammenfassende Darstellung der Zytotoxizität in verschiedenen experimentellen Gruppen. n gibt die Anzahl der Mäuse in einer Gruppe an.

Um die Funktionalität der durch die RNA-Behandlung generierten Zellen zusätzlich zu untermauern, wurde ein *in-vivo-kill*-Assay durchgeführt. Dafür wurden syngene Milzzellen auf zwei Populationen aufgeteilt, unterschiedlich stark mit CFSE gefärbt und die Zellen einer Gruppe mit SIINFEKL beladen. Die Zellen beider Populationen wurden dann zu gleichen Teilen gemischt und intravenös in die experimentellen Mäuse gespritzt. Besitzt die Maus spezifische zytotoxische T-Zellen, so werden die SIINFEKL-beladenen Zellen im Vergleich zu den nicht beladenen Zellen dezimiert.

In der Abbildung 3.3B ist die Analyse exemplarisch für je eine Maus aus den Versuchsgruppen dargestellt. In der Abbildung 3.3C sind die Ergebnisse aller Mäuse zusammengefasst: In der DOTAP-Kontrollgruppe und in der Kontrollgruppe ohne Antigen wurde nach 20 Stunden kaum Zytotoxizität beobachtet. In den CpG-behandelten Mäusen wurden die SIINFEKL-tragenden Zellen nahezu vollständig eliminiert, aber auch die mit RNA als Adjuvans immunisierten Mäuse zeigten mit im Schnitt 20% eine hohe Zytotoxizität.

Grundsätzlich lässt sich sagen, dass RNA als Adjuvans eine deutliche, aber im Vergleich zur CpG-DNA schwächere zelluläre Immunität induziert.

### 3.1.2 RNA induziert die Produktion spezifischer Antikörper vom T<sub>H</sub>2-Typ

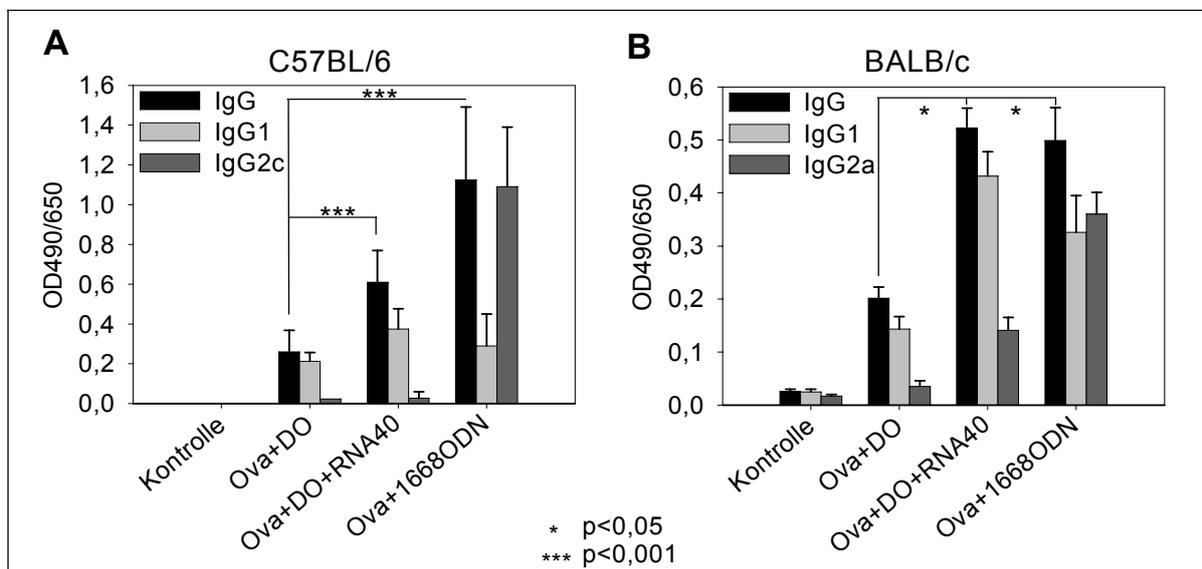
Die humorale Immunreaktion wird durch die Menge der spezifischen Antikörper im Serum der immunisierten Tiere charakterisiert, wobei die Antikörperklasse je nach Art der Immunantwort variiert. IgG1-Antikörper zeugen von einer T<sub>H</sub>2-Immunität, während IgG2a-Antikörper bei einer T<sub>H</sub>1-Immunreaktion entstehen. Bei der Bestimmung der Antikörper sollte allerdings beachtet werden, dass einige Labormausstämme wie etwa C57BL/6 statt IgG2a einen funktionell homologen IgG2c-Subtyp exprimieren (Martin et al., 1998).

Eine Woche nach der zweiten Injektion wurde den Mäusen Serum entnommen und die relativen Antikörpermengen bestimmt (Abb. 3.4). Sowohl in C57BL/6- als auch in BALB/c-Mäusen induzierte die Injektion mit Ovalbumin und DOTAP allein eine basale Antikörperproduktion. Die Injektion mit RNA und CpG-DNA führte allerdings zu einer zwei bis dreifach so hohen Gesamt-IgG-Menge. Diese Erhöhung war in C57BL/6 mit  $p < 0,001$  höchstsignifikant ( $n=12$ ) und in BALB/c mit  $p < 0,05$  signifikant ( $n=6$ ).

Um den Typ der Immunantwort zu bestimmen, wurden zusätzlich die relativen Mengen von IgG1 und IgG2a bzw. IgG2c verglichen. CpG-DNA induziert wie

erwartet eine hohe Produktion von IgG2c in C57BL/6 und IgG2a in BALB/c, also eine Immunantwort von T<sub>H</sub>1-Typ. Die relativ hohe IgG1-Menge in BALB/c-Mäusen ist damit zu erklären, dass dieser Mausstamm bevorzugt eine T<sub>H</sub>2-Antwort ausübt. In Kontrast zur CpG-DNA induziert RNA hauptsächlich Ova-spezifische Antikörper vom IgG1-Typ und kaum T<sub>H</sub>1-Antikörper.

RNA und CpG-DNA als Adjuvantien induzieren also vergleichbare Mengen von Gesamt-IgG-Antikörpern. Während CpG-DNA aber die Produktion der Antikörper vom T<sub>H</sub>1-Typ induziert, fördert RNA die Produktion von T<sub>H</sub>2-Antikörpern. Impfung mit RNA als Adjuvans scheint also zu einer gemischten Immunantwort zu führen. Während die relativ gute zytotoxische Antwort für eine T<sub>H</sub>1-Immunität spricht, deutet das Antikörperprofil eher eine T<sub>H</sub>2-Antwort an.



**Abb. 3.4: RNA als Adjuvans induziert die Produktion von T<sub>H</sub>2-Antikörpern.** Sieben Tage nach der 2. Injektion wurde im Serum die Ovalbumin-spezifische Antikörperproduktion bestimmt. Die Seren wurden 1:300.000 verdünnt. Relative Mengen an Antikörpern in A: C57BL/6- Mäusen, n=12 und B: BALB/c-Mäusen, n=6.

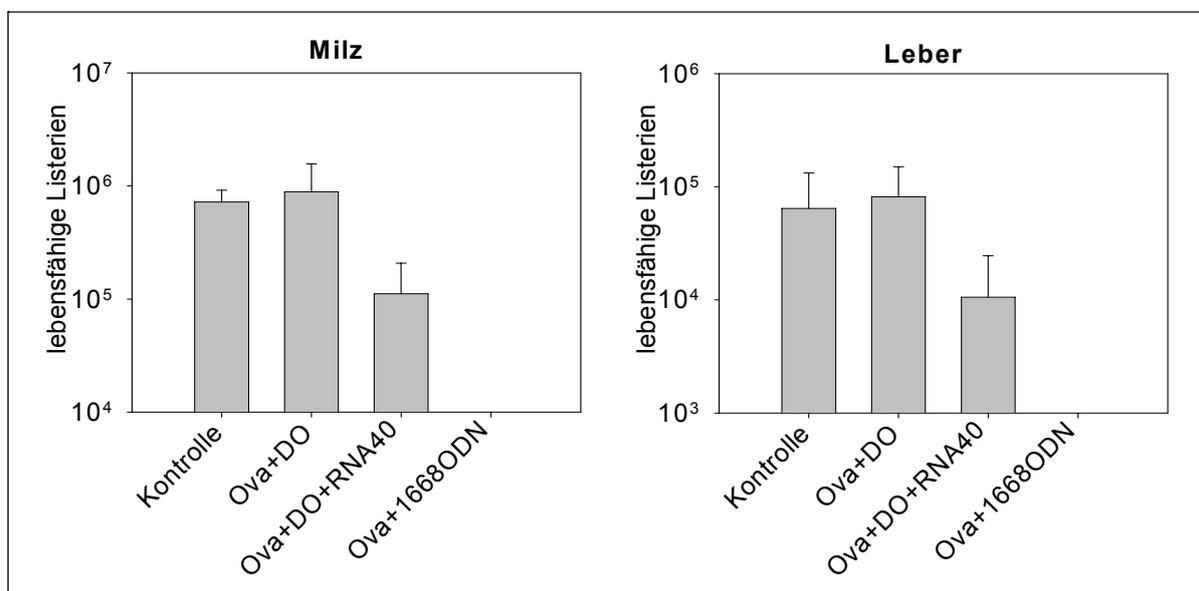
### 3.1.3 Impfung mit RNA schützt bei einer Listerien-Infektion

Um die Eignung RNA als Adjuvans unter komplexen Bedingungen einer Infektion zu untersuchen, wurden die immunisierten Mäuse mit  $4 \times 10^4$  ( $2 \times LD_{50}$ ) Keimen von Ovalbumin-exprimierenden *Listeria monocytogenes* infiziert. *Listeria monocytogenes* ist ein intrazelluläres Pathogen, das besonders effizient über die T<sub>H</sub>1-Immunreaktion bekämpft werden kann. Früheren Beobachtungen zufolge (Elkins et al., 1999; Klinman et al., 1999), liefert eine Immunisierung mit CpG-Oligonukleotiden einen

sehr guten Schutz gegen *Listeria monocytogenes*.

Die Infektion mit Listerien erfolgte vier Wochen nach der zweiten Injektion, da mindestens drei Wochen Abstand zur letzten Behandlung mit CpG-DNA eingehalten werden müssen. Durch die Behandlung mit CpG entwickeln die Tiere nämlich eine zeitlich begrenzte Resistenz gegen Listeria-Infektionen (Krieg et al., 1998a), die die Ergebnisse des Experiments verfälschen kann.

Drei Tage nach der Infektion wurden die Milz und die Leber der Tiere auf die bakterielle Belastung untersucht (Abb. 3.5). In der Kontrollgruppe ohne Antigen lag der Listerientiter in der Milz bei etwa  $10^6$  und in der Leber bei  $10^5$  Bakterien/ml Zellsuspension. Die Belastung mit Listerien in der DOTAP-Kontrollgruppe war ähnlich hoch; wie in vorhergehenden Experimenten zeigte DOTAP allein auch hier keine immunogenen Eigenschaften. Die Behandlung der Mäuse mit RNA-DOTAP-Gemisch als Adjuvans dagegen verminderte die bakterielle Belastung um fast eine log-Stufe auf etwa  $10^5$  in der Milz bzw.  $10^4$  in der Leber. Die Beseitigung der Listerien-Infektion in der CpG-Gruppe war wie erwartet noch effizienter, die Zahl der lebensfähigen Listerien in dieser Gruppe lag in der Milz unter  $10^4$  und in der Leber unter  $10^3$  Bakterien/ml Zellsuspension.



**Abb. 3.5: Verwendung der RNA als Adjuvans schützt bei einer Listerien-Infektion.** Vier Wochen nach der 2. Injektion wurde die Belastung mit lebensfähigen Listerien in der Milz und der Leber der Tiere untersucht. Dafür wurden diese Organe zerkleinert und durch ein Zellsieb filtriert. Ein definiertes Volumen wurde für 16 Stunden ausgesäht und die Zahl der Kolonien ausgezählt.

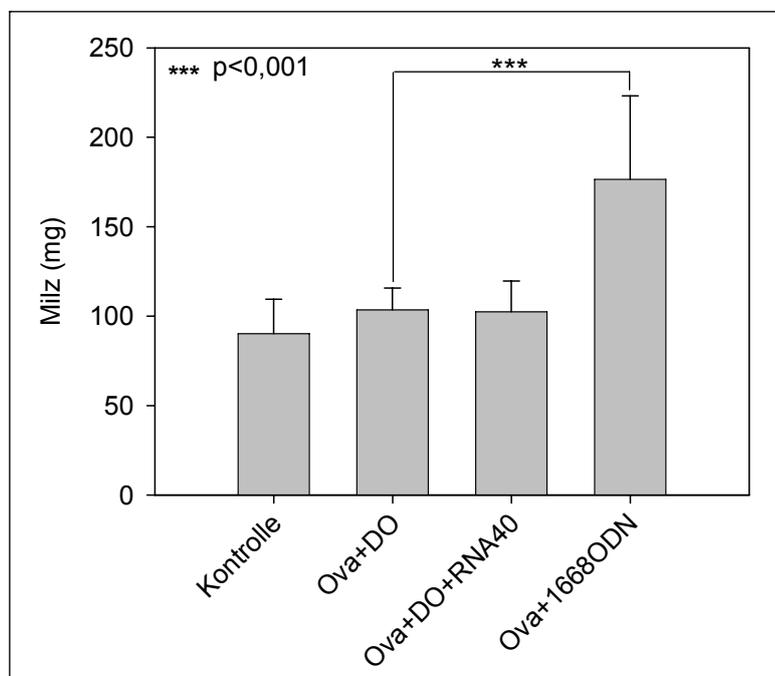
Im Vergleich zur CpG-DNA vermittelt die RNA einen schwächeren, jedoch deutlichen Schutz gegen *Listeria monocytogenes* und kann prinzipiell als Adjuvans bei Infektionen mit intrazellulären Bakterien eingesetzt werden.

### 3.1.4 Injektion mit RNA führt zu keiner Splenomegalie

Wie in den oben dargestellten Experimenten demonstriert, ist CpG-DNA ein potenteres Adjuvans als RNA. Ein derart starkes Adjuvans birgt jedoch das Risiko einer Überstimulation des Immunsystems. Ein Zeichen dafür ist die potentiell lebensgefährliche Splenomegalie.

Um die Zeichen der Splenomegalie zu beschreiben, wurden den Tieren eine Woche nach der zweiten Injektion die Milzen entnommen und gewogen (Abb. 3.6). Die Milzen in der mit RNA-behandelten und in der DOTAP-Gruppe blieben im Vergleich zur Kontrollgruppe unverändert. Die mit CpG-behandelten Tiere zeigten allerdings eine um etwa 50% vergrößerte Milz (mit  $p < 0,001$  höchstsignifikant,  $n=9$ ).

Die Verwendung von RNA als Adjuvans führt also im Unterschied zur CpG-DNA zu keiner Überstimulation des Immunsystems und kann als sicheres Adjuvans eingesetzt werden.



**Abb. 3.6: RNA als Adjuvans zeigt keine Zeichen von Splenomegalie.** Eine Woche nach der 2. Injektion wurden die Milzen entfernt und gewogen.

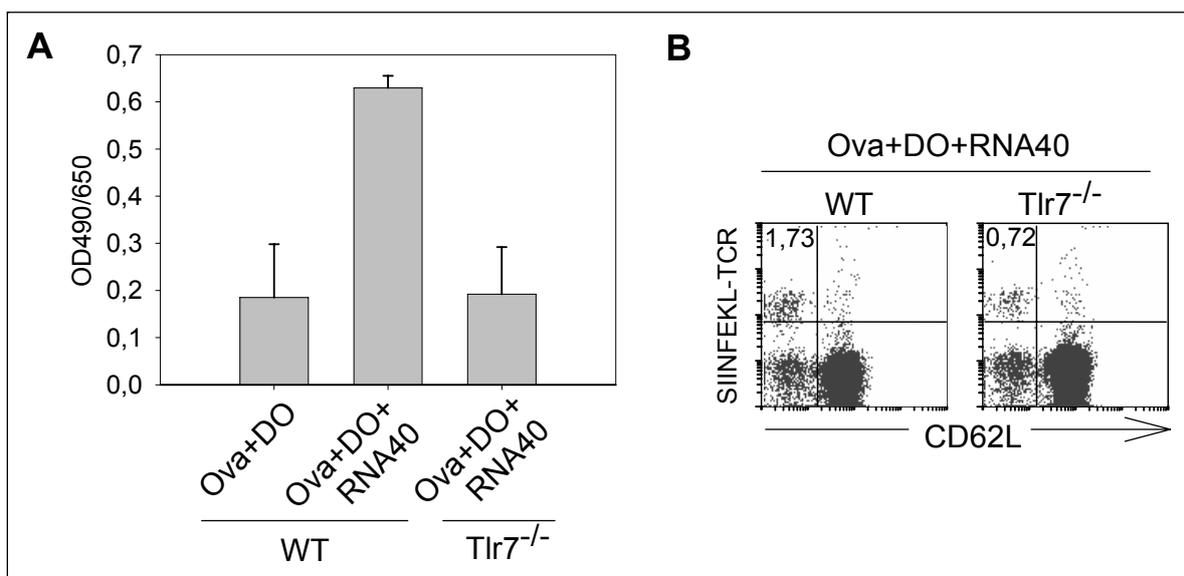
### 3.1.5 Tlr7-Abhängigkeit von der RNA-induzierten Immunantwort

Mit den oben dargestellten Experimenten wurde die Eignung von RNA als Adjuvans bestätigt. Um festzustellen, ob für diese RNA-Anwendung ähnlich wie für die *in-vitro*-Stimulation Tlr7 benötigt wird, wurden Impfexperimente mit Tlr7-*knockout*-Mäusen durchgeführt.

Die Tlr7-defizienten Mäuse wurden genauso wie Wildtyp-Mäuse zweimal im Abstand von drei Wochen mit Ovalbumin als Antigen und RNA-DOTAP-Gemisch als Adjuvans gespritzt. Eine Woche nach der zweiten Injektion wurden dann die Mengen an spezifischen Ova-Antikörpern im Serum der WT und Tlr7-ko-Mäusen bestimmt. Außerdem wurde in beiden Gruppen die Anzahl der SIINFEKL-spezifischen T-Zellen verglichen.

Die Produktion von Gesamt-IgG war in den mit RNA behandelten Tlr7-defizienten Mäusen genauso hoch wie in den WT-DOTAP-Kontrollmäusen. WT-Mäuse, die mit RNA behandelt wurden, hatten dagegen etwa doppelt soviel Ova-spezifische IgG-Antikörper im Serum (Abb. 3.7A). RNA behandelte WT-Mäuse hatten außerdem mehr spezifische CD8-T-Zellen als Tlr7-defiziente Mäuse, die mit RNA gespritzt wurden (Abb. 3.7B).

Tlr7 scheint also für die Vermittlung der RNA-induzierten Immunität notwendig zu sein.



**Abb. 3.7: Tlr7-Abhängigkeit von der RNA-induzierten Immunantwort.** WT- und TLR7<sup>-/-</sup>-Mäuse wurden zweimal im Abstand von drei Wochen mit Ovalbumin und RNA-DOTAP-Gemisch gespritzt. Eine Woche nach der 2. Injektion wurde die Produktion von Ova-spezifischen Antikörpern im Serum und SIINFEKL-spezifischen CD8<sup>+</sup>-T-Zellen im Blut bestimmt.

### 3.2 Tlr7-unabhängige Erkennung von RNA

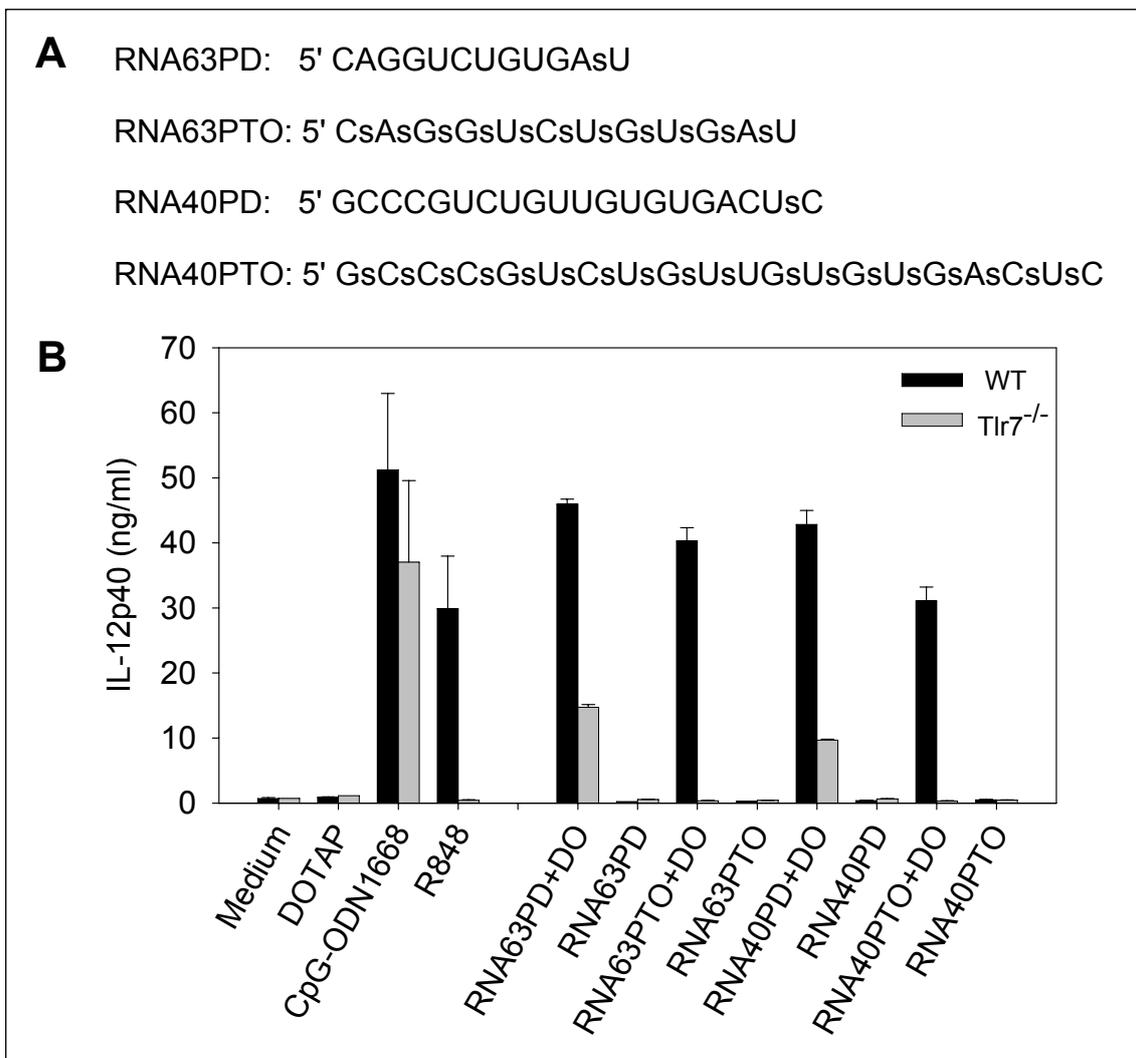
Muriner Toll-like Rezeptor 7 und humane TLR7 und 8 sind als einzige Rezeptoren für einzelsträngige RNA (ssRNA) beschrieben worden (Heil et al., 2004). RNA ist ein labiles Molekül und wird im Serum relativ schnell durch Nukleasen abgebaut. Für die RNA-Stimulation werden deswegen normalerweise Oligonukleotide mit einem vollständig Phosphorothioat(PTO)-modifizierten Gerüst verwendet (siehe 3.1). Die Stimulation mit derart modifizierten Oligonukleotiden ist in der Maus vollständig Tlr7-abhängig (Abb. 3.8B).

Bei Experimenten mit sequenzgleicher physiologischer RNA mit dem Phosphodiester-Gerüst (PD), die ebenfalls das Immunsystem stimuliert, fiel uns auf, dass sie auch in Tlr7-defizienten Zellen eine deutliche Stimulation hervorruft. Um dieses Phänomen untersuchen zu können, ließen wir zwei unterschiedlich lange RNA-Oligonukleotide mit einem Phosphodiester- und einem Phosphorothioat-Gerüst herstellen: RNA63PD, RNA63PTO, RNA40PD und RNA40PTO (Abb. 3.8A). Die Sequenzen stammen aus dem HIV-Genom, sind reich an G- und U-Nukleotiden und immunstimulatorisch (Heil et al., 2004). Mit den RNA-Oligonukleotiden wurden die *ex-vivo*-Kulturen verschiedener *knockout*-Mäuse stimuliert und die erfolgten Veränderungen des Aktivierungszustandes der Zellen und die induzierte Zytokinproduktion untersucht. Meistens wurden Flt3L-generierte Zellen (Naik et al., 2005) für die Stimulationen benutzt. Um die Tlr7-unabhängige Stimulation in verschiedenen Zelltypen zu demonstrieren, wurden außerdem M-CSF- und GM-CSF-Zellkulturen verwendet.

Es sollte beachtet werden, dass RNA für die Stimulation mit dem kationischen Lipid DOTAP komplexiert werden muss. Dieses bildet mit RNA Komplexe, die diese schützen und ihre Endozytose erleichtern. Parallel werden RNA-Stimulationen ohne DOTAP angesetzt, um eventuelle LPS-Verunreinigungen der RNA ausschließen zu können.

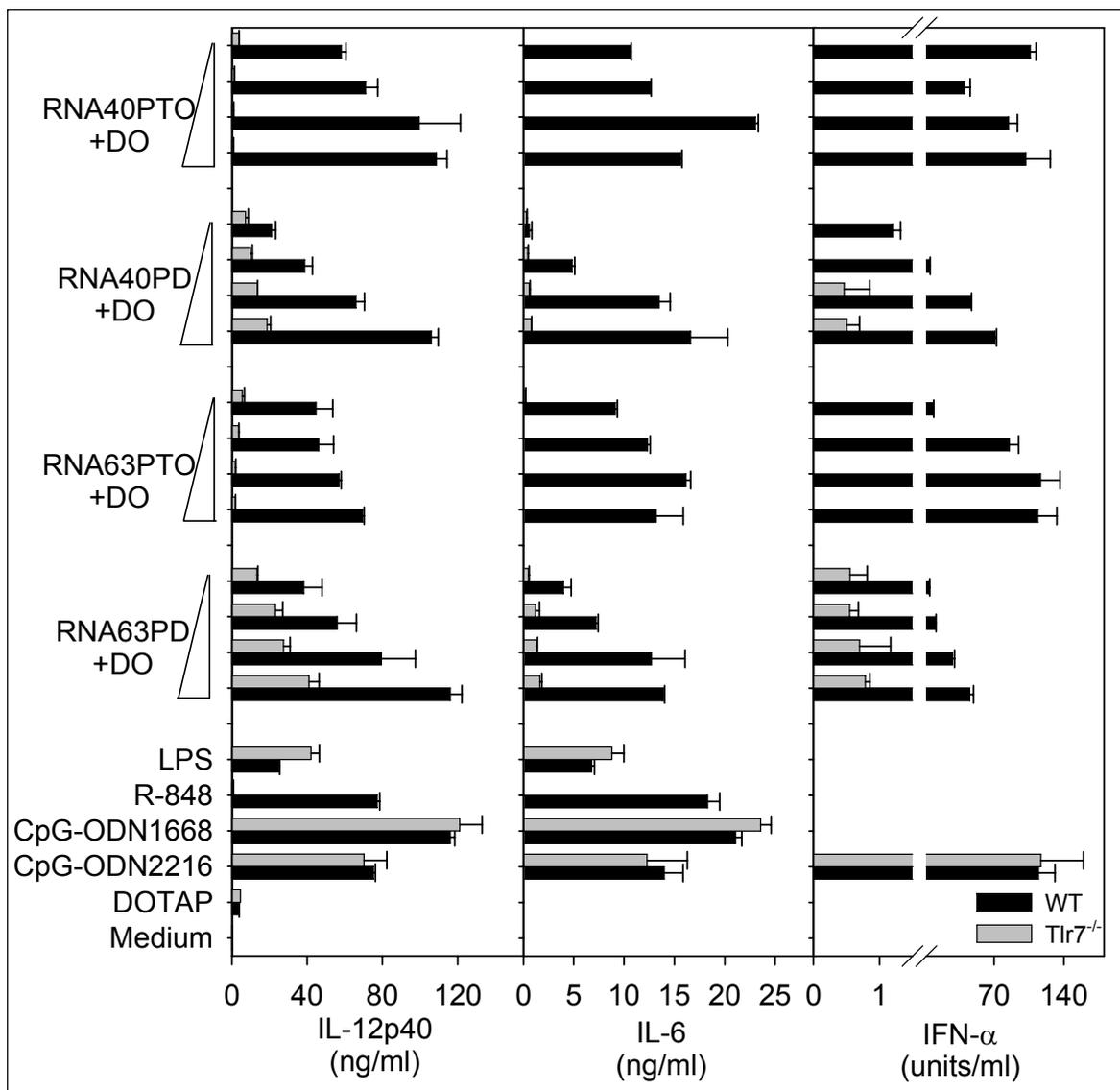
### 3.2.1 Stimulation mit PD-RNA ist nicht vollständig Tlr7-abhängig

Um die Tlr7-unabhängige Stimulation zu zeigen, wurden Flt3L-generierte Zellen aus den WT- und Tlr7<sup>-/-</sup>-Mäusen mit den DOTAP-komplexierten RNA-Oligonukleotiden und mit CpG-ODN1668 und R848 als Positiv- und DOTAP allein als Negativkontrolle stimuliert. Danach wurde die Produktion von IL-12p40 bestimmt. Da die ODN1668-induzierte Zytokinproduktion in beiden Kulturen ähnlich hoch war, können die Ergebnisse des Experiments verglichen werden. Stimulation mit dem synthetischen Tlr7-Ligand R848 und PTO-RNA-Oligonukleotiden induzierte in Tlr7-defizienten Zellen wie erwartet kein IL-12p40, PD-RNA führte dagegen auch in Tlr7-knockout-Zellen zu einer IL-12p40-Produktion, die etwa ein Drittel der Produktion in den WT-Zellen betrug. DOTAP allein induzierte keine nennenswerte Stimulation (Abb. 3.8B).



**Abb. 3.8: Stimulation mit PD-RNA ist nicht vollständig Tlr7-abhängig.** Flt3L-generierte Zellen wurden für 30 Stunden mit 0,5  $\mu$ M ODN1668, 2  $\mu$ g/ml R848 und 1  $\mu$ M RNA-Oligonukleotiden mit 12,5  $\mu$ g/ml DOTAP (DO) stimuliert.

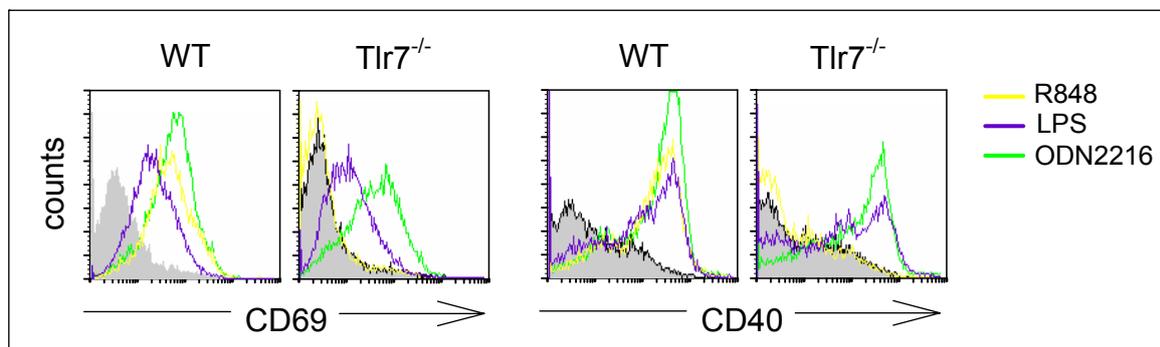
Um die Konzentrationsabhängigkeit des Effekts zu untersuchen, wurde eine Stimulation mit folgenden Konzentrationen an RNA-Oligonukleotiden durchgeführt: 5  $\mu\text{M}$ , 1,7  $\mu\text{M}$ , 0,7  $\mu\text{M}$  und 0,2  $\mu\text{M}$ . IL-12p40 stieg in den Tlr7-defizienten Zellen nach der Stimulation mit PTO-Oligonukleotiden bei keiner Konzentration über den DOTAP-Wert, während PD-Oligonukleotide auch bei der niedrigsten Konzentration deutlich IL-12p40 induzierten (Abb. 3.9). Tlr7-unabhängige Stimulation mit PD-RNA wurde auch für die IL-6- und IFN- $\alpha$ -Produktion beobachtet, IL-12p40 war allerdings das am wenigsten Tlr7-abhängige Zytokin.



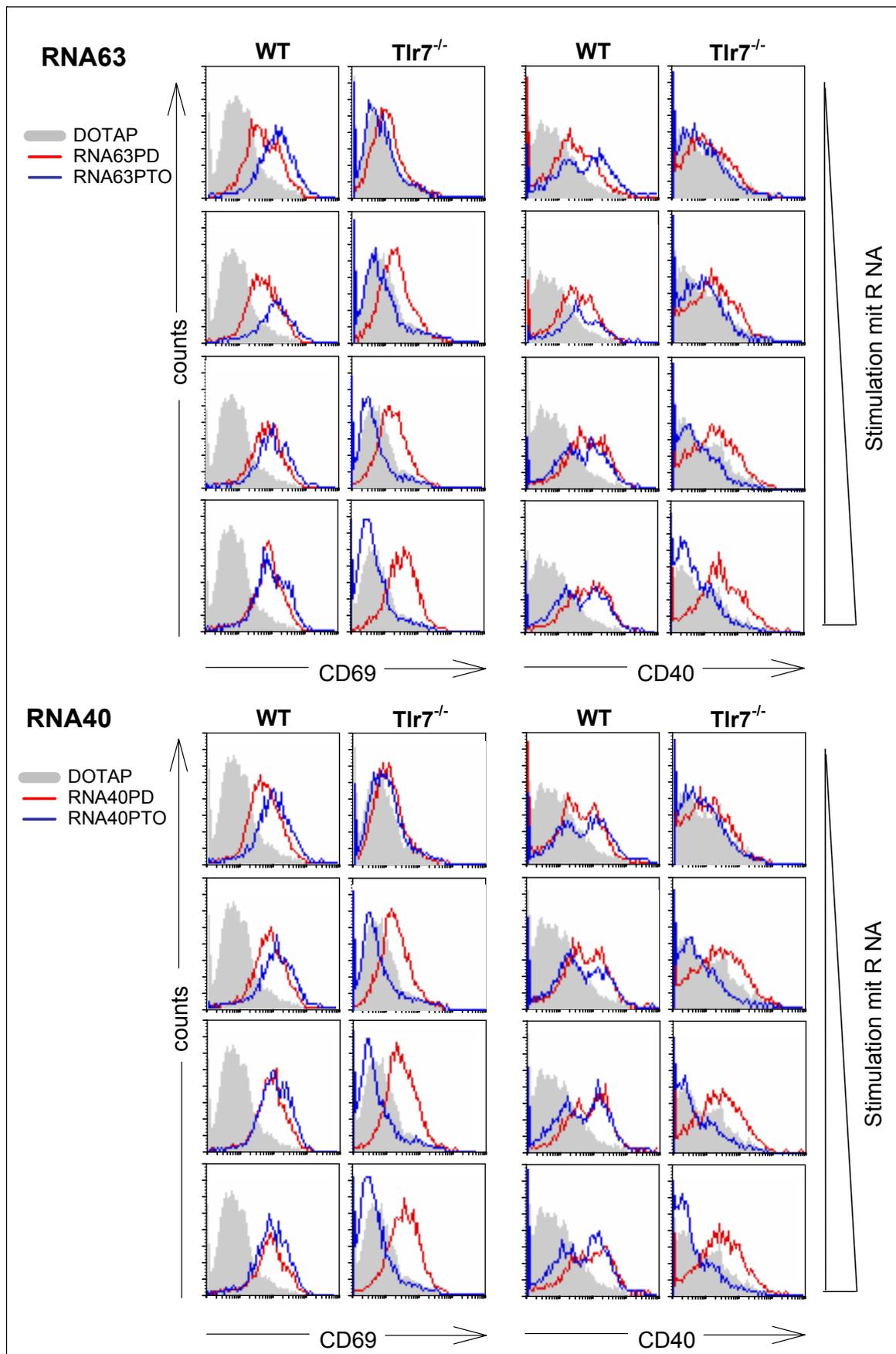
**Abb. 3.9: Tlr7-Unabhängigkeit der PD-RNA-Stimulation ist ubiquitär für die inflammatorischen Zytokine.** Flt3L-generierte Zellen wurden mit 0,5  $\mu\text{M}$  ODN1668/2216, 2  $\mu\text{g/ml}$  R848, 0,1  $\mu\text{g/ml}$  LPS und RNA-Oligonukleotiden in folgenden Konzentrationen: 5  $\mu\text{M}$ , 1,7  $\mu\text{M}$ , 0,7  $\mu\text{M}$  und 0,2  $\mu\text{M}$ , komplexiert mit DOTAP (DO, 12,5  $\mu\text{g/ml}$ ) für 30 Stunden stimuliert.

Zusätzlich zu den Zytokinmessungen wurde anhand der Expression des frühen Aktivierungsmarkers CD69 und des kostimulatorischen Moleküls CD40 der Aktivierungszustand der Zellen nach der Stimulation untersucht. Wie erwartet verstärken sowohl WT- als auch Tlr7-defiziente Zellen die Expression der beiden Rezeptoren nach der Stimulation mit ODN2216 und LPS. Nach der Stimulation mit R848 wurden erwartungsgemäß nur WT-Zellen aktiviert (Abb. 3.10). In der Abbildung 3.11 sind die Ergebnisse der FACS-Färbung nach der Stimulation mit RNA-Oligonukleotiden dargestellt. Sowohl PTO- als auch PD-Oligonukleotide regulierten die Expression von CD69 und CD40 in den WT-Zellen hoch; nur PD-RNAs führten zu einer konzentrationsabhängigen Erhöhung der CD69 und CD40-Expression in den Tlr7-defizienten Zellen (Abb. 3.11).

Somit konnten wir zeigen, dass Phosphodiester-RNA im Unterschied zu R848 und Phosphorothioat-RNA, die vollständig Tlr7-abhängig sind, die Aktivierung von Immunzellen und die Produktion von proinflammatorischen Zytokinen zum Teil Tlr7-unabhängig stimuliert.



**Abb. 3.10: Die Hochregulation von CD69 und CD40 in WT- und Tlr7<sup>-/-</sup>-Flt3L-Zellen.** Flt3L-generierte Zellen wurden mit 0,5  $\mu$ M ODN1668, 2  $\mu$ g/ml R848 und 0,1  $\mu$ g/ml LPS stimuliert. Die Expression von CD69 und CD40 wurde im FACS gemessen.

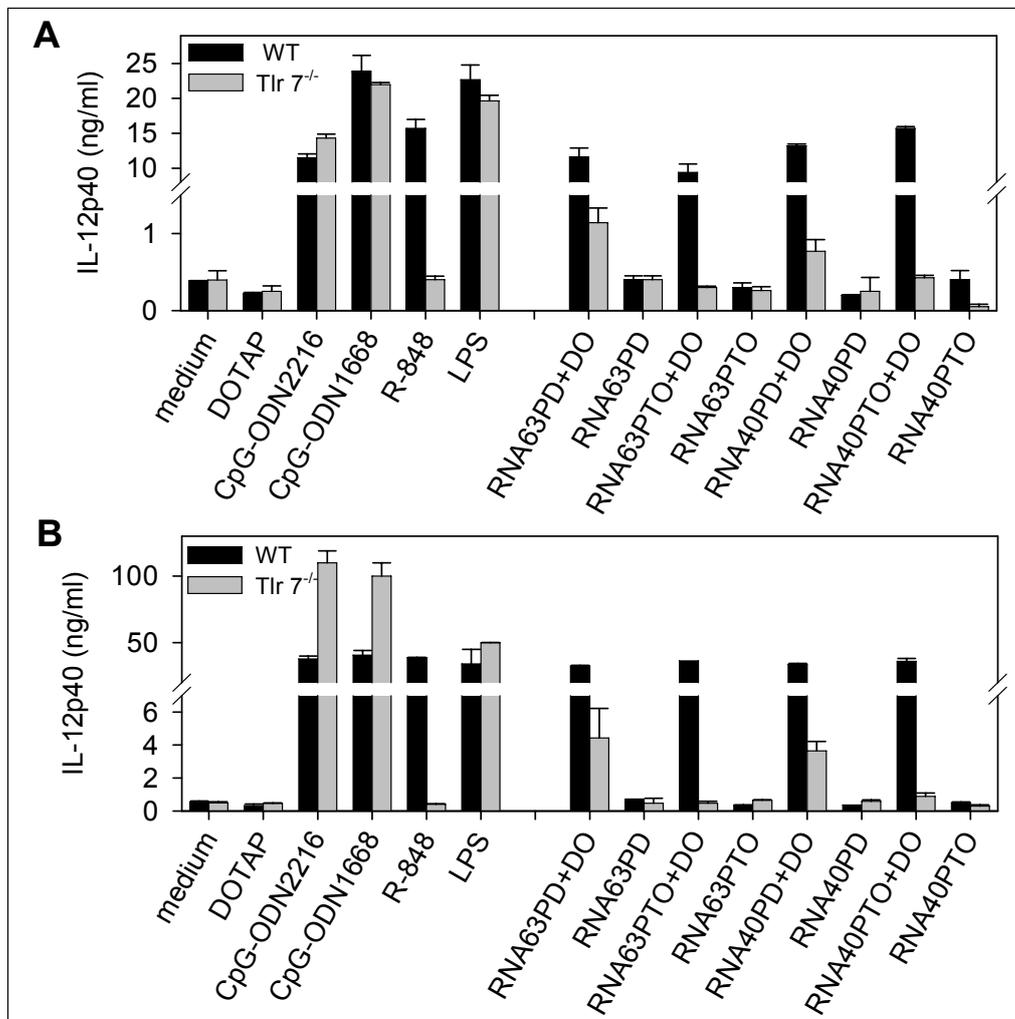


**Abb. 3.11: PD-RNA stimuliert Tlr7-unabhängig die Hochregulation von CD69 und CD40.** Flt3L-generierte Zellen wurden mit 5  $\mu\text{M}$ , 1,7  $\mu\text{M}$ , 0,7  $\mu\text{M}$  und 0,2  $\mu\text{M}$  mit DOTAP komplexierten RNA (DO: 12,5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) für 30 Stunden stimuliert.

### 3.2.2 Tlr7-unabhängige PD-RNA-Stimulation in verschiedenen Typen der Immunzellen

Die oben dargestellten Experimente wurden mit Flt3L-generierten Zellkulturen angefertigt. Diese Kultur ist besonders geeignet, da sie ein Gemisch von DZ-Subpopulationen liefert, das funktionell und morphologisch dem Zustand in der naiven Mausmilz äquivalent ist (Naik et al., 2005).

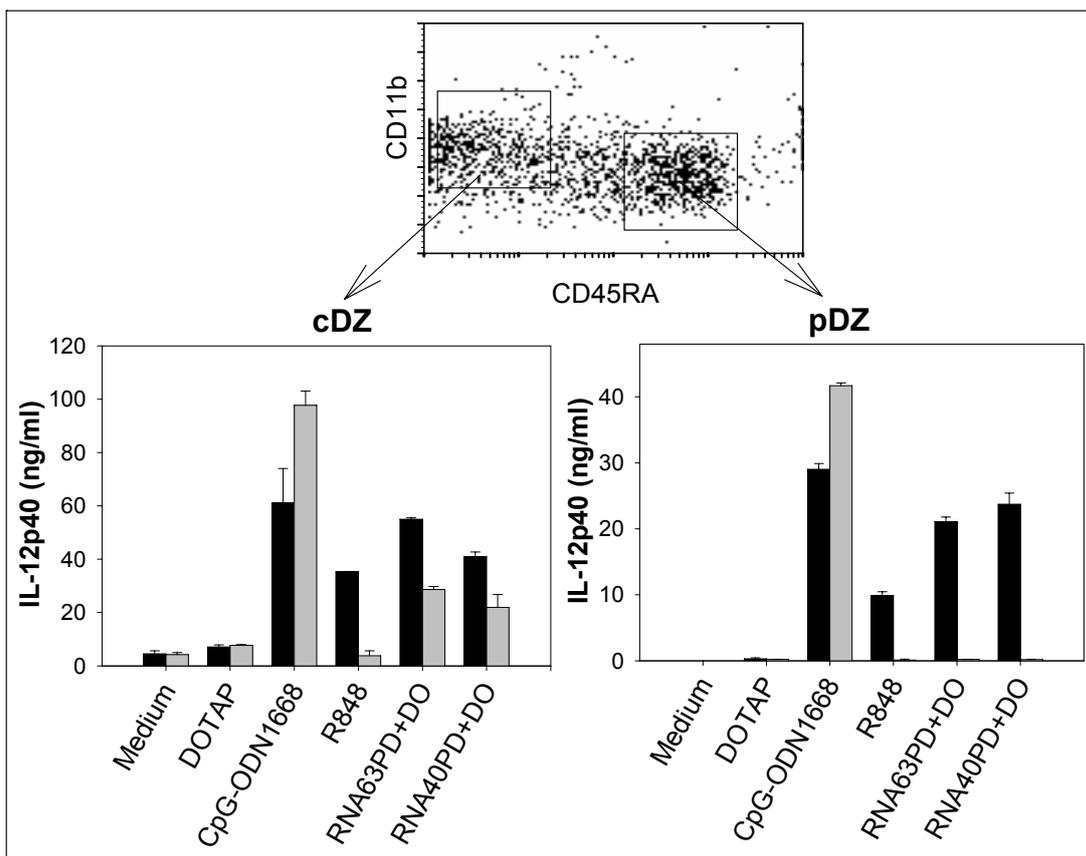
Um zu überprüfen, ob auch andere Typen der Immunzellen ähnlich auf die PD-RNA reagieren, wurden zwei weitere Zellkulturen getestet: M-CSF-generierte Makrophagen und GM-CSF-generierte Dendritische Zellen. Tlr7-defiziente Zellen beider Kulturen reagierten auf die PD-RNA-Stimulation relativ schwach, aber deutlich, die PTO-RNA-Stimulation in diesen Zellen hatte dagegen keinen Effekt (Abb. 3.12).



**Abb. 3.12: Tlr7-unabhängiger Effekt der PD-RNA in Makrophagen (A) und GM-CSF-DZ (B).** M-CSF- und GM-CSF-generierte Zellen wurden mit 0,5  $\mu$ M ODN1668/2216, 2  $\mu$ g/ml R848, 0,1  $\mu$ g/ml LPS und 1  $\mu$ M mit DOTAP komplexierten RNA-Oligonukleotiden (DO, 12,5  $\mu$ g/ml) für 30 Stunden stimuliert.

Die Flt3L-Kultur liefert eine Mischung von unterschiedlichen Zelltypen. Etwa 90% davon machen zwei ähnlich große Populationen aus: CD45RA<sup>-</sup>CD11b<sup>+</sup> konventionelle (cDZ) und CD45RA<sup>+</sup>CD11b<sup>-</sup> plasmazytoide (pDZ) Dendritische Zellen. Um zu testen, wie stark der Tlr7-unabhängige Effekt der PD-RNA in diesen zwei Subpopulationen ist, wurden diese mit Hilfe eines *Modular Flowcytometers* aus der Flt3L-Kultur isoliert und stimuliert. Interessanterweise reagierten nur konventionelle DZ Tlr7-unabhängig auf die PD-RNA. In plasmazytoiden DZ war die Stimulation mit PD-RNA-Oligonukleotiden vollständig abhängig von Tlr7.

Der Tlr7-unabhängige Stimulationseffekt der PD-RNA scheint also nur in den Zellen myeloiden Ursprungs, wie Makrophagen, GM-CSF-Dendritischen Zellen und konventionellen DZ aus der Flt3L-Kultur, aufzutreten. Plasmazytoide DZ, die mehr lymphoide Merkmale besitzen (Res et al., 1999), sind nicht in der Lage Tlr7-unabhängig auf die PD-RNA zu reagieren.



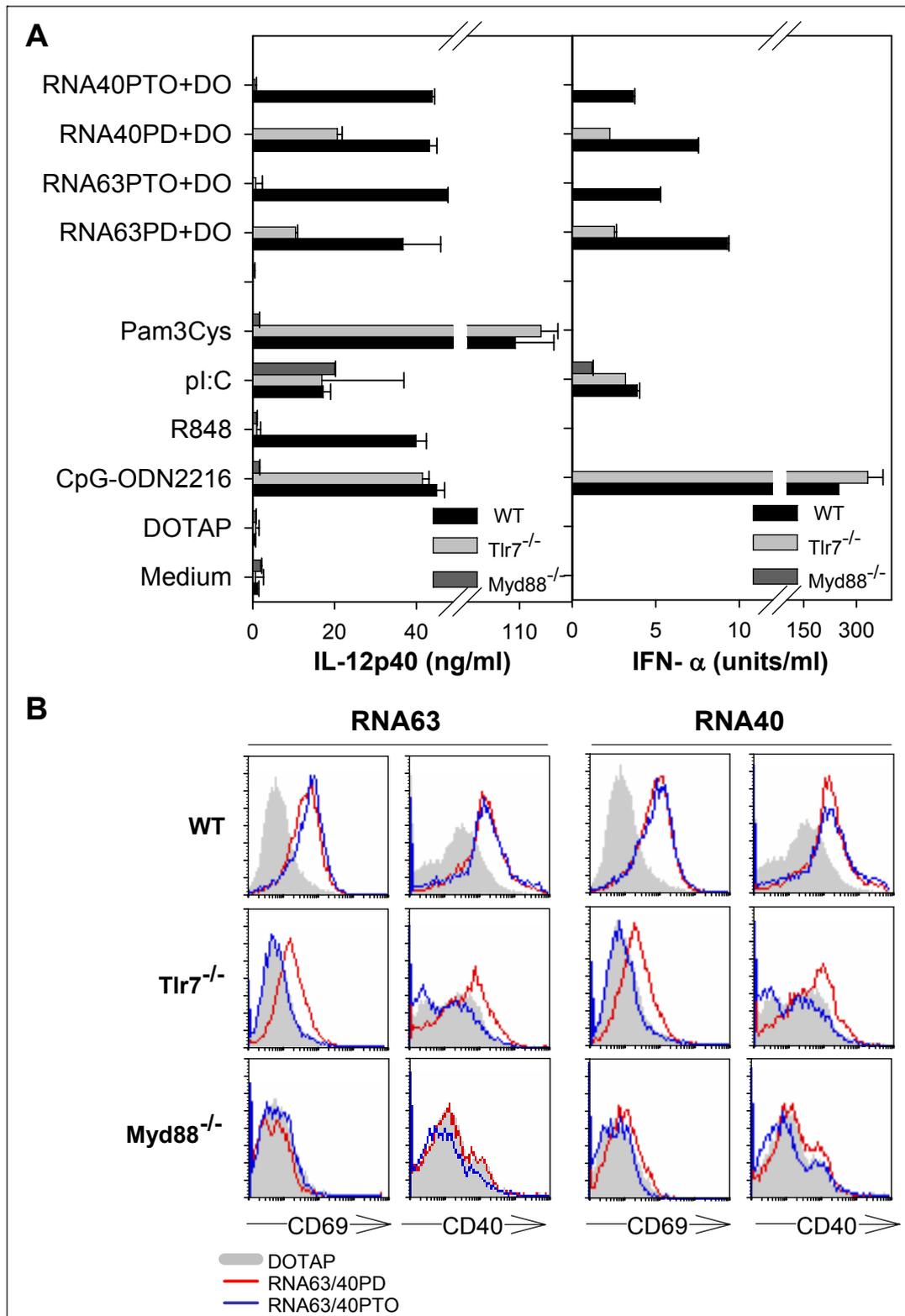
**Abb. 3.13: PD-RNA stimuliert cDZ und nicht pDZ Tlr7-unabhängig.** Mit Hilfe eines Zellsorters isolierte Zellen wurden mit 0,5  $\mu$ M ODN1668, 2  $\mu$ g/ml R848, 0,1  $\mu$ g/ml LPS und 1  $\mu$ M mit DOTAP komplexierten RNA-Oligonukleotiden (DO, 12,5  $\mu$ g/ml) stimuliert.

### 3.2.3 PD-RNA-Stimulation ist MyD88-abhängig

Nachdem nun gezeigt wurde, dass die Tlr7-unabhängige Stimulation durch die PD-RNA ein verbreitetes Phänomen ist, wurde als nächstes nach dem dafür verantwortlichen Rezeptor gesucht. Um die Zahl der Kandidaten einzuschränken, wurden zunächst Stimulationsexperimente mit MyD88<sup>-/-</sup>-Zellen durchgeführt und mit der Zytokininduktion in den WT- und Tlr7<sup>-/-</sup>-Zellen verglichen. MyD88 ist ein von den Toll-like Rezeptoren gemeinsam benutztes Adaptormolekül, das Fehlen von MyD88 unterbindet also die Aktivierung des Immunsystems durch die meisten Tlr-Liganden. Nur Toll-like Rezeptor 4 und Tlr3 sind imstande, das Immunsystem unabhängig von MyD88 zu aktivieren.

Um die Vergleichbarkeit der Ergebnisse aus Experimenten mit verschiedenen Mäusen zu gewährleisten, wurden vor der Stimulation die Lebensfähigkeit und Morphologie der Zellen untersucht. Diese waren in allen drei Zellkulturen ähnlich. Außerdem induzierte die Stimulation mit pl:C als Positiv-Kontrolle vergleichbare Zytokinmengen (Abb. 3.14A). Myd88-defiziente Zellen produzierten allerdings nach der Stimulation mit PTO- oder PD-RNA keine Zytokine. Wie erwartet stimulierten beide Typen der RNA-Oligonukleotide WT- und nur PD-RNA Tlr7-defiziente Zellen. Die Expression von CD40 und CD69 blieb in MyD88<sup>-/-</sup>-Zellen nach der Stimulation mit beiden RNA-Typen unverändert, im Vergleich dazu wurde die Expression der beiden Rezeptoren in den Tlr7-defizienten Zellen nach der Stimulation mit PD-RNA hochreguliert (Abb. 3.14B).

Der Tlr7-unabhängige Effekt der PD-RNA hängt also vom Vorhandensein von Myd88 ab. Das bedeutet, dass ein Toll-like Rezeptor der gesuchte Rezeptor sein könnte, da die Immunstimulation durch bekannte zytoplasmatische RNA-Erkennungsproteine wie etwa RIG-1 Myd88-unabhängig ist (Yoneyama et al., 2004).



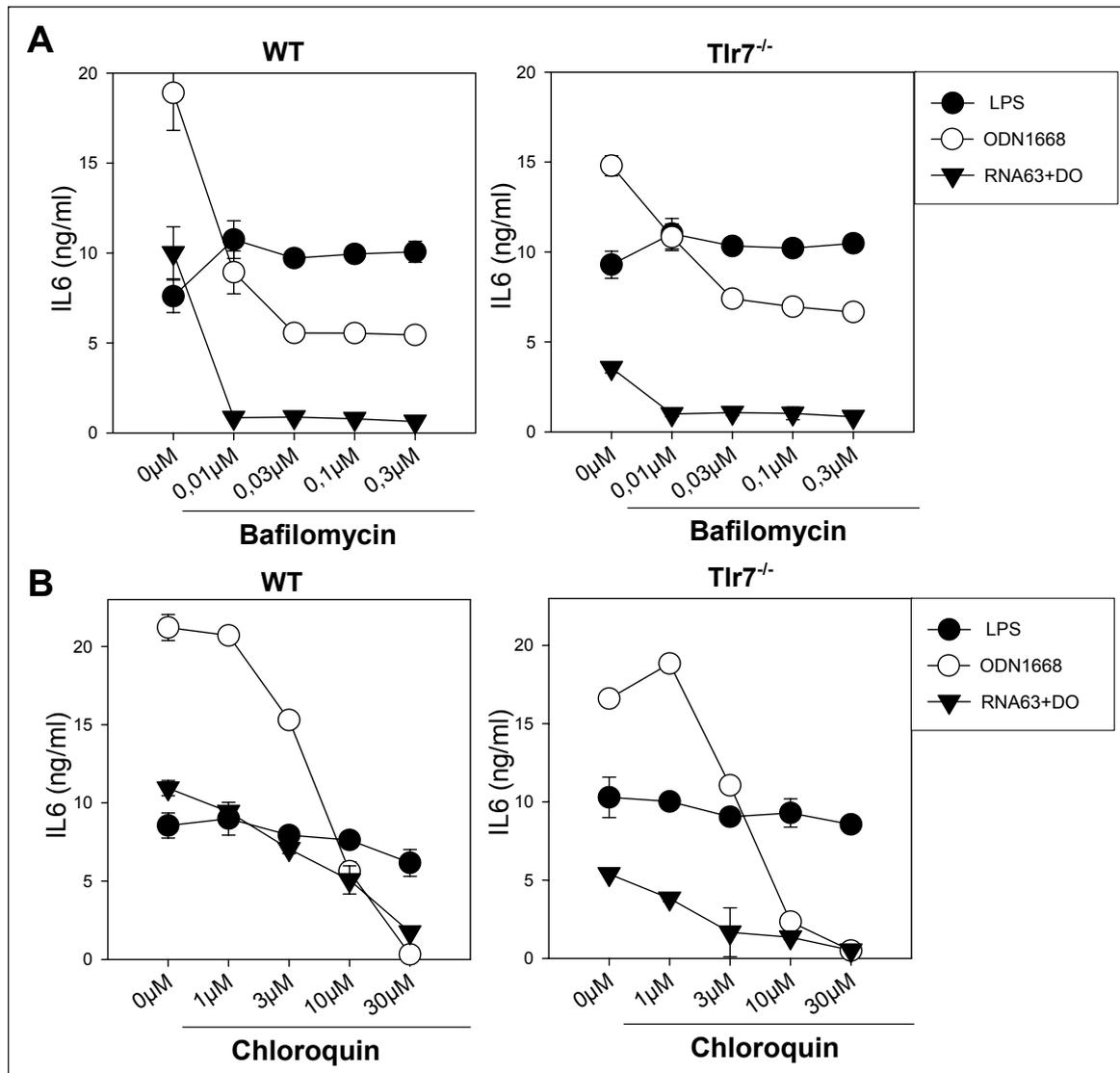
**Abb. 3.14: Tlr7-unabhängiger Effekt der PD-RNA ist Myd88-abhängig.** WT-, Tlr7<sup>-/-</sup>- und Myd88<sup>-/-</sup>-Zellen aus der Flt3-Kultur wurden mit 0,5  $\mu$ M ODN2216, 2  $\mu$ g/ml R848, 1  $\mu$ g/ml Pam3Cys (Tlr2-Ligand), 50  $\mu$ g/ml pl:C und 1  $\mu$ M mit DOTAP komplexierten RNA-Oligonukleotiden (DO, 12,5  $\mu$ g/ml) stimuliert. Nach 30 Stunden wurde die Zytokinproduktion (A) und die Expression von CD69 und CD40 (B) bestimmt.

### 3.2.4 Endosomale Reifung ist erforderlich für die PD-RNA-Stimulation

Um den möglichen Rezeptor enger einzukreisen, wurde als nächstes die Abhängigkeit der Tlr7-unabhängigen PD-RNA-Stimulation von der endosomalen Reifung untersucht. Toll-like Rezeptoren 3, 7, 8 und 9 befinden sich im endosomal-lysosomalen Kompartiment der Zelle. Für die Stimulation dieser Rezeptoren ist die sogenannte Reifung der Endosomen notwendig. Um diese zu verhindern, können bestimmte Agentien, in diesem Fall Chloroquin und BafilomycinA1, verwendet werden, die die für die endosomale Reifung notwendige Ansäuerung der Vesikel hemmen. Der Mechanismus der Inhibition ist bei beiden Agentien unterschiedlich; BafilomycinA1 blockiert die ATP-betriebene Protonen-Pumpe, während Chloroquin den pH-Wert in Endosomen abpuffert.

In diesem Experiment wurden WT- und Tlr7<sup>-/-</sup>-Zellen eine halbe Stunde vor der Stimulation mit Chloroquin (Abb. 3.15B, 1µM-30µM) oder Bafilomycin (Abb. 3.15A, 0,01µM-0,3µM) in verschiedenen Konzentrationen inkubiert. Die Zellen wurden dann wie üblich stimuliert, wobei LPS als eine von der endosomalen Reifung unabhängige und ODN1668 als eine abhängige Kontrolle verwendet wurden. Die beiden Kontrollen verhielten sich wie erwartet. Die Stimulation mit PD-RNA wurde durch die Zugabe von beiden Agentien sowohl in WT-Zellen als auch in Tlr7-defizienten Zellen vermindert.

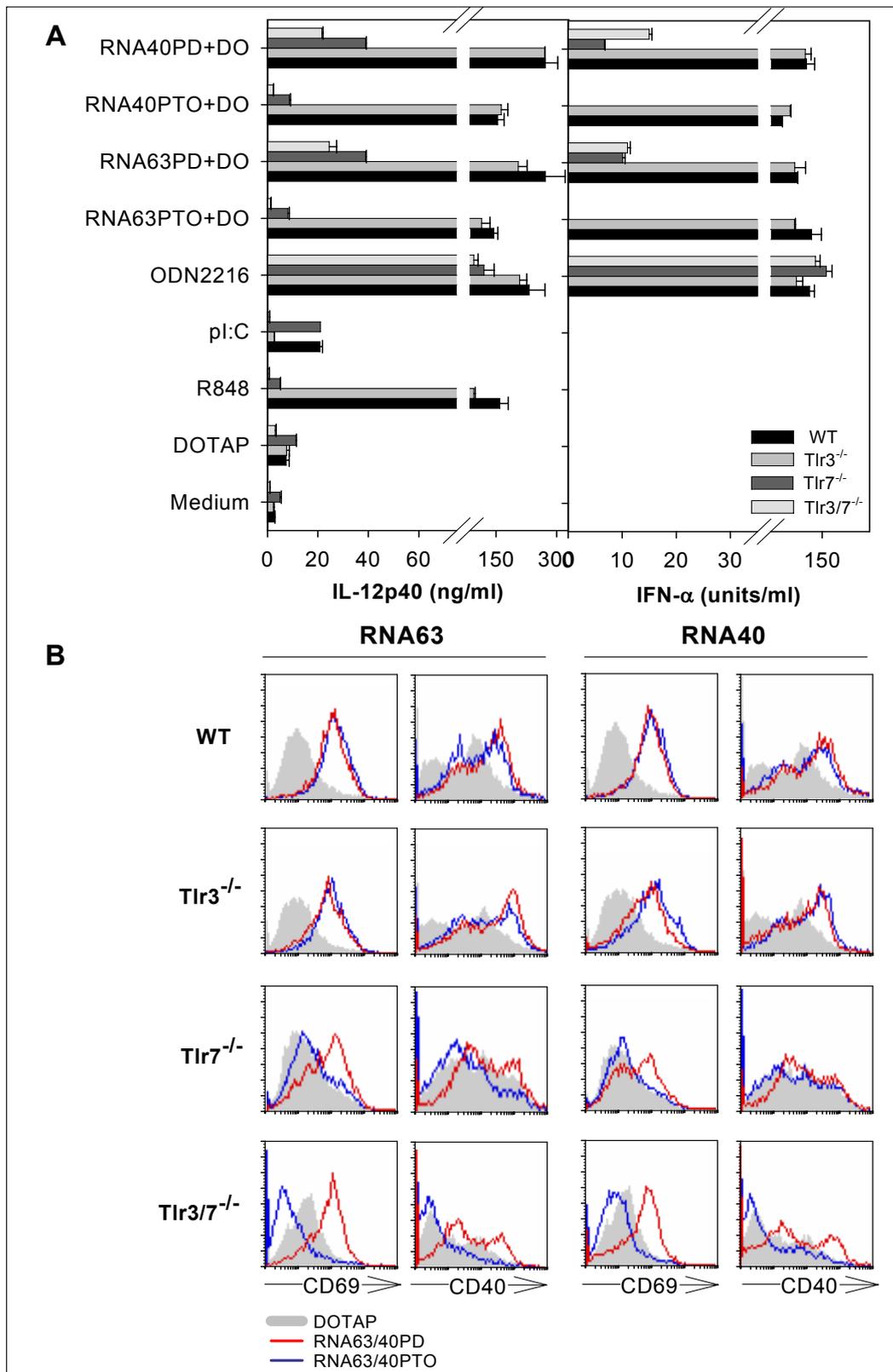
Die endosomale Reifung ist also für die Tlr7-unabhängige Stimulation durch die PD-RNA notwendig. Das schränkt den Kreis der fraglichen Rezeptoren auf die endosomalen Toll-like Rezeptoren ein.



**Abb. 3.15: Endosomale Reifung ist erforderlich für die Tlr7-unabhängige PD-RNA-Stimulation.** Die Zellen wurden mit 0,01  $\mu\text{M}$  bis 0,3  $\mu\text{M}$  Bafilomycin oder 1  $\mu\text{M}$  bis 30  $\mu\text{M}$  Chloroquin vorstimuliert. Eine halbe Stunde danach wurden die Zellen mit 1  $\mu\text{M}$  RNA63PD, 0,5  $\mu\text{M}$  ODN1668 und 0,1  $\mu\text{g/ml}$  LPS für 30 Stunden stimuliert.

### 3.2.5 Tlr3 ist nicht für die Erkennung von PD-RNA verantwortlich

Tlr3 erkennt doppelsträngige RNA und benutzt Trif als Adaptormolekül für die Signalweiterleitung. Da der Tlr7-unabhängige Effekt der PD-RNA Myd88-abhängig ist, könnte Tlr3 als möglicher Rezeptor für die PD-RNA ausgeschlossen werden. Allerdings ist die Situation vorstellbar, bei der die Tlr3-vermittelte Signalkaskade nach der Erkennung von doppelsträngiger RNA über Trif und nach der Erkennung von einzelsträngiger PD-RNA über Myd88 verläuft. Um diese Möglichkeit auszuschließen, wurden Stimulationsexperimente mit Tlr3/7-doppel-knockout-Mäusen durchgeführt (Abb. 3.16).



**Abb. 3.16: Tlr3 ist nicht für die Tlr7-unabhängige Erkennung von PD-RNA verantwortlich.** WT-, Tlr3<sup>-/-</sup>, Tlr7<sup>-/-</sup> und Tlr3/7<sup>-/-</sup>-Zellen wurden mit 0,5  $\mu$ M ODN2216, 2  $\mu$ g/ml R848, 50  $\mu$ g/ml pl:C und 1  $\mu$ M RNA (DO, 12,5  $\mu$ g/ml) stimuliert. Nach 30 Stunden wurde die Zytokinproduktion (A) und die Expression von CD69 und CD40 (B) bestimmt. Die Vergleichbarkeit war auch diesmal gewährleistet, da die Zellen verschiedener Kulturen lebensfähig und morphologisch ähnlich waren. ODN2216 als Positivkontrolle induzierte ebenfalls in allen Kulturen ähnlich starke die Zytokinproduktion.

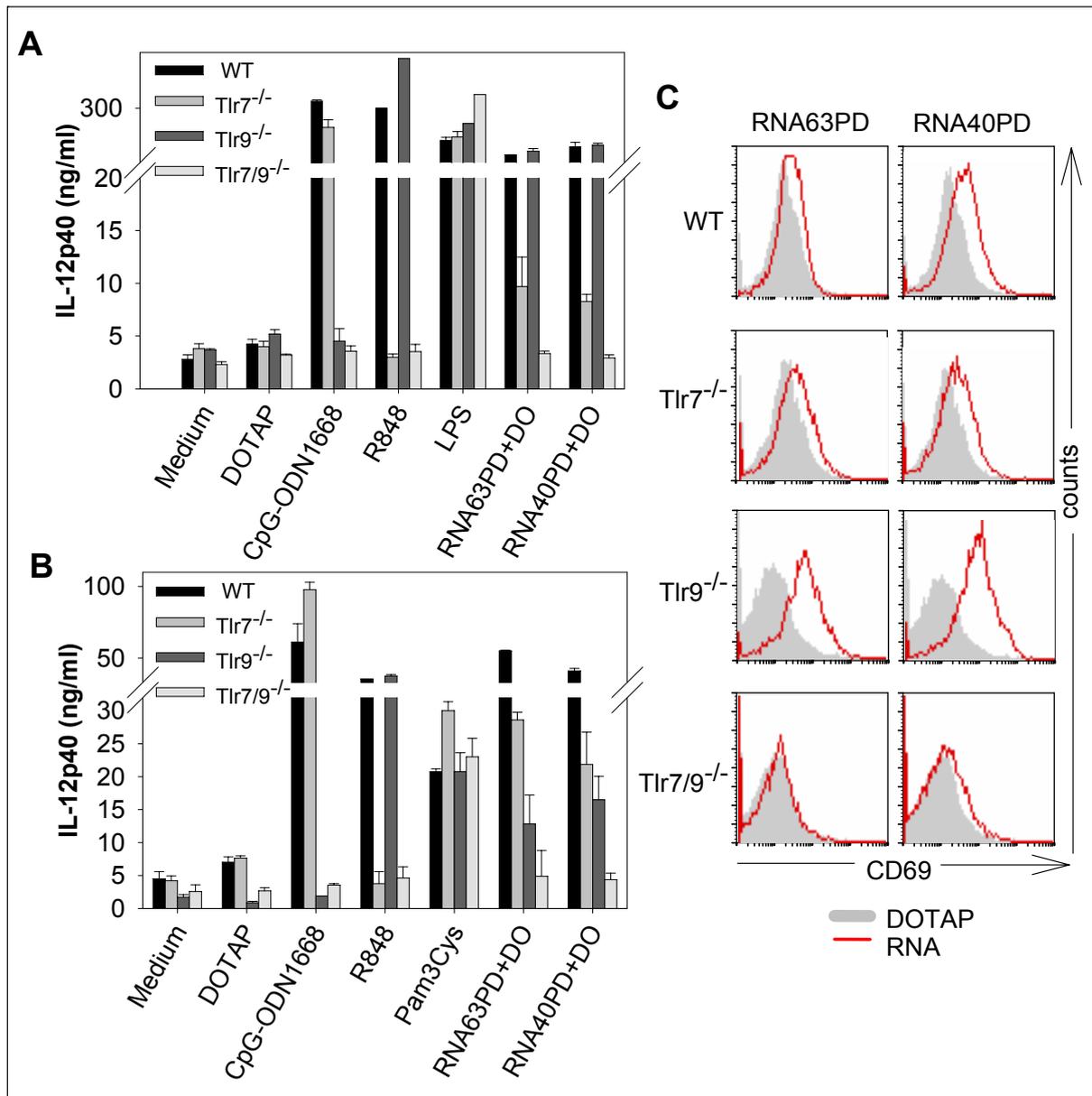
Interessanterweise reagierten Tlr3-defiziente Zellen sowohl bei der Zytokinproduktion als auch bei der Expression von CD40 und CD69 ähnlich auf die Stimulation mit RNA-Oligonukleotiden wie die WT-Zellen. Tlr3/7-defiziente Zellen verhielten sich ihrerseits den Tlr7<sup>-/-</sup>-Zellen analog.

Nachdem nun die Tlr7-unabhängige Stimulation mit PD-RNA in den Tlr3/7-doppel-*knockout*-Zellen ähnlich stark wie in den Tlr7-*single-knockout*-Zellen war, scheint Toll-like Rezeptor 3 kein Einfluß auf die Tlr7-unabhängige Erkennung von PD-RNA zu besitzen.

### 3.2.6 Tlr9 ist ein weiterer Rezeptor für PD-RNA

Nachdem Tlr3 als Rezeptor für PD-RNA ausgeschlossen wurde, verblieben von den endosomalen Myd88-abhängigen Toll-like Rezeptoren nur noch Tlr8 und Tlr9 als Kandidaten. Ursprünglich wurde sequenzspezifische CpG-DNA als Ligand für Tlr9 beschrieben (Bauer et al., 2001). Mittlerweile ist bekannt, dass Tlr9 auch DNA ohne CpG-Motive und ein chemisch nicht mit DNA verwantes Molekül Hemazoin – ein Abbauprodukt von Hämoglobin – erkennen kann (Coban et al., 2005; Sano et al., 2003; Vollmer et al., 2004). Die Spezifität von Tlr9 ist also nicht mehr so eng gefasst. Es ist nun durchaus vorstellbar, dass Tlr9 außer DNA auch andere Art von Nucleinsäuren, wie etwa RNA, erkennen kann. Für Tlr8 dagegen wurde in der Maus bis jetzt keine Funktion gezeigt (Heil et al., 2004; Jurk et al., 2002).

Um die Funktion von Tlr9 in der Tlr7-unabhängigen Erkennung von PD-RNA zu untersuchen, wurde die Responsivität der Tlr7/9-doppel-*knockout*-Mäuse auf die Stimulation mit PD-RNA überprüft. Dafür wurden GM-CSF- und konventionelle Dendritische Zellen aus den Flt3L-Kulturen der WT-, Tlr7<sup>-/-</sup>-, Tlr9<sup>-/-</sup>- und Tlr7/9<sup>-/-</sup>-Mäuse stimuliert. Die Stimulation mit PD-RNA induzierte in WT- und Tlr9-defizienten GM-CSF-Zellen eine vergleichbar starke Zytokinproduktion. Die Tlr7-*knockout*-Zellen aus der GM-CSF-Kultur wurden durch die PD-RNA wie erwartet leicht stimuliert, während die Tlr7/9-defizienten Zellen auf die PD-RNA gar nicht reagierten. Nachdem die LPS-Kontrollstimulation in allen vier Kulturen vergleichbar war, scheint tatsächlich Tlr9 neben Tlr7 in GM-CSF-Dendritischen Zellen für die Erkennung von PD-RNA verantwortlich zu sein (Abb. 3.17A).



**Abb. 3.17: Tlr9 erkennt PD-RNA.** GM-CSF- und Flt3-Kulturen aus WT-, Tlr7<sup>-/-</sup>, Tlr9<sup>-/-</sup> und Tlr7/9<sup>-/-</sup>-Mäusen wurden angesetzt. Die Zellen wurden mit 0,5  $\mu$ M ODN1668, 2  $\mu$ g/ml R848, 0,1  $\mu$ g/ml LPS, 1  $\mu$ g/ml Pam3Cys und 1  $\mu$ M RNA (DO, 12,5  $\mu$ g/ml) stimuliert. Nach 30 Stunden wurde die Zytokinproduktion in GM-CSF-DZ (A) und cDZ aus der Flt3-Kultur (B) und die Expression von CD69 in cDZ (C) bestimmt.

Die konventionellen Dendritischen Zellen aus der Flt3L-Kultur lieferten ein ähnliches Bild. Die Stimulation von Tlr7/9-defizienten Zellen mit PD-RNA führte zu keiner Zytokinproduktion, während die WT-, Tlr7<sup>-/-</sup> und Tlr9<sup>-/-</sup>-Zellen nach der Behandlung mit PD-RNA die Zytokinproduktion und die CD69-Expression erhöhten (Abb. 3.16 B, C). Interessanterweise war die PD-RNA induzierte Zytokinproduktion, aber nicht die CD69-Expression, in Tlr9-defizienten Zellen wie in Tlr7-defizienten Zellen ähnlich stark reduziert. In diesen Zellen sind also beide Rezeptoren, Tlr7 und Tlr9, für die

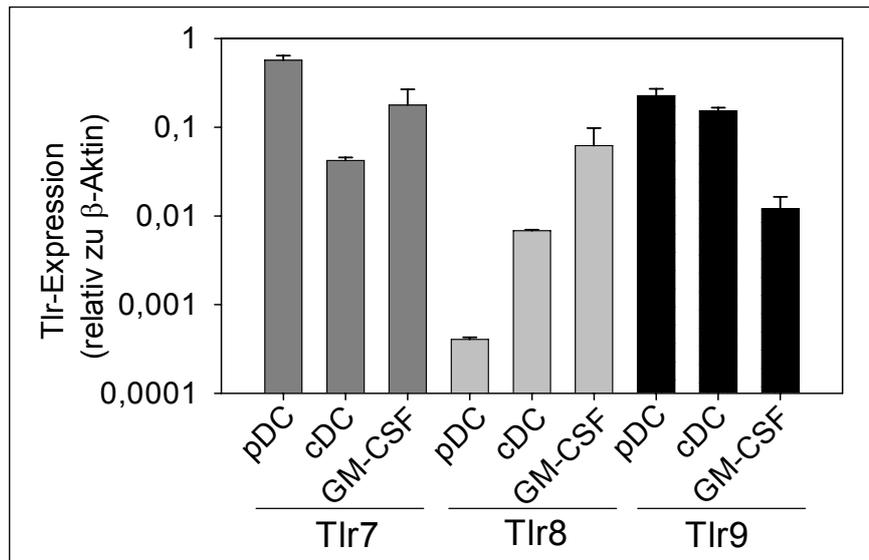
optimale Erkennung von PD-RNA notwendig. Die Vergleichbarkeit der Zellen aus verschiedenen Kulturen war hier ebenfalls durch die Überprüfung der Lebensfähigkeit und die Pam3Cys-Kontrollstimulation gewährleistet.

Anhand der *Tlr7/9-knockout*-Zellen konnten wir nun zeigen, dass in Dendritischen Zellen myeloiden Ursprungs neben Tlr7 auch Tlr9 für die Erkennung von einzelsträngiger Phosphodiester-RNA verantwortlich ist.

### **3.2.7 Expression von Tlr7, 8 und 9 in verschiedenen Dendritischen Zellen**

Nachdem gezeigt wurde, dass in Zellen myeloiden Ursprungs neben Tlr7 auch Tlr9 für die Erkennung von Phosphodiester-RNA zuständig ist, stellt sich die Frage, warum in den plasmazytoiden Dendritischen Zellen, die auch Tlr7 und Tlr9 exprimieren, der Tlr7-unabhängige Mechanismus der PD-RNA-Erkennung nicht funktional ist. Um dieses Phänomen zu erklären, kann ein cDZ-spezifischer Kofaktor für Tlr9 postuliert werden. Als möglicher Korezeptor aus der Tlr-Familie käme Tlr8 in Frage. Deswegen wurde mit Hilfe von *TaqMan* die Expression von Tlr7, 8 und 9 in GM-CSF-Dendritischen Zellen, konventionellen DZ und plasmazytoiden DZ untersucht.

Die Expression von Tlr7 und 9 war in allen drei Zelltypen vergleichbar hoch (Abb 3.18). Nur die Expression von Tlr8 war in plasmazytoiden Dendritischen Zellen im Vergleich zu GM-CSF-DZ und cDZ auffällig niedrig. Plasmazytoide Dendritische Zellen exprimierten nur ein Bruchteil der Menge an mTlr8, etwa 1/16 im Vergleich zu cDZ und etwa 1/150 im Vergleich zu GM-CSF-DZ. Vorstellbar wäre also, dass Tlr8 für die Erkennung von PD-RNA durch Tlr9 notwendig ist. In plasmazytoiden DZ, die Tlr8 sehr viel schwächer exprimieren, würde die PD-RNA deswegen nicht erkannt werden.



**Abb. 3.18: Expression von Toll-like Rezeptoren 7, 8 und 9 in unterschiedlichen Typen der Dendritischen Zellen.** Die Expression von Tlr7, 8 und 9 wurde mit Hilfe von TaqMan untersucht. Die Höhe der Tlr-Expression ist relativ zur  $\beta$ -Aktin-Expression dargestellt.

### 3.3 Die Methylierung des Sense-Stranges von siRNA verhindert ihre unerwünschte Immunstimulation

Synthetische siRNA wird eingesetzt, um die Expression spezifischer Gene zu vermindern. Seit einiger Zeit ist nun bekannt, dass bestimmte Sequenzen von siRNA die Zellen des Immunsystems aktivieren und die Produktion von Zytokinen *in vitro* und *in vivo* induzieren können (Kariko et al., 2004a; Sioud and Sorensen, 2003). Da die Immunstimulation während der Behandlung mit siRNA in der Regel unerwünscht ist, wurde nach einfachen Modifikationen gesucht, die die immunstimulativen Eigenschaften der siRNA aufheben, ihr *Silencing*-Potenzial aber nicht beeinträchtigen.

Czauderna et al. (2003) zufolge erhöht die 2'-O-Methylierung der Ribose an bestimmten, leider schlecht definierten, Stellen die Stabilität von siRNA, ohne dabei ihre Funktionalität zu beeinflussen. Außerdem ist bekannt, dass die Methylierung der Ribose oder der Basen in den RNA-Oligonukleotiden zum Verlust ihrer Immunstimulatorischen Eigenschaften führt (Kariko et al., 2005). Wir wollten untersuchen, wie sich 2'-O-Ribose-Methylierung von siRNA sowohl auf die immunstimulatorischen als auch auf die *Silencing*-Eigenschaften auswirkt. Wir untersuchten die Modifikation an zwei verschiedenen Beispielen: Zunächst wurde eine eGFP-spezifische siRNA in HEK293-Zellen und Immunzellen untersucht, und

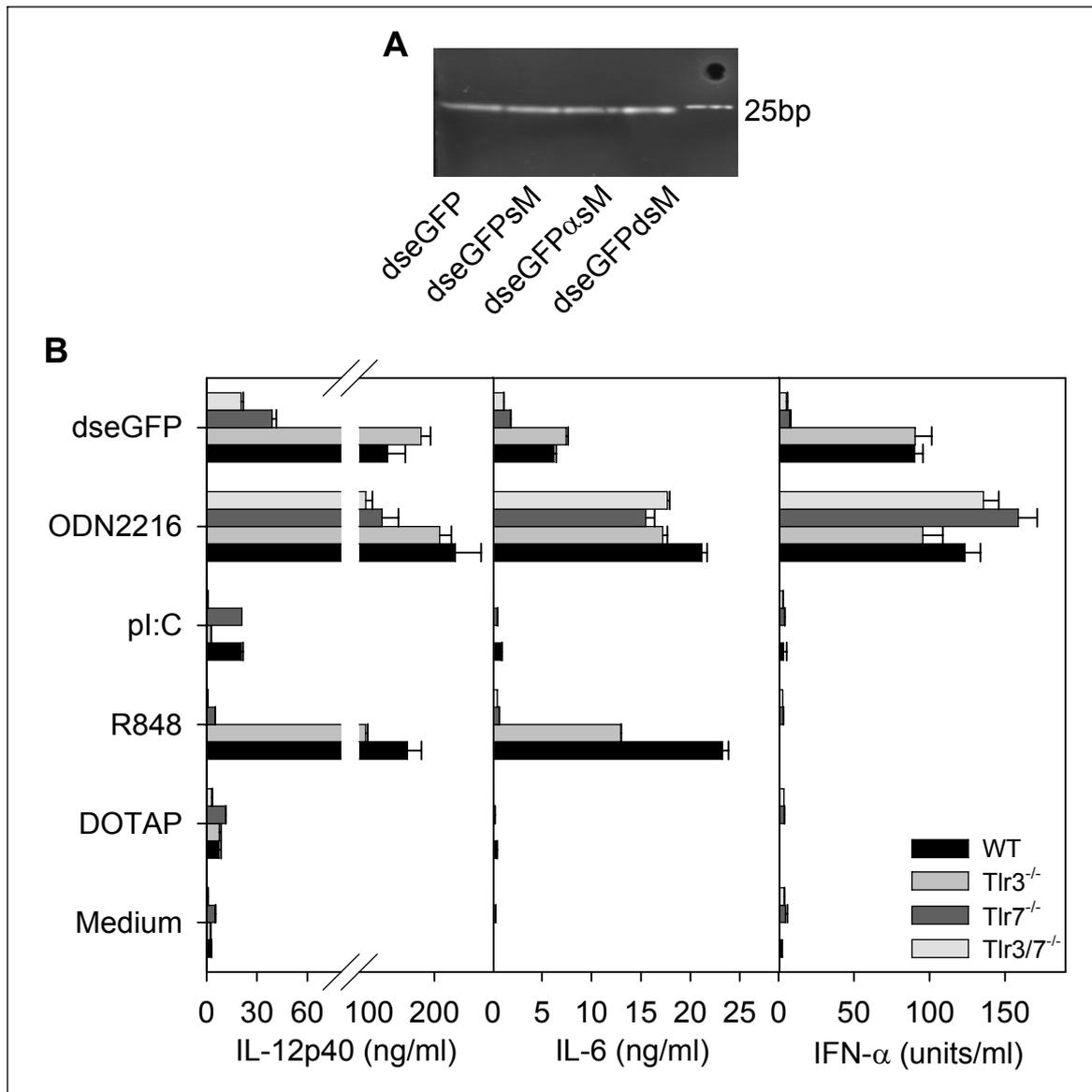
dann eine gegen murines Mikroglobulin- $\beta$ 2 gerichtete siRNA in murinen Immunzellen getestet.

Die einzelnen Stränge für die siRNAs wurden in modifizierter und unmodifizierter Form (für Sequenzen siehe 2.1.3) synthetisiert. Bei der modifizierten Form wurde dabei jedes zweite Nukleotid an der 2'-O-Ribose methyliert. Für jede siRNA-Gruppe wurden dann aus den Einzelsträngen vier verschiedene Kombinationen hergestellt: unmethylierter *Sense*- / unmethylierter *Antisense*-Strang (dseGFP bzw. dsmMb2), methylierter *Sense*- / unmethylierter *Antisense*-Strang (dseGFPsM bzw. dsmMb2sM), unmethylierter *Sense*- / methylierter *Antisense*-Strang (dseGFPasM bzw. dsmMb2asM), methylierter *Sense*- / methylierter *Antisense*-Strang (dseGFPdsM bzw. dsmMb2dsM). Die Ethidium-Bromid-Färbung von vier eGFP-siRNAs ist in der Abb. 3.19A dargestellt.

Die *Silencing*-Aktivität der mMb2-siRNAs wurde in primären Immunzellen, die der eGFP-siRNAs in HEK293-Zellen und eGFP-transgenen primären Immunzellen untersucht. Davor wurden die siRNAs und die einzelnen RNA-Stränge auf die Immunstimulation getestet .

### 3.3.1 SiRNA stimuliert das Immunsystem über Tlr7

Hornung et al. (2005) zeigte, dass TLR7 in humanen plasmazytoiden Dendritischen Zellen die Erkennung der siRNA vermittelt. Allerdings gibt es auch Berichte, dass TLR3 für die Erkennung von siRNA zuständig ist (Kariko et al., 2004a). Um die Beteiligung von Toll-like Rezeptoren an der Erkennung von siRNA zu analysieren, wurden Flt3L-Kulturen aus dem Knochenmark von WT-, Tlr3<sup>-/-</sup>, Tlr7<sup>-/-</sup> und Tlr3/7<sup>-/-</sup>-Mäusen angesetzt und mit unmethylierter eGFP-siRNA (dseGFP) stimuliert. SiRNA stimulierte Tlr3-defiziente Zellen genauso gut wie WT-Zellen, Tlr7- und Tlr3/7-*knockout*-Zellen wurden durch siRNA dagegen kaum stimuliert (Abb. 3.19B). Wir konnten also bestätigen, dass siRNA Flt3L-generierte Zellen über Tlr7 und über Tlr3 stimuliert.

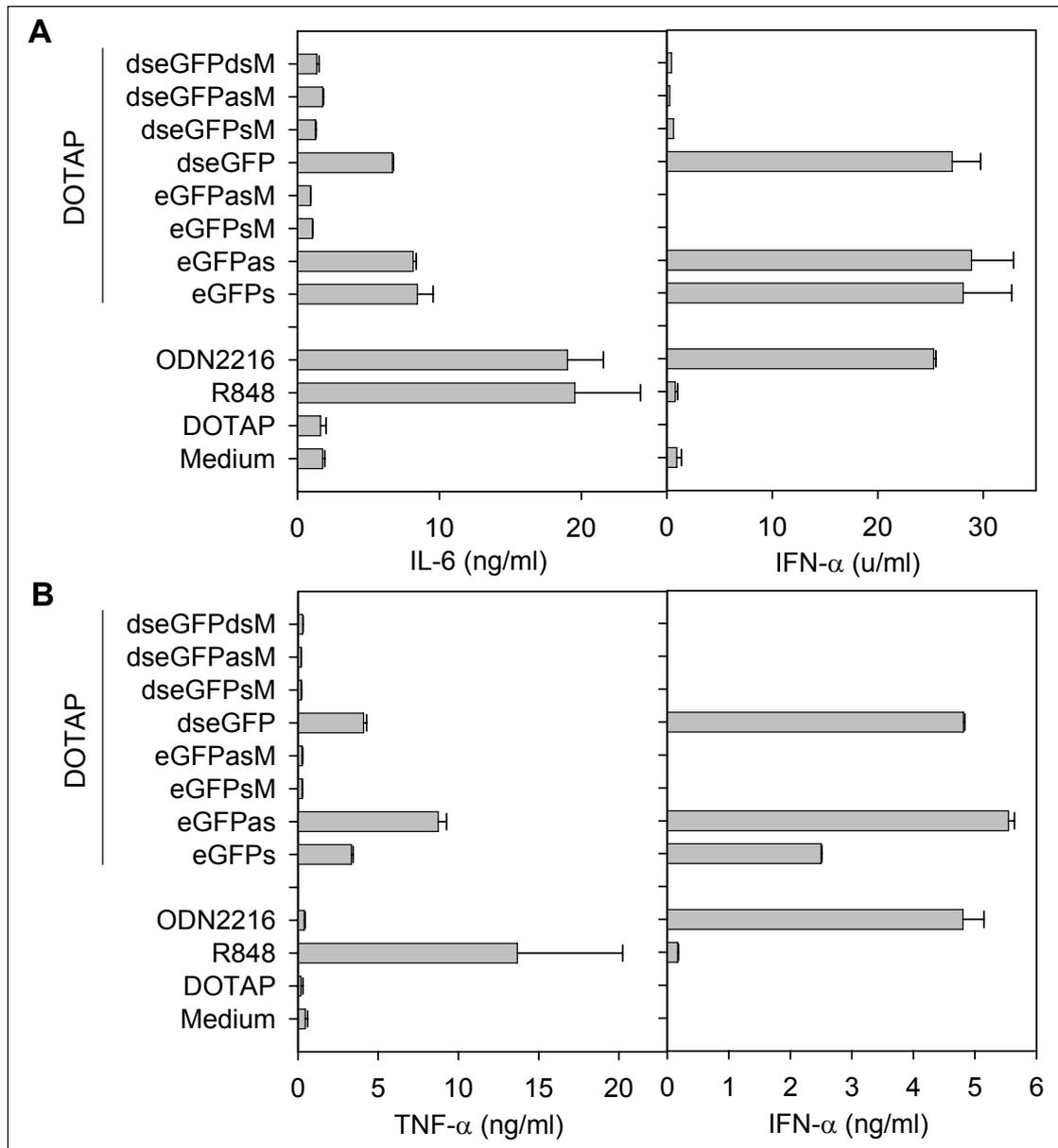


**Abb. 3.19: Tlr7 vermittelt die Erkennung von siRNA in Flt3L-generierten Zellen.** A: Ethidium-Bromid-Färbung von vier eGFP-siRNAs aufgetrennt in einem 8% Acrylamidgel, B: WT-, Tlr3<sup>-/-</sup>, Tlr7<sup>-/-</sup>- und Tlr3/7<sup>-/-</sup>-Zellen wurden mit 0,5  $\mu$ M ODN2216, 2  $\mu$ g/ml R848, 50  $\mu$ g/ml pl:C und 1  $\mu$ M RNA (DO, 12,5  $\mu$ g/ml) stimuliert.

### 3.3.2 Durch die Methylierung einzelner Stränge der siRNA kann die Immunstimulation vermieden werden

Die immunstimulativen Eigenschaften der vier doppelsträngigen eGFP-siRNAs und der einzelnen Stränge wurden in murinen Flt3L-Kulturen und in humanen PBMC getestet. Nur die unmethylierte dseGFP-siRNA und die unmethylierten Einzelstränge induzierten IFN- $\alpha$ , TNF- $\alpha$  und IL-6 in humanen und murinen Zellen. Die Methylierung der Ribose führte dagegen zum vollständigen Verlust der immunstimulierenden Eigenschaften sowohl der Einzelstränge als auch der siRNA, wobei die Methylierung

nur eines Stranges in der siRNA ausreichte (Abb. 3.20).



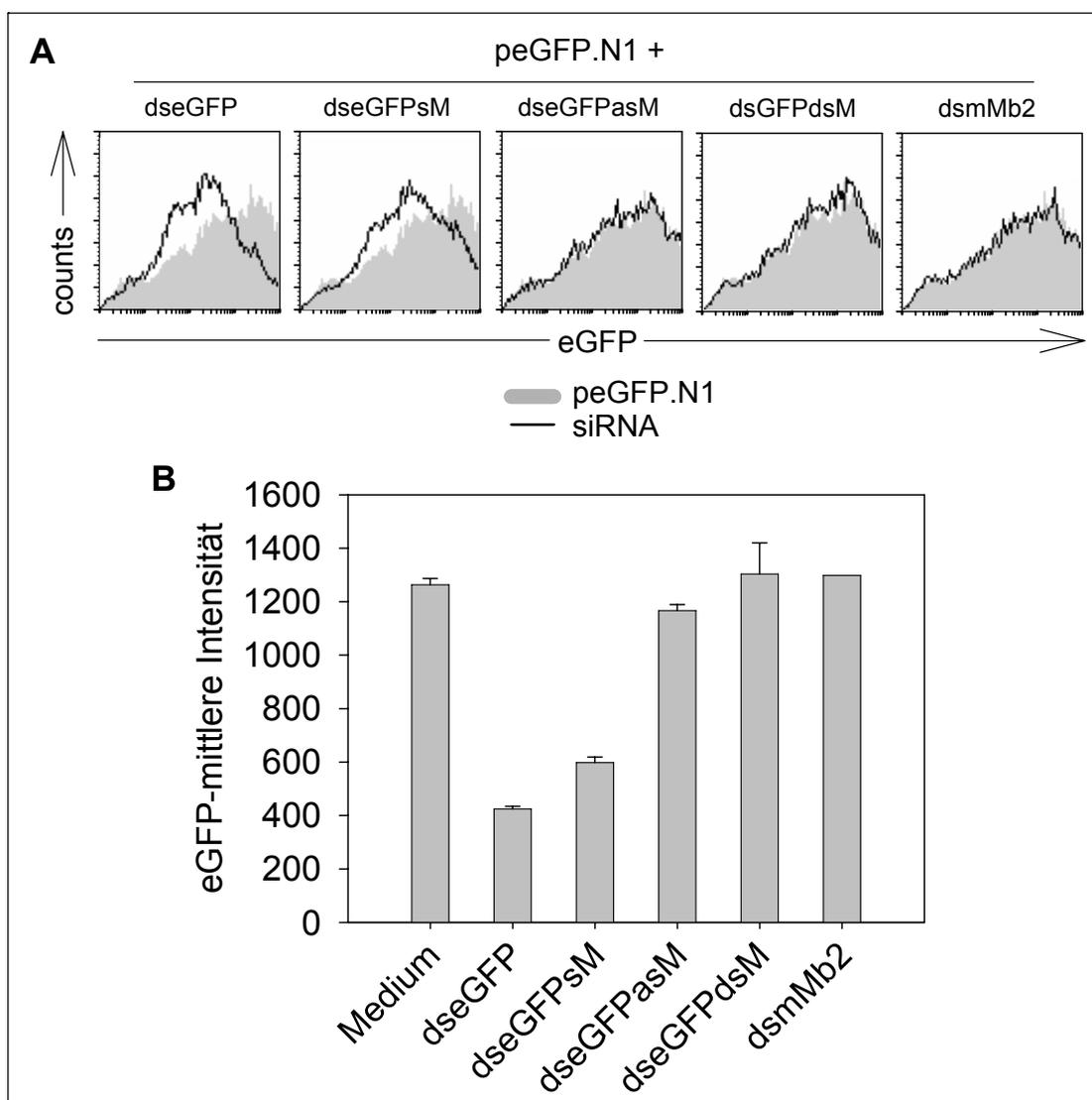
**Abb. 3.20: 2'-O-Ribose-Methylierung führt zum Verlust der Immunstimulation.** Flt3L-Zellen (A) und PBMC (B) wurden mit 0,5  $\mu$ M ODN2216, 2  $\mu$ g/ml R848 und 1  $\mu$ M mit DOTAP komplexierter RNA (DO, 12,5  $\mu$ g/ml) stimuliert.

### 3.3.3 Die Methylierung des Sense-Stranges beeinflusst nicht die Silencing-Aktivität der siRNA in HEK293-Zellen

Die Auswirkungen der Methylierung der einzelnen siRNA-Stränge auf die *Silencing*-Aktivität wurden zuerst in HEK293-Zellen untersucht. Dafür wurden sie mit einem eGFP-Plasmid (peGPF.N1+) und siRNAs gleichzeitig transfiziert. Nach 48 Stunden wurde dann die Fluoreszenzintensität von eGFP bestimmt.

Die unmethylierte eGFP-siRNA (dseGFP) und die am *Sense*-Strang methylierte siRNA (dseGFPsM) reduzierten deutlich die eGFP-Expression, die am *Antisense*-Strang (dseGFPasM) und an beiden Strängen methylierte siRNA (dseGFPdsM) verloren dagegen die *Silencing*-Aktivität. Die als Kontrolle eingesetzte mMb2-siRNA hatte keinen Effekt auf die eGFP-Expression (Abb. 3.21).

Ein derart modifizierter *Antisense*-Strang scheint also die *Silencing*-Aktivität der siRNA zu unterbinden. Die Methylierung des *Sense*-Stranges dagegen beeinflusst diese nicht. SiRNA mit einem unveränderten *Antisense*- und einem methylierten *Sense*-Strang kann also für die Genregulation eingesetzt werden.



**Abb. 3.21: Die Methylierung des *Sense*-Stranges beeinflusst nicht die *Silencing*-Aktivität der siRNA in HEK293-Zellen.**  $3 \times 10^6$  HEK293-Zellen wurden gleichzeitig mit 2  $\mu$ g peGFP.N1+-Vektor und 4  $\mu$ g siRNAs transfiziert. Nach 48 Stunden wurde die eGFP-Intensität im FACS bestimmt. A: exemplarische Darstellung der eGFP-Expression, B: graphische Darstellung der Ergebnisse aus zwei Experimenten.

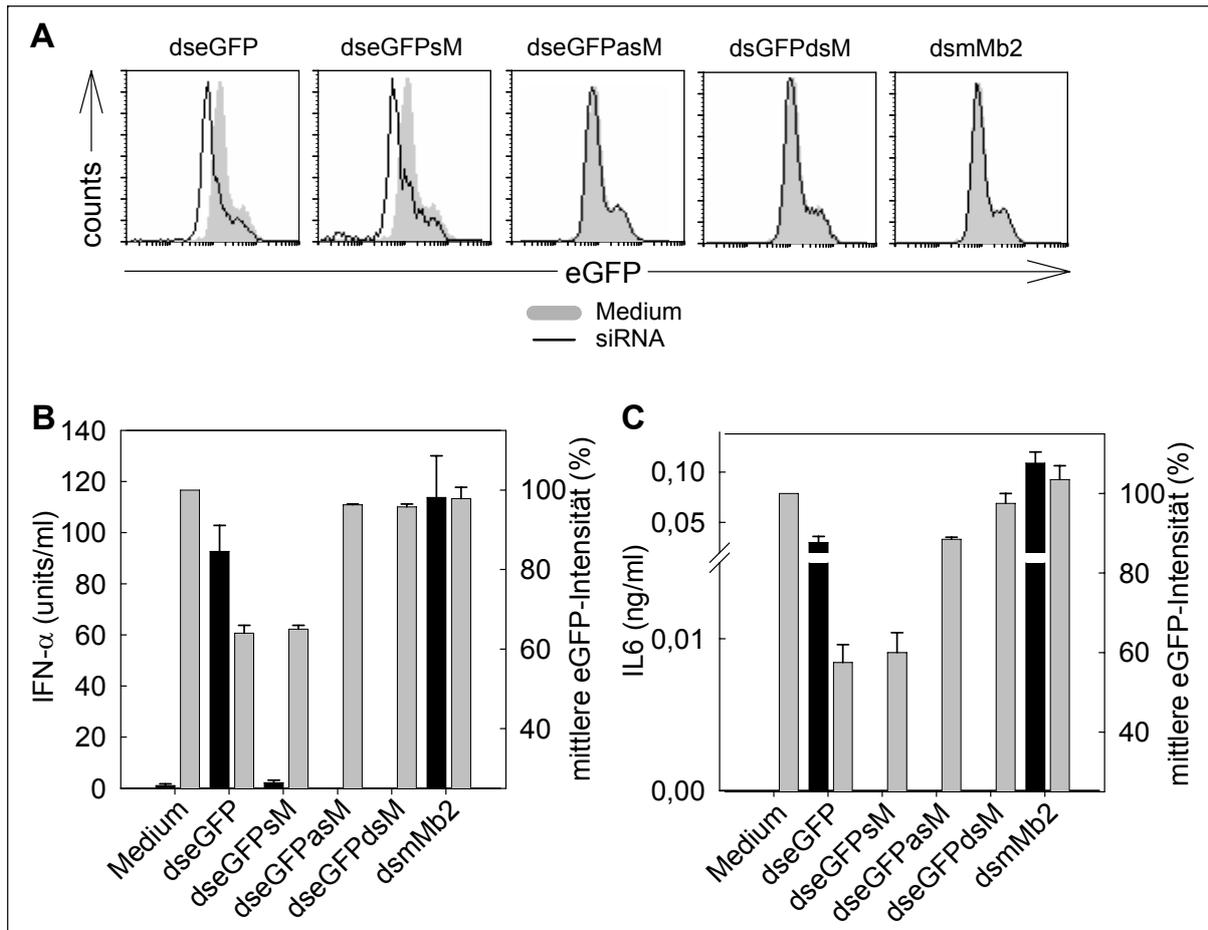
### 3.3.4 Methylierung des *Sense*-Stranges verhindert bei bleibender *Silencing*-Aktivität die Immunstimulation durch die siRNA

Als nächstes wurde das Verhalten der eGFP-siRNA in primären Dendritischen Zellen (Flt3L-Kultur) und Makrophagen getestet. Die Transfektion der siRNA erfolgte dabei auf folgende Weise: Um die *Silencing*-Aktivität der siRNA festzustellen, wurden die eGFP-transgenen Zellen mit siRNA elektroporiert. Für die Zytokinproduktion wurde die siRNA mit Hilfe der Liposomen in die Zellen transfiziert.

Die unmethylierte eGFP-siRNA (dseGFP) reduzierte wie erwartet die eGFP-Expression, induzierte aber IFN- $\alpha$  in eGFP-transgenen Flt3L-kultivierten Dendritischen Zellen (Abb. 3.22 A, B) und IL-6 in Makrophagen (Abb. 3.22C). Die siRNA, die aus dem methylierten *Sense*- und unmethylierten *Antisense*-Strang bestand, zeigte die selbe Effizienz bei der Reduktion der Genexpression, induzierte dabei aber keine Zytokine in beiden Zelltypen. Die siRNA mit dem unmethylierten *Sense*- / methylierten *Antisense*-Strang (eGFPasM) und die siRNA mit beiden methylierten Strängen waren nicht immunstimulatorisch, konnten allerdings die eGFP-Expression nicht suprimieren. Als Kontrolle wurde die immunstimulatorische mMb2-siRNA verwendet, die immunstimulatorisch war, aber keinen Einfluß auf die eGFP-Expression zeigte.

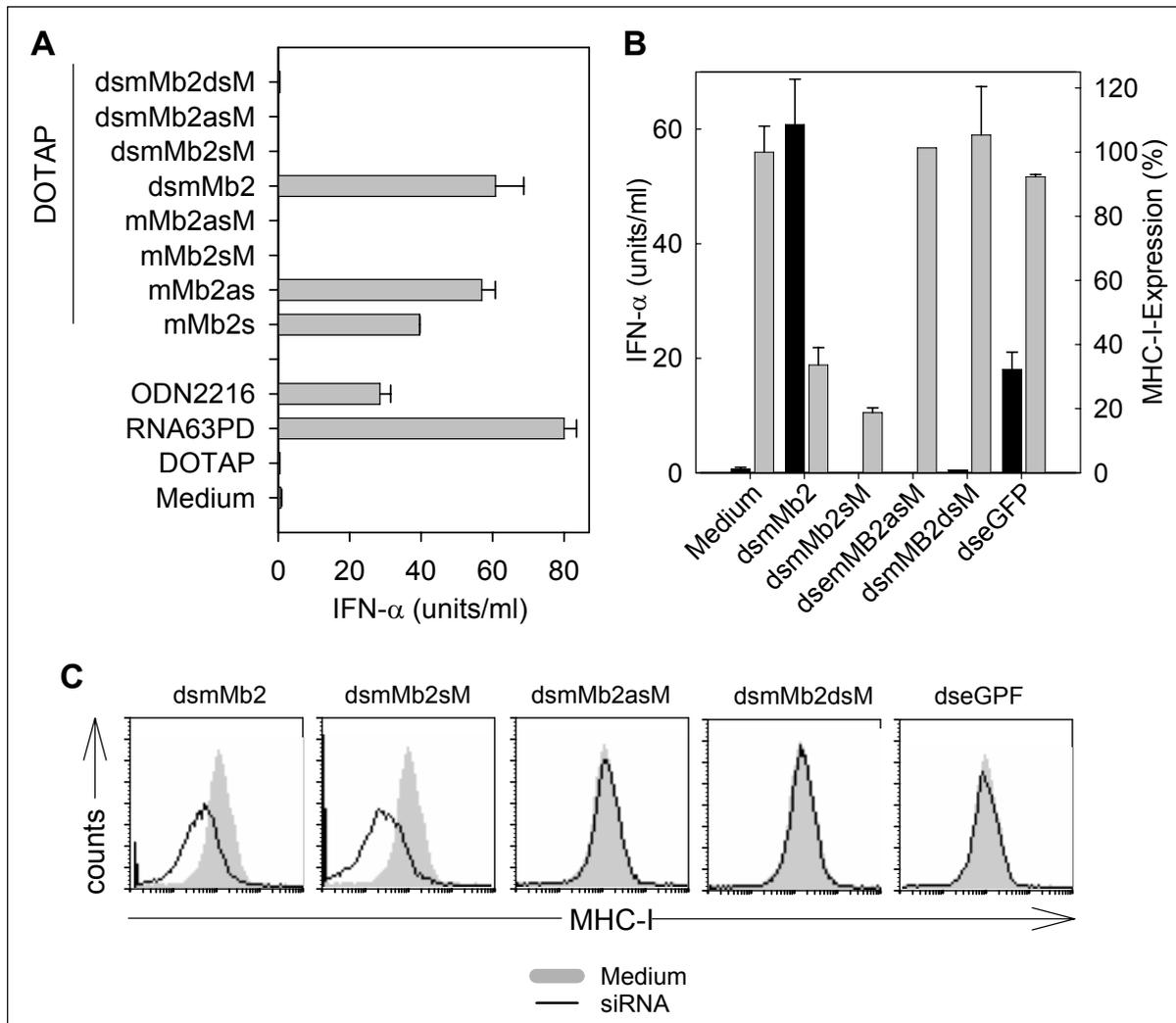
Die bisher dargestellten Ergebnisse demonstrieren, dass die 2'-O-Ribose-Methylierung des *Sense*-Stranges bei bleibender *Silencing*-Aktivität die immunstimulatorischen Eigenschaften der verwendeten eGFP-siRNA inhibiert. Um die Übertragbarkeit dieser Beobachtung auf andere siRNAs zu zeigen, wurden ähnliche Experimente mit einer gegen das murine Mikroglobulin- $\beta$ 2 gerichteten siRNA durchgeführt.

Um die *Silencing*-Aktivität von mMb2-siRNAs zu untersuchen, wurde im FACS die Expression von MHC-Klasse-I-Molekül (MHC-I) bestimmt. Dieses besteht aus zwei Untereinheiten, der  $\alpha$ -Kette und dem Mikroglobulin- $\beta$ 2. Ohne Mikroglobulin- $\beta$ 2 ist das MHC-I-Molekül instabil und gelangt nicht an die Oberfläche. Oberflächendetektion von MHC-I ist also eine geeignete Methode, Veränderungen in der Mikroglobulin- $\beta$ 2-Expression festzustellen.



**Abb. 3. 22: Methylierung des Sense-Stranges der eGFP-siRNA verhindert bei bleibender *Silencing*-Aktivität die Immunstimulation.**  $2 \times 10^6$  Flt3L-DZ (A und B) oder Makrophagen (C) wurden mit je  $3,5 \mu\text{g}$  siRNA elektroporiert und nach 48 Stunden im FACS analysiert (A). Die mittlere eGFP-Intensität aus zwei Experimenten (graue Balken) ist relativ zu der in den ohne siRNA elektroporierten Zellen angegeben. Die Zytokinproduktion (schwarze Balken) wurde nach einer 30-stündigen Inkubation der Zellen mit DOTAP-komplexierten siRNAs gemessen.

Die Experimente mit den mMb2-siRNAs lieferten ähnliche Ergebnisse. Die Methylierung der einzelnen Stränge der siRNAs führte ebenfalls zum vollständigen Verlust der immunstimulierenden Eigenschaften (Abb. 3.23A). Die siRNA, die aus dem methylierten *Sense*- und unmethylierten *Antisense*-Strang (dsmMb2sM) bestand, induzierte also keine Zytokine und hatte ähnlich gute *Silencing*-Aktivität wie die unmethylierte mMb2-siRNA (Abb. 3.23 B und C). Wie erwartet inhibierte die Methylierung des *Antisense*-Stranges die Reduktion der mMb2-Expression.



**Abb. 3. 23: Methylierung des Sense-Stranges in der mMb2-siRNA verhindert ebenfalls bei bleibender *Silencing*-Aktivität die Immunstimulation.** A: Flt3L-Zellen wurden mit 0,5  $\mu$ M ODN2216 und 1  $\mu$ M mit DOTAP komplexierter RNA (DO, 12,5  $\mu$ g/ml) stimuliert. B, C:  $2 \times 10^6$  Flt3L-DZ wurden mit je 3,5  $\mu$ g siRNA elektroporiert und nach 48 Stunden im FACS analysiert. B: Die mittlere MHC-I-Expression aus zwei Experimenten (graue Balken) ist relativ zu der in den ohne siRNA elektroporierten Zellen angegeben. Die Zytokinproduktion (schwarze Balken) wurde nach einer 30-stündigen Inkubation der Zellen mit DOTAP-komplexierten siRNAs gemessen. C: exemplarische Darstellung der FACS-Färbung.

Somit konnten wir zeigen, dass durch die Methylierung des *Sense*-Stranges einer siRNA Immunstimulation vermieden werden kann, die *Silencing*-Aktivität aber unbeeinflusst bleibt. Da diese Art der Modifikation an zwei verschiedenen siRNAs erfolgreich getestet wurde, scheint diese Theorie außerdem universell einsetzbar zu sein.

## 4 Diskussion

### 4.1 Immunstimulatorische Eigenschaften von RNA als Adjuvans

#### 4.1.1 RNA als Adjuvans induziert eine gemischte T<sub>H</sub>1/T<sub>H</sub>2-Immunantwort

Bislang ist Aluminiumhydroxid das einzige für den Menschen zugelassene Adjuvans. Es ist relativ schwach und induziert eher eine humorale T<sub>H</sub>2-Immunantwort (O'Hagan et al., 2001). Die Bekämpfung von intrazellulären Pathogenen erfordert jedoch eine T<sub>H</sub>1-Antwort, die mit der IFN- $\gamma$ -Sekretion und Induktion von antigenspezifischen zytotoxischen T-Zellen zur Zerstörung von Pathogenen und der von diesen befallenen Zellen führt. Die meisten TLR-Liganden, unter anderem auch CpG-DNA und einzelsträngige immunstimulatorische RNA, induzieren *in vitro* die Produktion von T<sub>H</sub>1-Zytokinen wie IFN- $\alpha$  und IL-12. Die Eignung von TLR-Liganden als Adjuvantien wurde deswegen vielfach untersucht (Gustafson and Rhodes, 1992; Lee et al., 2006; Ulrich and Myers, 1995). CpG-DNA erwies sich als der potenteste T<sub>H</sub>1-Immunität induzierende Tlr-Ligand im Mausmodell. Sie induziert, gemessen an der Fähigkeit zur Differenzierung von zytotoxischen und IFN- $\gamma$  produzierenden Zellen, sogar eine stärkere T<sub>H</sub>1-Antwort als das Freud'sche Adjuvans (Krieg, 2002).

Auch die immunstimulatorischen Eigenschaften von RNA als Adjuvans wurde bereits von Scheel et al. (2004) untersucht. Sie konnten zeigen, dass gleichzeitige Injektion von  $\beta$ -Galaktosidase und RNA die Produktion von anti- $\beta$ -Galaktosidase-spezifischen Antikörpern induziert. Die RNA-induzierte zelluläre Immunität wurde allerdings bis jetzt nicht genau erforscht. Wir führten also weitere Experimente durch, die die humorale und vor allem die zytotoxische Immunantwort auf die Impfung mit RNA als Adjuvans ausführlicher beschreiben.

Im Vergleich zur CpG-DNA induzierte RNA als Adjuvans eine schwächere, aber nichtsdestotrotz deutliche zytotoxische Immunität. Etwa 5% aller CD8<sup>+</sup>-Zellen waren nach einer zweifachen Injektion mit RNA als Adjuvans und Ovalbumin als Antigen antigenspezifisch. Diese Zellen produzierten IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$  nach der Stimulation mit dem Antigen und waren in der Lage, antigenbeladene Zielzellen zu zerstören. Diese Ergebnisse deuten auf eine eher T<sub>H</sub>1-orientierte Immunreaktion hin.

RNA und CpG-DNA als Adjuvantien induzierten beide eine vergleichbar starke Produktion von Ova-spezifischen IgG-Antikörpern. Dabei induzierte CpG-DNA wie erwartet mehr Antikörper vom IgG2a- bzw. IgG2c- als vom IgG1-Typ. Der zuletzt genannte Antikörperisotyp entsteht bei einer  $T_H2$ -Immunantwort. Der Isotypenwechsel zum IgG2a- bzw. IgG2c-Isotyp erfolgt dagegen bei einer  $T_H1$ -Immunreaktion und wird bei bakteriellen und viralen Infektionen beobachtet (Westwood et al., 2006). Der Wechsel zum IgG2a-Typ fiel nach Stimulation von Tlr4 und Tlr7 nicht so deutlich aus (Durand et al., 2004). In unseren Experimenten induzierte RNA eine starke Produktion von Ova-spezifischen IgG1-Antikörpern und eine sehr schwache Produktion von IgG2a bzw. IgG2c, was auf eine Immunantwort vom  $T_H2$ -Typ hindeutet. Ähnlich durchgeführte Experimente von Sheel et al. (2004) und Westwood et al. (2006) zeigten nach der Injektion mit RNA als Adjuvans ebenfalls eine starke IgG1-Produktion. Interessanterweise berichten Riedl et al. (2002) von der Induktion von  $T_H1$ -Antikörpern nach der Injektion mit einem HBV-Protein, HBcAg, das kleine Mengen an RNA gebunden hat. Ein homologes HBV-Protein ohne RNA induzierte dagegen  $T_H2$ -Antikörper (Riedl et al., 2002). RNA als Adjuvans scheint also eine gemischte Immunantwort auszulösen. Eine potente zytotoxische Immunantwort deutet auf die  $T_H1$ -Immunreaktion hin, während die Verteilung der Antikörperisotypen eine Immunantwort vom  $T_H2$ -Typ impliziert. RNA könnte also als Adjuvans gegen Pathogene, die eine derartige Kombination der Immunreaktion erfordern, eingesetzt werden.

#### **4.1.2 Die Impfung mit RNA induziert ein immunologisches Gedächtnis und schützt bei einer Infektion mit *Listeria monocytogenes***

*Listeria monocytogenes* ist ein intrazelluläres Bakterium, das eine in Deutschland meldepflichtige Infektionskrankheit, Listeriose, hervorruft. Für die Eliminierung der Bakterien aus dem Körper ist eine Immunreaktion vom  $T_H1$ -Typ notwendig. Es ist insofern nicht überraschend, dass CpG-DNA als ein starkes  $T_H1$ -Adjuvans bei dieser Infektion optimal wirkt.

Mit unserem Listerien-Infektionsexperiment konnten wir einerseits demonstrieren, dass RNA als Adjuvans eine Immunität gegen ein komplexes Pathogen wie *Listeria monocytogenes* induzieren kann. Sie war dabei nicht so effektiv wie CpG-DNA, reduzierte aber deutlich die Anzahl der Listerien in der Milz und der Leber der infizierten Mäuse. Andererseits zeigte der Umstand, dass vier Wochen nach der

zweiten Injektion eine spezifische Immunantwort gegen Ova-transgene Listerien erfolgte, die Induktion eines immunologischen Gedächtnisses durch RNA als Adjuvans.

#### **4.1.3 Die Verwendung der RNA als Adjuvans ist sicherheitstechnisch unbedenklich**

Wiederholte Injektionen mit CpG-DNA können unerwünschte Nebenwirkungen durch die Überstimulation des Immunsystems hervorrufen. Ein Beispiel dafür ist die unkontrollierte B-Zell-Proliferation, die zur lebensgefährlichen Splenomegalie führt (Davila and Celis, 2000; Heikenwalder et al., 2004). In unseren Experimenten konnten wir nach der Injektion von CpG-DNA ebenfalls eine Splenomegalie feststellen. Die mit RNA behandelten Mäuse zeigten dagegen keine Anzeichen einer Milzvergrößerung. RNA ist somit zwar ein schwächeres, aber sichereres Adjuvans als CpG-DNA in der Maus. Diese Schlussfolgerungen können allerdings nicht unmittelbar auf den Menschen übertragen werden. Im humanen System erkennen zwei Rezeptoren immunstimulatorische RNA sehr gut, TLR7 und TLR8. Es ist durchaus möglich, dass das humane Immunsystem deswegen stärker als das murine auf die immunstimulatorische RNA reagiert, was dann zur Überstimulation des Immunsystems führen könnte. Die geringe Halbwertszeit von RNA im Serum macht dieses jedoch eher unwahrscheinlich.

#### **4.1.4 Die Tlr7-Abhängigkeit der RNA als Adjuvans**

Mit Hilfe von *in-vitro*-Experimenten mit murinen Zellen konnte gezeigt werden, dass in der Maus Toll-like Rezeptor 7 einzelsträngige RNA erkennt und das Immunsystem aktiviert (Heil et al., 2004). Unsere Experimente zeigten, dass Tlr7 auch *in vivo* dafür verantwortlich ist. RNA-induzierte Ova-spezifische Antikörperproduktion war in Tlr7-defizienten Mäusen im Vergleich zu WT-Mäusen deutlich reduziert und lag bei ähnlichen Werten wie in den WT-Mäusen, die kein Adjuvans erhielten. Tlr7 ist also sowohl *in vitro* als auch *in vivo* für die Vermittlung der RNA-induzierten Immunität notwendig. In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass Tlr9 neben Tlr7 in Zellen myeloiden Ursprungs die Erkennung von Phosphodiester-RNA übernimmt. Diese Tlr9-vermittelte PD-RNA-Stimulation scheint für eine Immunisierung mit RNA als Adjuvans allerdings nicht auszureichen.

## 4.2 Tlr9 erkennt Phosphodiester-RNA in Zellen myeloiden Ursprungs

### 4.2.1 Tlr9 ist ein neuer Rezeptor für PD-RNA

Muriner Tlr7 und humane TLR7 und TLR8 wurden als einzige Rezeptoren für einzelsträngige RNA beschrieben (Diebold et al., 2004; Heil et al., 2004). Da RNA ein labiles Molekül ist und im Serum relativ schnell durch RNA-Nukleasen abgebaut wird, wurden die zu diesen Erkenntnissen geführten Experimente mit RNA-Oligonukleotiden durchgeführt, die ein stabileres Phosphorothioat-modifiziertes (PTO) Grundgerüst besaßen. Diebold et al. und Heil et al. (2004) zeigten, dass die Stimulation mit PTO-RNA in der Maus vollständig Tlr7-abhängig war. Bei der Arbeit mit RNA fiel uns jedoch auf, dass die physiologische Phosphodiester-RNA (PD-RNA) im Unterschied zu PTO-RNA eine starke Tlr7-unabhängige Stimulation zeigte. PD-RNA verstärkte Tlr7-unabhängig die Expression von Aktivierungsmarkern und kostimulatorischen Molekülen hoch und induzierte die Produktion von proinflammatorischen Zytokinen. Zytoplasmatische Moleküle wie Rig-1 und Mda-5 können unabhängig von Tlr7 virale RNA erkennen und die Expression von IFN- $\beta$  aktivieren (Yoneyama et al., 2004). Diese Aktivierung ist allerdings unabhängig von Myd88, das ein Adaptormolekül in der Tlr-Signalkaskade ist und nur von Tlr benutzt wird. Nachdem der beobachtete Tlr7-unabhängige Effekt der PD-RNA Myd88-abhängig war, konnte die Beteiligung der zytoplasmatischen RNA-Erkennungsmoleküle ausgeschlossen werden und ein weiterer Tlr schien als Rezeptor für PD-RNA in Frage zu kommen.

Als nächstes konnten wir zeigen, dass für die Tlr7-unabhängige Erkennung von PD-RNA endosomale Reifung notwendig war. Diese ist für die Stimulation von intrazellulären Tlr-Rezeptoren, also Tlr 3, 7, 8 und 9, unentbehrlich. Der gesuchte Rezeptor musste also ein intrazellulärer Tlr sein. Als die Beteiligung von Tlr3 mit Hilfe der Tlr3/7-doppel-*knockout*-Zellen ausgeschlossen werden konnte, blieben nur noch Tlr8 und Tlr9 als mögliche Kandidaten zur Auswahl.

Für Tlr8 ist bis jetzt keine Funktionalität gezeigt worden (Heil et al., 2003). Es ist allerdings vorstellbar, dass Tlr8 zwar nicht das synthetische Imidazoquinolin R848 erkennt, das ein Ligand für murinen Tlr7 und humane TLR7 und TLR8 darstellt, aber durch PD-RNA stimuliert werden kann. Eine Tlr7/8 doppel-*knockout*-Maus durch Kreuzung der einzelnen *knockout*-Mäuse herzustellen, ist jedoch schwierig, da Gene für beide Rezeptoren nebeneinander auf dem X-Chromosom liegen, so dass die

Wahrscheinlichkeit für ein *cross-over* während einer Meiose relativ gering ist. Für unsere Experimente hatten wir deswegen keine Tlr7/8-doppel-*knockout*-Mäuse zu Verfügung und können somit die Beteiligung von Tlr8 an der Tlr7-unabhängigen PD-RNA-Erkennung nicht ausschließen.

Innerhalb der Tlr-Familie gibt es einen weiteren Rezeptor, der Nukleinsäuren erkennen, Tlr9. Er erkennt unmethylierte CpG-DNA-Sequenzen (Bauer et al., 2001). Da DNA und RNA chemisch relativ ähnlich sind, ist es durchaus vorstellbar, dass Tlr9 auch RNA erkennen könnte. Bis jetzt wurde allerdings weder für Tlr3 und Tlr7 noch für Tlr9 eine Kreuzreaktivität für die jeweils andere Art der Nukleinsäure gezeigt. Die Gene für Tlr7 und Tlr9 befinden sich auf zwei verschiedenen Chromosomen, dem Chromosom X und 9. Die Kreuzung der einzelnen *knockout*-Mäuse zur Tlr7/9-doppel-*knockout*-Maus war einfach möglich und so konnten wir zeigen, dass Tlr9 zusätzlich zur Tlr7 für die PD-RNA vermittelte Immunstimulation verantwortlich ist. Tlr9 zeigt also eine Kreuzreaktivität für beide Arten von Nukleinsäuren.

Daraus ergibt sich jedoch die Frage, warum Tlr9 Phosphodiester-RNA erkennen kann und Phosphorothioat-RNA nicht. Die beiden Arten von RNA unterscheiden sich etwas in ihren chemischen Eigenschaften. PTO-RNA-Oligonukleide besitzen einerseits niedrigere pKs-Werte als die PD-RNA-Oligonukleotide mit der gleichen Sequenz, andererseits sind sie stärker hydrophob als diese (Frey and Sammons, 1985; Stein et al., 1988). Es ist bereits bekannt, dass der pH-Wert für die Tlr9-vermittelte Stimulation des Immunsystems sehr wichtig ist (Rutz et al., 2004). Möglicherweise bildet PTO-RNA entweder durch ihre höhere Hydrophobizität oder Azidität im Endosom andere dreidimensionale Strukturen als PD-RNA, die dann von Tlr7 aber nicht von Tlr9 erkannt werden können.

Um die Aktivität von Toll-like Rezeptoren zu messen, kann ein Transfektionssystem verwendet werden, in dem ein TLR-Gen zusammen mit einem Reporterplasmid in eine TLR-defiziente Zelllinie (z. B. HEK293) transfeziert wird. Das Reporterplasmid trägt ein Teil des NF- $\kappa$ B-Promotors, der in der TLR-Signalkaskade aktiviert wird, und das Gen für die Glühwürmchen-Luziferase. Reagieren die mit bestimmten TLR transfezierten Zellen auf die Stimulation, wird die Luziferase exprimiert und kann in einem Luminometer gemessen werden. Leider konnten wir in HEK293-Transfektionsassay bis jetzt keine PD-RNA-Stimulation von Tlr9 zeigen. Allerdings konnte in diesen Zellen auch Tlr7 nicht mit RNA stimuliert werden (Heil et al., 2004).

Ein wichtiger Bestandteil des Erkennungs- oder Signalkomplexes, das in primären Immunzellen vorhanden ist, scheint in HEK293-Zellen zu fehlen.

#### **4.2.2 Nur myeloide Immunzellen erkennen PD-RNA Zellen über Tlr9**

Der Tlr7-unabhängige Stimulationseffekt konnte in konventionellen Dendritischen Zellen aus der Flt3L-Kultur, in GM-SCF-Dendritischen Zellen und in mit M-CSF generierten Makrophagen, aber nicht in plasmazytoiden DZ beobachtet werden. Plasmazytoide Dendritische Zellen erkennen PD-RNA also ausschließlich über Tlr7, während Zellen myeloiden Ursprungs PD-RNA zusätzlich über Tlr9 erkennen können. Die Expression von Tlr9 war allerdings in allen Zelltypen vergleichbar hoch und erklärt nicht den Umstand, dass pDZ trotz starker Tlr9-Expression keine Tlr7-unabhängige Erkennung von PD-RNA zeigen. Möglicherweise benötigt die Erkennung von PD-RNA durch Tlr9 die Anwesenheit eines weiteren cytoplasmatischen oder sekretorischen Proteins, das in pDZ nicht vorhanden ist. Auch die Beteiligung eines zweiten Rezeptors an der Erkennung von PD-RNA ist vorstellbar.

Die Expressionsanalyse von Toll-like Rezeptoren ergab, dass Tlr8 in pDZ viel schwächer exprimiert wird als in cDZ und GM-CSF-DZ. Aus dieser Beobachtung lässt sich ableiten, dass Tlr8 und Tlr9 beide für die Erkennung von PD-RNA notwendig sein könnten. In plasmazytoiden DZ, die kaum Tlr8 exprimieren, würde die PD-RNA deswegen nicht erkannt werden. Diese Annahme müsste mit Hilfe von Tlr7/8-doppel-*knockout*-Mäusen oder anti-mTlr8-siRNA überprüft werden.

Honda et al. (2005) zeigten, dass die durch CpG-DNA-Oligonukleotide induzierte Zytokinproduktion, die sich in pDZ und cDZ unterscheidet, auf die unterschiedliche Lokalisation der Oligonukleotide in der Zelle zurückzuführen ist. Während ein bestimmter Typ CpG-Oligonukleotide, TypA-CpG-DNA, in konventionellen Dendritischen Zellen unmittelbar in die Lysosome transportiert wird und kein IFN- $\alpha$  induziert, bleibt diese DNA in plasmazytoiden DZ länger in Endosomen und induziert IFN- $\alpha$ -Produktion (Honda et al., 2005). Die Lokalisation der PD-RNA in unterschiedlichen Typen der DZ könnte also ebenfalls von Bedeutung sein. Möglicherweise gelangt PD-RNA nur in cDZ - aber nicht in pDZ - in ein Kompartiment, das die Erkennung von PD-RNA durch Tlr9 etwa durch günstige pH-Verhältnisse erlaubt.

Die Lokalisation von Tlr9 könnte ebenfalls eine Rolle spielen. Latz et al. (2004) zeigten, dass TLR9 in humanen pDZ normalerweise im Endoplasmatischen Retikulum lokalisiert ist und erst nach der Stimulation mit CpG-DNA zu den Endosomen befördert wird (Latz et al., 2004). Denkbar wäre, dass sich die Lokalisation von Tlr9 in plasmazytoiden und konventionellen DZ unterscheidet. Möglicherweise befindet sich Tlr9 in unstimulierten cDZ bereits im Endosom und kann durch PD-RNA stimuliert werden, während er in pDZ im ER lokalisiert ist und dieses nur nach Stimulation mit CpG-DNA verlassen kann.

### **4.3 Die Methylierung des Sense-Stranges verhindert die unerwünschte Immunstimulation durch siRNA**

#### **4.3.1 Die Methylierung nur eines Stranges von siRNA verhindert die Immunstimulation durch siRNA**

RNA-Interferenz beschreibt eine Methode, mit Hilfe von spezifischer doppelsträngiger (ds) RNA, die Genexpression entsprechender Gene zu vermindern. Dafür werden lange dsRNA-Fragmente durch ein RNaseIII-Enzym, das sogenannte Dicer, in kurze doppelsträngige Oligonukleotide geschnitten. Diese werden dann in ein RNA-induzierten *Silencing*-Komplex (RISC) integriert, das den Abbau der zur siRNA komplementären mRNA vermittelt. Synthetisch hergestellte kurze doppelsträngige RNA-Fragmente, *small interfering RNA* (siRNA), können für diesen Zweck ebenfalls eingesetzt werden. Mehrere Gruppen berichteten kürzlich, dass siRNA humane und murine Immunzellen aktivieren kann (Hornung et al., 2005; Judge et al., 2005; Sioud, 2005). An der Anwendung von siRNA als Therapeutikum besteht zur Zeit ein großes Interesse, die Immunstimulation durch siRNA würde den Einsatz im Menschen allerdings erheblich einschränken.

Die Aktivierung des Immunsystems wird in plasmazytoiden Dendritischen Zellen über Tlr7 vermittelt (Hornung et al., 2005; Sioud, 2005). Tlr7 reagiert überwiegend auf U- und GU-reiche RNA-Sequenzen, allerdings wurden auch andere immunstimulative Sequenzen beschrieben (Hornung et al., 2005; Sugiyama et al., 2005). Judge et al. (2005) zeigten, dass es möglich ist, wenig immunstimulative, aber aktive siRNA zu entwerfen, indem sie GU-reiche Sequenzen vermieden. Diese Strategie limitiert allerdings die Anzahl an möglichen siRNA-Sequenzen, die zur Regulation eines

bestimmten Genes eingesetzt werden können. Sie erfordert zudem einen hohen *Screening*-Aufwand, da die immunstimulatorischen RNA-Sequenzen unzureichend definiert sind.

Die Funktionalität von siRNA wird einigen Berichten zufolge durch bestimmte Modifikationen wie 2'-O-Methylierung, 2'-F-Modifikation, 2'-deoxy oder LNA(locked nucleic acid)-Modifikation der Ribose nicht beeinflusst (Chiu and Rana, 2003; Czauderna et al., 2003; Elmen et al., 2005). Allerdings durften ohne Funktionalitätsverlust nur bestimmte schlecht definierte Positionen oder Sequenzen modifiziert werden. Die 2'-O-Methylierung der Ribose an bestimmten Stellen scheint mit dem siRNA-Mechanismus jedenfalls kompatibel zu sein. Weiterhin ist bekannt, dass Methylierung von RNA zum Verlust ihrer immunstimulatorischen Eigenschaften führen kann (Ishii and Akira, 2005; Kariko et al., 2005). Mit unseren Experimenten wollten wir Auswirkungen der 2'-O-Methylierung von siRNA auf ihre immunstimulativen Eigenschaften und die *Silencing*-Aktivität genauer untersuchen, um allgemeingültige Aussagen über die Entwicklung von nicht-stimulativer siRNA treffen zu können. Dafür wurden zwei verschiedene siRNAs hergestellt, die entweder nicht modifiziert oder am *Sense*- und/oder am *Antisense*-Strang methyliert waren. Dabei wurde jede zweite Ribose in einem Strang methyliert.

Es zeigte sich, dass die Methylierung nur eines Stranges ausreichte, die immunstimulatorischen Eigenschaften von siRNA sowohl in humanen als auch in murinen Immunzellen aufzuheben. Dabei beeinflusste die Methylierung des *Sense*-Stranges die *Silencing*-Aktivität nicht, die des *Antisense*-Stranges führte dagegen zum Verlust der Aktivität. Ähnliche Ergebnisse veröffentlichte vor kurzem Judge et al. (2005). Sie zeigten, dass am *Sense*-Strang methylierte siRNA gegen ApolipoproteinB (ApoB) keine Stimulation des Immunsystems bewirkt und die Mengen an ApoB im Serum von Mäusen vermindert. Generell lässt sich sagen, dass Veränderungen des *Antisense*-Stranges eher zum Funktionalitätsverlust führen. Die Methylierung des *Sense*-Stranges beeinflusst die *Silencing*-Aktivität von siRNA dagegen nicht. Falls immunstimulatorische Wirkung nicht erwünscht ist, sollte siRNA also an einigen Stellen am *Sense*-Strang methyliert werden.

Warum nun die Methylierung nur eines Stranges von siRNA ausreicht, um die Immunstimulation zu verhindern, ist bis jetzt nicht klar. Folgende Möglichkeiten wären vorstellbar: Die Methylierung verändert die dreidimensionale Struktur von RNA derart, dass muriner Tlr7 bzw. humane TLR7 und 8 sie nicht mehr erkennen können.

Das würde jedoch voraussetzen, dass Tlr7/TLR7 und TLR8 wie TLR3 siRNA als ein ganzes doppelsträngiges Molekül erkennen. Dafür gibt es bis jetzt keine Hinweise. Würde siRNA aber im Endosom in zwei Stränge dissoziieren, müsste der methylierte Strang von siRNA einerseits selbst nicht mehr stimulatorisch sein und andererseits die Stimulation durch den nicht modifizierten Strang inhibieren, um die Immunstimulation zu verhindern. Die Methylierung von RNA würde in dem Fall nicht nur zur Immunneutralität, sondern zur Immuninhibition führen. Um diese Hypothese zu überprüfen, müsste eine Kostimulation von immunstimulatorischer und nichtstimulatorischer siRNA durchgeführt werden. Würde die Immunstimulation durch die Zugabe von nichtstimulatorischer siRNA verhindert, würde es eine aktive Inhibition durch die methylierte RNA bestätigen.

#### **4.3.2 Die Methylierung des *Antisense*-Stranges verhindert die *Silencing*-Aktivität von siRNA**

Wie bereits diskutiert, hat die Methylierung des *Sense*-Stranges kein Einfluß auf die Funktionalität von siRNA. Die Modifikation des *Antisense*-Stranges verhindert dagegen die *Silencing*-Aktivität. Der *Antisense*-Strang scheint also besonders wichtig für die siRNA-Aktivität zu sein. Czauderna et al. (2003) zeigten, dass nicht jede 2'-O-Methylierung des *Antisense*-Stranges zum vollständigen Verlust der Funktionalität führen muss. Die Methylierung des zweiten Nukleotid am 5'-Ende ist allerdings funktionsschädigend. In unserem Fall war ebenfalls unter anderem das zweite Nukleotid am 5'-Ende methyliert. Chiu et al. (2003) entwickelten ein Modell der Wirkungsweise der siRNA: Dabei wird siRNA zunächst im RISC-Komplex entwunden. Der *Sense*-Strang wird dann freigelassen, und der *Antisense*-Strang dient als Matrize für die komplementäre mRNA. Mit unseren Ergebnissen konnten wir einerseits die Wichtigkeit des *Antisense*-Stranges in diesem System bestätigen, andererseits wird dadurch die besondere Bedeutung des zweiten Nukleotids am 5'-Ende deutlich. Die Methylierung der einzelnen Basen im *Antisense*-Strang könnte also zur Aufklärung des siRNA-Mechanismus beitragen.

## 5 Zusammenfassung

Das angeborene Immunsystem der Vertebraten konzentriert sich auf die Erkennung konservierter molekularer Strukturen von Pathogenen (*pathogen-associated molecular patterns* (PAMP)). Die PAMP stimulieren die sogenannten *pattern recognition receptors* (PRR), zu denen auch Toll-like Rezeptoren (TLR) gehören. TLR sind an der Auslösung der Signalwege beteiligt, die zur Induktion der inflammatorischen Gene führen. Bei Säugetieren wurden inzwischen elf Mitglieder der TLR-Familie eingehender beschrieben. TLR 1, 2, 4, 5, 6 und 11 befinden sich auf der Oberfläche von Immunzellen und erkennen äußere Merkmale von Pathogenen, wie Lipopolysaccharid (TLR4), Peptidoglykan (TLR2) oder Flagellin (TLR5). TLR 3, 7, 8 und 9 erkennen bakterielle und virale Nukleinsäuren und werden in intrazellulären Kompartimenten exprimiert.

TLR3 kann durch doppelsträngige RNA und das synthetische Analogon Poly-Inosin:poly-Cytidyl-Säure (pI:C) stimuliert werden. Einzelsträngige RNA mit bestimmten Sequenzen und Imidazaquinoline aktivieren das Immunsystem über TLR7 und 8. TLR9 reagiert auf die CpG-DNA, d. h. DNA-Sequenzen, die im Kern ein unmethyliertes CG-Dinukeotid besitzen.

In dieser Arbeit wurden immunstimulatorische Eigenschaften von einzelsträngigen RNA-Oligonukleotiden und doppelsträngiger siRNA unter verschiedenen Aspekten analysiert: Zuerst wurde die Eignung von RNA als Adjuvans, dann das Phänomen der Tlr7-unabhängigen Phosphodiester-RNA-Stimulation untersucht. Schließlich beschäftigten wir uns mit der Eliminierung von unerwünschter Immunstimulation durch siRNA.

RNA als Adjuvans war in der Lage, Immunität gegen ein komplexes Pathogen wie *Listeria monocytoges* hervorzurufen. Im Vergleich zur CpG-DNA induzierte sie eine schwächere, aber deutliche, zytotoxische Immunantwort. Sowohl RNA als auch CpG-DNA induzierten vergleichbar große Mengen an spezifischen IgG-Antikörpern. Im Unterschied zur CpG-DNA, die wie erwartet mehr T<sub>H</sub>1-typische Antikörper induzierte, führte RNA überwiegend zur Produktion von T<sub>H</sub>2-Antikörpern. Im Unterschied zu den mit CpG-DNA injizierten Mäusen, die eine Splenomegalie aufwiesen, zeigten RNA-behandelte Mäuse keine Zeichen der Überstimulation des Immunsystems. Außerdem konnten wir zeigen, dass Tlr7 für die RNA-induzierte Immunität notwendig war.

Physiologische Phosphodiester(PD)-RNA zeigte im Unterschied zu der für RNA-Stimulationen üblicherweise verwendeten Phosphorothioat-RNA einen deutlichen Tlr7-unabhängigen Stimulationseffekt. Dieser war abhängig von Myd88 und der endosomalen Reifung, aber unabhängig von Tlr3. Mit Hilfe von *Tlr7/9-knockout*-Mäusen konnten wir schließlich die Beteiligung von Tlr9 an der Tlr7-unabhängigen Stimulation durch PD-RNA zeigen. Interessanterweise wurde PD-RNA nur in Zellen myeloiden Ursprungs wie konventionellen Dendritischen Zellen aus der Flt3L-Kultur, GM-CSF-DZ und Makrophagen über zwei Rezeptoren, Tlr7 und Tlr9, erkannt. Plasmazytoide Dendritische Zellen schienen dagegen sowohl PTO- als auch PD-RNA ausschließlich über Tlr7 zu erkennen. Warum sich die Zelltypen bei der Erkennung von PD-RNA unterscheiden, ist derzeit unklar.

Immunstimulation durch siRNA erschwert ihre therapeutische Anwendung im Menschen. Mit unseren Experimenten konnten wir zeigen, dass die Methylierung nur eines Stranges von siRNA ausreicht, um die Immunstimulation zu verhindern. Dabei beeinflusste die Methylierung des *Sense*-Stranges die *Silencing*-Aktivität von siRNA nicht, die des *Antisense*-Stranges führte dagegen zum Verlust der Aktivität. Durch Methylierung des *Sense*-Stranges lässt sich also nicht-immunstimulative, aber funktionsfähige siRNA herstellen, die eine sichere medizinische Anwendung erlaubt.

## 6 Literaturverzeichnis

- Akira, S., Takeda, K., and Kaisho, T. (2001). Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. *Nat Immunol* 2, 675-680.
- Alexopoulou, L., Holt, A. C., Medzhitov, R., and Flavell, R. A. (2001). Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3. *Nature* 413, 732-738.
- Aliprantis, A. O., Yang, R. B., Mark, M. R., Suggett, S., Devaux, B., Radolf, J. D., Klimpel, G. R., Godowski, P., and Zychlinsky, A. (1999). Cell activation and apoptosis by bacterial lipoproteins through toll-like receptor-2. *Science* 285, 736-739.
- Bauer, S., Kirschning, C. J., Hacker, H., Redecke, V., Hausmann, S., Akira, S., Wagner, H., and Lipford, G. B. (2001). Human TLR9 confers responsiveness to bacterial DNA via species-specific CpG motif recognition. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 9237-9242.
- Baulcombe, D. (2004). RNA silencing in plants. *Nature* 431, 356-363.
- Bulut, Y., Faure, E., Thomas, L., Karahashi, H., Michelsen, K. S., Equils, O., Morrison, S. G., Morrison, R. P., and Arditi, M. (2002). Chlamydial heat shock protein 60 activates macrophages and endothelial cells through Toll-like receptor 4 and MD2 in a MyD88-dependent pathway. *J Immunol* 168, 1435-1440.
- Byrd-Leifer, C. A., Block, E. F., Takeda, K., Akira, S., and Ding, A. (2001). The role of MyD88 and TLR4 in the LPS-mimetic activity of Taxol. *Eur J Immunol* 31, 2448-2457.
- Campos, M. A., Almeida, I. C., Takeuchi, O., Akira, S., Valente, E. P., Procopio, D. O., Travassos, L. R., Smith, J. A., Golenbock, D. T., and Gazzinelli, R. T. (2001). Activation of Toll-like receptor-2 by glycosylphosphatidylinositol anchors from a protozoan parasite. *J Immunol* 167, 416-423.
- Cao, Z., Xiong, J., Takeuchi, M., Kurama, T., and Goeddel, D. V. (1996). TRAF6 is a signal transducer for interleukin-1. *Nature* 383, 443-446.
- Chiu, Y. L., and Rana, T. M. (2003). siRNA function in RNAi: a chemical modification analysis. *Rna* 9, 1034-1048.
- Coban, C., Ishii, K. J., Kawai, T., Hemmi, H., Sato, S., Uematsu, S., Yamamoto, M., Takeuchi, O., Itagaki, S., Kumar, N., *et al.* (2005). Toll-like receptor 9 mediates innate immune activation by the malaria pigment hemozoin. *J Exp Med* 201, 19-25.
- Czauderna, F., Fechtner, M., Dames, S., Aygun, H., Klippel, A., Pronk, G. J., Giese, K., and Kaufmann, J. (2003). Structural variations and stabilising modifications of synthetic siRNAs in mammalian cells. *Nucleic Acids Res* 31, 2705-2716.
- d'Ostiani, C. F., Del Sero, G., Bacci, A., Montagnoli, C., Spreca, A., Mencacci, A., Ricciardi-Castagnoli, P., and Romani, L. (2000). Dendritic cells discriminate between yeasts and hyphae of the fungus *Candida albicans*. Implications for initiation of T helper cell immunity in vitro and in vivo. *J Exp Med* 191, 1661-1674.
- Davila, E., and Celis, E. (2000). Repeated administration of cytosine-phosphorothiolated guanine-containing oligonucleotides together with peptide/protein immunization results in enhanced CTL responses with anti-tumor activity. *J Immunol* 165, 539-547.

- Diebold, S. S., Kaisho, T., Hemmi, H., Akira, S., and Reis e Sousa, C. (2004). Innate antiviral responses by means of TLR7-mediated recognition of single-stranded RNA. *Science* 303, 1529-1531.
- Dunne, A., and O'Neill, L. A. (2005). Adaptor usage and Toll-like receptor signaling specificity. *FEBS Lett* 579, 3330-3335.
- Durand, V., Wong, S. Y., Tough, D. F., and Le Bon, A. (2004). Shaping of adaptive immune responses to soluble proteins by TLR agonists: a role for IFN-alpha/beta. *Immunol Cell Biol* 82, 596-602.
- Eaves-Pyles, T., Murthy, K., Liaudet, L., Virag, L., Ross, G., Soriano, F. G., Szabo, C., and Salzman, A. L. (2001). Flagellin, a novel mediator of Salmonella-induced epithelial activation and systemic inflammation: I kappa B alpha degradation, induction of nitric oxide synthase, induction of proinflammatory mediators, and cardiovascular dysfunction. *J Immunol* 166, 1248-1260.
- Elkins, K. L., Rhinehart-Jones, T. R., Stibitz, S., Conover, J. S., and Klinman, D. M. (1999). Bacterial DNA containing CpG motifs stimulates lymphocyte-dependent protection of mice against lethal infection with intracellular bacteria. *J Immunol* 162, 2291-2298.
- Elmen, J., Thonberg, H., Ljungberg, K., Frieden, M., Westergaard, M., Xu, Y., Wahren, B., Liang, Z., Orum, H., Koch, T., and Wahlestedt, C. (2005). Locked nucleic acid (LNA) mediated improvements in siRNA stability and functionality. *Nucleic Acids Res* 33, 439-447.
- Fire, A., Xu, S., Montgomery, M. K., Kostas, S. A., Driver, S. E., and Mello, C. C. (1998). Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 391, 806-811.
- Fitzgerald, K. A., Palsson-McDermott, E. M., Bowie, A. G., Jefferies, C. A., Mansell, A. S., Brady, G., Brint, E., Dunne, A., Gray, P., Harte, M. T., *et al.* (2001). Mal (MyD88-adaptor-like) is required for Toll-like receptor-4 signal transduction. *Nature* 413, 78-83.
- Frey, P. A., and Sammons, R. D. (1985). Bond order and charge localization in nucleoside phosphorothioates. *Science* 228, 541-545.
- Gursel, I., Gursel, M., Yamada, H., Ishii, K. J., Takeshita, F., and Klinman, D. M. (2003). Repetitive elements in mammalian telomeres suppress bacterial DNA-induced immune activation. *J Immunol* 171, 1393-1400.
- Gustafson, G. L., and Rhodes, M. J. (1992). Bacterial cell wall products as adjuvants: early interferon gamma as a marker for adjuvants that enhance protective immunity. *Res Immunol* 143, 483-488; discussion 573-484.
- Hardiman, G., Rock, F. L., Balasubramanian, S., Kastelein, R. A., and Bazan, J. F. (1996). Molecular characterization and modular analysis of human MyD88. *Oncogene* 13, 2467-2475.
- Hashimoto, C., Hudson, K. L., and Anderson, K. V. (1988). The Toll gene of *Drosophila*, required for dorsal-ventral embryonic polarity, appears to encode a transmembrane protein. *Cell* 52, 269-279.
- Hayashi, F., Smith, K. D., Ozinsky, A., Hawn, T. R., Yi, E. C., Goodlett, D. R., Eng, J. K., Akira, S., Underhill, D. M., and Aderem, A. (2001). The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5. *Nature* 410, 1099-1103.
- Heikenwalder, M., Polymenidou, M., Junt, T., Sigurdson, C., Wagner, H., Akira, S., Zinkernagel, R., and Aguzzi, A. (2004). Lymphoid follicle destruction and immunosuppression after repeated CpG oligodeoxynucleotide administration. *Nat Med* 10, 187-192.

- Heil, F., Ahmad-Nejad, P., Hemmi, H., Hochrein, H., Ampenberger, F., Gellert, T., Dietrich, H., Lipford, G., Takeda, K., Akira, S., *et al.* (2003). The Toll-like receptor 7 (TLR7)-specific stimulus loxoribine uncovers a strong relationship within the TLR7, 8 and 9 subfamily. *Eur J Immunol* 33, 2987-2997.
- Heil, F., Hemmi, H., Hochrein, H., Ampenberger, F., Kirschning, C., Akira, S., Lipford, G., Wagner, H., and Bauer, S. (2004). Species-specific recognition of single-stranded RNA via toll-like receptor 7 and 8. *Science* 303, 1526-1529.
- Hemmi, H., Kaisho, T., Takeuchi, O., Sato, S., Sanjo, H., Hoshino, K., Horiuchi, T., Tomizawa, H., Takeda, K., and Akira, S. (2002). Small anti-viral compounds activate immune cells via the TLR7 MyD88-dependent signaling pathway. *Nat Immunol* 3, 196-200.
- Hemmi, H., Takeuchi, O., Kawai, T., Kaisho, T., Sato, S., Sanjo, H., Matsumoto, M., Hoshino, K., Wagner, H., Takeda, K., and Akira, S. (2000). A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature* 408, 740-745.
- Hirschfeld, M., Weis, J. J., Toshchakov, V., Salkowski, C. A., Cody, M. J., Ward, D. C., Qureshi, N., Michalek, S. M., and Vogel, S. N. (2001). Signaling by toll-like receptor 2 and 4 agonists results in differential gene expression in murine macrophages. *Infect Immun* 69, 1477-1482.
- Honda, K., Ohba, Y., Yanai, H., Negishi, H., Mizutani, T., Takaoka, A., Taya, C., and Taniguchi, T. (2005). Spatiotemporal regulation of MyD88-IRF-7 signalling for robust type-I interferon induction. *Nature* 434, 1035-1040.
- Horng, T., Barton, G. M., and Medzhitov, R. (2001). TIRAP: an adapter molecule in the Toll signaling pathway. *Nat Immunol* 2, 835-841.
- Hornung, V., Guenther-Biller, M., Bourquin, C., Ablasser, A., Schlee, M., Uematsu, S., Noronha, A., Manoharan, M., Akira, S., de Fougerolles, A., *et al.* (2005). Sequence-specific potent induction of IFN-alpha by short interfering RNA in plasmacytoid dendritic cells through TLR7. *Nat Med* 11, 263-270.
- Hoshino, K., Takeuchi, O., Kawai, T., Sanjo, H., Ogawa, T., Takeda, Y., Takeda, K., and Akira, S. (1999). Cutting edge: Toll-like receptor 4 (TLR4)-deficient mice are hyporesponsive to lipopolysaccharide: evidence for TLR4 as the Lps gene product. *J Immunol* 162, 3749-3752.
- Imler, J. L., Ferrandon, D., Royet, J., Reichhart, J. M., Hetru, C., and Hoffmann, J. A. (2004). Toll-dependent and Toll-independent immune responses in *Drosophila*. *J Endotoxin Res* 10, 241-246.
- Ishii, K. J., and Akira, S. (2005). TLR ignores methylated RNA? *Immunity* 23, 111-113.
- Ishii, K. J., Coban, C., and Akira, S. (2005). Manifold Mechanisms of Toll-Like Receptor-Ligand Recognition. *J Clin Immunol* 25, 511-521.
- Ishii, K. J., Coban, C., Kato, H., Takahashi, K., Torii, Y., Takeshita, F., Ludwig, H., Sutter, G., Suzuki, K., Hemmi, H., *et al.* (2006). A Toll-like receptor-independent antiviral response induced by double-stranded B-form DNA. *Nat Immunol* 7, 40-48.
- Ishii, K. J., Gursel, I., Gursel, M., and Klinman, D. M. (2004). Immunotherapeutic utility of stimulatory and suppressive oligodeoxynucleotides. *Curr Opin Mol Ther* 6, 166-174.
- Ishii, K. J., Suzuki, K., Coban, C., Takeshita, F., Itoh, Y., Matoba, H., Kohn, L. D., and Klinman, D. M. (2001). Genomic DNA released by dying cells induces the maturation of APCs. *J Immunol* 167, 2602-2607.
- Johnson, G. B., Brunn, G. J., Kodaira, Y., and Platt, J. L. (2002). Receptor-mediated monitoring of tissue well-being via detection of soluble heparan sulfate by Toll-like receptor 4. *J Immunol* 168, 5233-5239.

- Judge, A. D., Sood, V., Shaw, J. R., Fang, D., McClintock, K., and MacLachlan, I. (2005). Sequence-dependent stimulation of the mammalian innate immune response by synthetic siRNA. *Nat Biotechnol* 23, 457-462.
- Jurk, M., Heil, F., Vollmer, J., Schetter, C., Krieg, A. M., Wagner, H., Lipford, G., and Bauer, S. (2002). Human TLR7 or TLR8 independently confer responsiveness to the antiviral compound R-848. *Nat Immunol* 3, 499.
- Kadowaki, N., Ho, S., Antonenko, S., Malefyt, R. W., Kastelein, R. A., Bazan, F., and Liu, Y. J. (2001). Subsets of human dendritic cell precursors express different toll-like receptors and respond to different microbial antigens. *J Exp Med* 194, 863-869.
- Kariko, K., Bhuyan, P., Capodici, J., and Weissman, D. (2004a). Small interfering RNAs mediate sequence-independent gene suppression and induce immune activation by signaling through toll-like receptor 3. *J Immunol* 172, 6545-6549.
- Kariko, K., Buckstein, M., Ni, H., and Weissman, D. (2005). Suppression of RNA recognition by Toll-like receptors: the impact of nucleoside modification and the evolutionary origin of RNA. *Immunity* 23, 165-175.
- Kariko, K., Ni, H., Capodici, J., Lamphier, M., and Weissman, D. (2004b). mRNA is an endogenous ligand for Toll-like receptor 3. *J Biol Chem* 279, 12542-12550.
- Kato, H., Sato, S., Yoneyama, M., Yamamoto, M., Uematsu, S., Matsui, K., Tsujimura, T., Takeda, K., Fujita, T., Takeuchi, O., and Akira, S. (2005). Cell type-specific involvement of RIG-I in antiviral response. *Immunity* 23, 19-28.
- Kawai, T., Sato, S., Ishii, K. J., Coban, C., Hemmi, H., Yamamoto, M., Terai, K., Matsuda, M., Inoue, J., Uematsu, S., *et al.* (2004). Interferon-alpha induction through Toll-like receptors involves a direct interaction of IRF7 with MyD88 and TRAF6. *Nat Immunol* 5, 1061-1068.
- Kawasaki, K., Akashi, S., Shimazu, R., Yoshida, T., Miyake, K., and Nishijima, M. (2001). Involvement of TLR4/MD-2 complex in species-specific lipopolysaccharide-mimetic signal transduction by Taxol. *J Endotoxin Res* 7, 232-236.
- Klinman, D. M., Conover, J., and Coban, C. (1999). Repeated administration of synthetic oligodeoxynucleotides expressing CpG motifs provides long-term protection against bacterial infection. *Infect Immun* 67, 5658-5663.
- Krieg, A. M. (2002). CpG motifs in bacterial DNA and their immune effects. *Annu Rev Immunol* 20, 709-760.
- Krieg, A. M., Love-Homan, L., Yi, A. K., and Harty, J. T. (1998a). CpG DNA induces sustained IL-12 expression in vivo and resistance to *Listeria monocytogenes* challenge. *J Immunol* 161, 2428-2434.
- Krieg, A. M., Wu, T., Weeratna, R., Efler, S. M., Love-Homan, L., Yang, L., Yi, A. K., Short, D., and Davis, H. L. (1998b). Sequence motifs in adenoviral DNA block immune activation by stimulatory CpG motifs. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 12631-12636.
- Krieg, A. M., Yi, A. K., Matson, S., Waldschmidt, T. J., Bishop, G. A., Teasdale, R., Koretzky, G. A., and Klinman, D. M. (1995). CpG motifs in bacterial DNA trigger direct B-cell activation. *Nature* 374, 546-549.
- Krishnegowda, G., Hajjar, A. M., Zhu, J., Douglass, E. J., Uematsu, S., Akira, S., Woods, A. S., and Gowda, D. C. (2005). Induction of proinflammatory responses in macrophages by the glycosylphosphatidylinositols of *Plasmodium falciparum*: cell signaling receptors, glycosylphosphatidylinositol (GPI) structural requirement, and regulation of GPI activity. *J Biol Chem* 280, 8606-8616.

- Krug, A., French, A. R., Barchet, W., Fischer, J. A., Dzionek, A., Pingel, J. T., Orihuela, M. M., Akira, S., Yokoyama, W. M., and Colonna, M. (2004a). TLR9-dependent recognition of MCMV by IPC and DC generates coordinated cytokine responses that activate antiviral NK cell function. *Immunity* 21, 107-119.
- Krug, A., Luker, G. D., Barchet, W., Leib, D. A., Akira, S., and Colonna, M. (2004b). Herpes simplex virus type 1 activates murine natural interferon-producing cells through toll-like receptor 9. *Blood* 103, 1433-1437.
- Kurt-Jones, E. A., Popova, L., Kwinn, L., Haynes, L. M., Jones, L. P., Tripp, R. A., Walsh, E. E., Freeman, M. W., Golenbock, D. T., Anderson, L. J., and Finberg, R. W. (2000). Pattern recognition receptors TLR4 and CD14 mediate response to respiratory syncytial virus. *Nat Immunol* 1, 398-401.
- Latz, E., Visintin, A., Espevik, T., and Golenbock, D. T. (2004). Mechanisms of TLR9 activation. *J Endotoxin Res* 10, 406-412.
- Lee, S. E., Kim, S. Y., Jeong, B. C., Kim, Y. R., Bae, S. J., Ahn, O. S., Lee, J. J., Song, H. C., Kim, J. M., Choy, H. E., *et al.* (2006). A bacterial flagellin, *Vibrio vulnificus* FlaB, has a strong mucosal adjuvant activity to induce protective immunity. *Infect Immun* 74, 694-702.
- Lipford, G. B., Sparwasser, T., Zimmermann, S., Heeg, K., and Wagner, H. (2000). CpG-DNA-mediated transient lymphadenopathy is associated with a state of Th1 predisposition to antigen-driven responses. *J Immunol* 165, 1228-1235.
- Marshak-Rothstein, A., Busconi, L., Lau, C. M., Tabor, A. S., Leadbetter, E. A., Akira, S., Krieg, A. M., Lipford, G. B., Viglianti, G. A., and Rifkin, I. R. (2004). Comparison of CpG s-ODNs, chromatin immune complexes, and dsDNA fragment immune complexes in the TLR9-dependent activation of rheumatoid factor B cells. *J Endotoxin Res* 10, 247-251.
- Martin, R. M., Brady, J. L., and Lew, A. M. (1998). The need for IgG2c specific antiserum when isotyping antibodies from C57BL/6 and NOD mice. *J Immunol Methods* 212, 187-192.
- Maurer, T., Heit, A., Hochrein, H., Ampenberger, F., O'Keeffe, M., Bauer, S., Lipford, G. B., Vabulas, R. M., and Wagner, H. (2002). CpG-DNA aided cross-presentation of soluble antigens by dendritic cells. *Eur J Immunol* 32, 2356-2364.
- Medzhitov, R., and Janeway, C., Jr. (2000a). Innate immune recognition: mechanisms and pathways. *Immunol Rev* 173, 89-97.
- Medzhitov, R., and Janeway, C., Jr. (2000b). Innate immunity. *N Engl J Med* 343, 338-344.
- Medzhitov, R., Preston-Hurlburt, P., and Janeway, C. A., Jr. (1997). A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* 388, 394-397.
- Medzhitov, R., Preston-Hurlburt, P., Kopp, E., Stadlen, A., Chen, C., Ghosh, S., and Janeway, C. A., Jr. (1998). MyD88 is an adaptor protein in the hToll/IL-1 receptor family signaling pathways. *Mol Cell* 2, 253-258.
- Mello, C. C., and Conte, D., Jr. (2004). Revealing the world of RNA interference. *Nature* 431, 338-342.
- Muzio, M., Natoli, G., Sacconi, S., Levrero, M., and Mantovani, A. (1998). The human toll signaling pathway: divergence of nuclear factor kappaB and JNK/SAPK activation upstream of tumor necrosis factor receptor-associated factor 6 (TRAF6). *J Exp Med* 187, 2097-2101.
- Muzio, M., Ni, J., Feng, P., and Dixit, V. M. (1997). IRAK (Pelle) family member IRAK-2 and MyD88 as proximal mediators of IL-1 signaling. *Science* 278, 1612-1615.

- Naik, S. H., Proietto, A. I., Wilson, N. S., Dakic, A., Schnorrer, P., Fuchsberger, M., Lahoud, M. H., O'Keeffe, M., Shao, Q. X., Chen, W. F., *et al.* (2005). Cutting edge: generation of splenic CD8<sup>+</sup> and CD8<sup>-</sup> dendritic cell equivalents in Fms-like tyrosine kinase 3 ligand bone marrow cultures. *J Immunol* 174, 6592-6597.
- Neumann, E., Schaefer-Ridder, M., Wang, Y., and Hofschneider, P. H. (1982). Gene transfer into mouse lyoma cells by electroporation in high electric fields. *Embo J* 1, 841-845.
- O'Hagan, D. T., MacKichan, M. L., and Singh, M. (2001). Recent developments in adjuvants for vaccines against infectious diseases. *Biomol Eng* 18, 69-85.
- Poltorak, A., He, X., Smirnova, I., Liu, M. Y., Van Huffel, C., Du, X., Birdwell, D., Alejos, E., Silva, M., Galanos, C., *et al.* (1998). Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. *Science* 282, 2085-2088.
- Pulendran, B., Banchereau, J., Maraskovsky, E., and Maliszewski, C. (2001). Modulating the immune response with dendritic cells and their growth factors. *Trends Immunol* 22, 41-47.
- Qureshi, S. T., Lariviere, L., Leveque, G., Clermont, S., Moore, K. J., Gros, P., and Malo, D. (1999). Endotoxin-tolerant mice have mutations in Toll-like receptor 4 (Tlr4). *J Exp Med* 189, 615-625.
- Rassa, J. C., Meyers, J. L., Zhang, Y., Kudaravalli, R., and Ross, S. R. (2002). Murine retroviruses activate B cells via interaction with toll-like receptor 4. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 2281-2286.
- Res, P. C., Couwenberg, F., Vyth-Dreese, F. A., and Spits, H. (1999). Expression of pTalpha mRNA in a committed dendritic cell precursor in the human thymus. *Blood* 94, 2647-2657.
- Richwald, G. A. (1999). Imiquimod. *Drugs Today (Barc)* 35, 497-511.
- Riedl, P., Stober, D., Oehninger, C., Melber, K., Reimann, J., and Schirmbeck, R. (2002). Priming Th1 immunity to viral core particles is facilitated by trace amounts of RNA bound to its arginine-rich domain. *J Immunol* 168, 4951-4959.
- Rutz, M., Metzger, J., Gellert, T., Lupp, P., Lipford, G. B., Wagner, H., and Bauer, S. (2004). Toll-like receptor 9 binds single-stranded CpG-DNA in a sequence- and pH-dependent manner. *Eur J Immunol* 34, 2541-2550.
- Sano, K., Shirota, H., Terui, T., Hattori, T., and Tamura, G. (2003). Oligodeoxynucleotides without CpG motifs work as adjuvant for the induction of Th2 differentiation in a sequence-independent manner. *J Immunol* 170, 2367-2373.
- Sasai, M., Oshiumi, H., Matsumoto, M., Inoue, N., Fujita, F., Nakanishi, M., and Seya, T. (2005). Cutting Edge: NF-kappaB-activating kinase-associated protein 1 participates in TLR3/Toll-IL-1 homology domain-containing adapter molecule-1-mediated IFN regulatory factor 3 activation. *J Immunol* 174, 27-30.
- Savarese, E., Chae, O. W., Trowitzsch, S., Weber, G., Kastner, B., Akira, S., Wagner, H., Schmid, R. M., Bauer, S., and Krug, A. (2005). U1 small nuclear ribonucleoprotein immune complexes induce type I interferon in plasmacytoid dendritic cells via TLR7. *Blood*.
- Scheel, B., Braedel, S., Probst, J., Carralot, J. P., Wagner, H., Schild, H., Jung, G., Rammensee, H. G., and Pascolo, S. (2004). Immunostimulating capacities of stabilized RNA molecules. *Eur J Immunol* 34, 537-547.

- Schroder, N. W., Morath, S., Alexander, C., Hamann, L., Hartung, T., Zahringer, U., Gobel, U. B., Weber, J. R., and Schumann, R. R. (2003). Lipoteichoic acid (LTA) of *Streptococcus pneumoniae* and *Staphylococcus aureus* activates immune cells via Toll-like receptor (TLR)-2, lipopolysaccharide-binding protein (LBP), and CD14, whereas TLR-4 and MD-2 are not involved. *J Biol Chem* 278, 15587-15594.
- Schwandner, R., Dziarski, R., Wesche, H., Rothe, M., and Kirschning, C. J. (1999). Peptidoglycan- and lipoteichoic acid-induced cell activation is mediated by toll-like receptor 2. *J Biol Chem* 274, 17406-17409.
- Shimazu, R., Akashi, S., Ogata, H., Nagai, Y., Fukudome, K., Miyake, K., and Kimoto, M. (1999). MD-2, a molecule that confers lipopolysaccharide responsiveness on Toll-like receptor 4. *J Exp Med* 189, 1777-1782.
- Shirota, H., Gursel, I., Gursel, M., and Klinman, D. M. (2005). Suppressive oligodeoxynucleotides protect mice from lethal endotoxic shock. *J Immunol* 174, 4579-4583.
- Shirota, H., Gursel, M., and Klinman, D. M. (2004). Suppressive oligodeoxynucleotides inhibit Th1 differentiation by blocking IFN-gamma- and IL-12-mediated signaling. *J Immunol* 173, 5002-5007.
- Shortman, K., and Liu, Y. J. (2002). Mouse and human dendritic cell subtypes. *Nat Rev Immunol* 2, 151-161.
- Sioud, M. (2005). Induction of inflammatory cytokines and interferon responses by double-stranded and single-stranded siRNAs is sequence-dependent and requires endosomal localization. *J Mol Biol* 348, 1079-1090.
- Sioud, M., and Sorensen, D. R. (2003). Cationic liposome-mediated delivery of siRNAs in adult mice. *Biochem Biophys Res Commun* 312, 1220-1225.
- Smith, K. D., Andersen-Nissen, E., Hayashi, F., Strobe, K., Bergman, M. A., Barrett, S. L., Cookson, B. T., and Aderem, A. (2003). Toll-like receptor 5 recognizes a conserved site on flagellin required for protofilament formation and bacterial motility. *Nat Immunol* 4, 1247-1253.
- Spits, H., Couwenberg, F., Bakker, A. Q., Weijer, K., and Uittenbogaart, C. H. (2000). Id2 and Id3 inhibit development of CD34(+) stem cells into predendritic cell (pre-DC)2 but not into pre-DC1. Evidence for a lymphoid origin of pre-DC2. *J Exp Med* 192, 1775-1784.
- Stein, C. A., Subasinghe, C., Shinozuka, K., and Cohen, J. S. (1988). Physicochemical properties of phosphorothioate oligodeoxynucleotides. *Nucleic Acids Res* 16, 3209-3221.
- Steiner, T. S., Nataro, J. P., Poteet-Smith, C. E., Smith, J. A., and Guerrant, R. L. (2000). Enteroaggregative *Escherichia coli* expresses a novel flagellin that causes IL-8 release from intestinal epithelial cells. *J Clin Invest* 105, 1769-1777.
- Stetson, D. B., and Medzhitov, R. (2006). Recognition of cytosolic DNA activates an IRF3-dependent innate immune response. *Immunity* 24, 93-103.
- Sugiyama, T., Gursel, M., Takeshita, F., Coban, C., Conover, J., Kaisho, T., Akira, S., Klinman, D. M., and Ishii, K. J. (2005). CpG RNA: identification of novel single-stranded RNA that stimulates human CD14+CD11c+ monocytes. *J Immunol* 174, 2273-2279.
- Suzuki, K., Mori, A., Ishii, K. J., Saito, J., Singer, D. S., Klinman, D. M., Krause, P. R., and Kohn, L. D. (1999). Activation of target-tissue immune-recognition molecules by double-stranded polynucleotides. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 2285-2290.

- Tabeta, K., Georgel, P., Janssen, E., Du, X., Hoebe, K., Crozat, K., Mudd, S., Shamel, L., Sovath, S., Goode, J., *et al.* (2004). Toll-like receptors 9 and 3 as essential components of innate immune defense against mouse cytomegalovirus infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* *101*, 3516-3521.
- Takeshita, F., Leifer, C. A., Gursel, I., Ishii, K. J., Takeshita, S., Gursel, M., and Klinman, D. M. (2001). Cutting edge: Role of Toll-like receptor 9 in CpG DNA-induced activation of human cells. *J Immunol* *167*, 3555-3558.
- Takeuchi, O., Kawai, T., Muhlradt, P. F., Morr, M., Radolf, J. D., Zychlinsky, A., Takeda, K., and Akira, S. (2001). Discrimination of bacterial lipoproteins by Toll-like receptor 6. *Int Immunol* *13*, 933-940.
- Takeuchi, O., Sato, S., Horiuchi, T., Hoshino, K., Takeda, K., Dong, Z., Modlin, R. L., and Akira, S. (2002). Cutting edge: role of Toll-like receptor 1 in mediating immune response to microbial lipoproteins. *J Immunol* *169*, 10-14.
- Tapping, R. I., and Tobias, P. S. (2003). Mycobacterial lipoarabinomannan mediates physical interactions between TLR1 and TLR2 to induce signaling. *J Endotoxin Res* *9*, 264-268.
- Uehori, J., Fukase, K., Akazawa, T., Uematsu, S., Akira, S., Funami, K., Shingai, M., Matsumoto, M., Azuma, I., Toyoshima, K., *et al.* (2005). Dendritic cell maturation induced by muramyl dipeptide (MDP) derivatives: monoacylated MDP confers TLR2/TLR4 activation. *J Immunol* *174*, 7096-7103.
- Ulrich, J. T., and Myers, K. R. (1995). Monophosphoryl lipid A as an adjuvant. Past experiences and new directions. *Pharm Biotechnol* *6*, 495-524.
- Underhill, D. M., Ozinsky, A., Hajjar, A. M., Stevens, A., Wilson, C. B., Bassetti, M., and Aderem, A. (1999). The Toll-like receptor 2 is recruited to macrophage phagosomes and discriminates between pathogens. *Nature* *401*, 811-815.
- Vallin, H., Blomberg, S., Alm, G. V., Cederblad, B., and Ronnblom, L. (1999). Patients with systemic lupus erythematosus (SLE) have a circulating inducer of interferon-alpha (IFN-alpha) production acting on leucocytes resembling immature dendritic cells. *Clin Exp Immunol* *115*, 196-202.
- Vollmer, J., Tluk, S., Schmitz, C., Hamm, S., Jurk, M., Forsbach, A., Akira, S., Kelly, K. M., Reeves, W. H., Bauer, S., and Krieg, A. M. (2005). Immune stimulation mediated by autoantigen binding sites within small nuclear RNAs involves Toll-like receptors 7 and 8. *J Exp Med* *202*, 1575-1585.
- Vollmer, J., Weeratna, R. D., Jurk, M., Samulowitz, U., McCluskie, M. J., Payette, P., Davis, H. L., Schetter, C., and Krieg, A. M. (2004). Oligodeoxynucleotides lacking CpG dinucleotides mediate Toll-like receptor 9 dependent T helper type 2 biased immune stimulation. *Immunology* *113*, 212-223.
- Wagner, H. (1999). Bacterial CpG DNA activates immune cells to signal infectious danger. *Adv Immunol* *73*, 329-368.
- Wang, C., Deng, L., Hong, M., Akkaraju, G. R., Inoue, J., and Chen, Z. J. (2001). TAK1 is a ubiquitin-dependent kinase of MKK and IKK. *Nature* *412*, 346-351.
- Wang, T., Town, T., Alexopoulou, L., Anderson, J. F., Fikrig, E., and Flavell, R. A. (2004). Toll-like receptor 3 mediates West Nile virus entry into the brain causing lethal encephalitis. *Nat Med* *10*, 1366-1373.
- Weatherill, A. R., Lee, J. Y., Zhao, L., Lemay, D. G., Youn, H. S., and Hwang, D. H. (2005). Saturated and polyunsaturated fatty acids reciprocally modulate dendritic cell functions mediated through TLR4. *J Immunol* *174*, 5390-5397.
- Werts, C., Tapping, R. I., Mathison, J. C., Chuang, T. H., Kravchenko, V., Saint Girons, I., Haake, D. A., Godowski, P. J., Hayashi, F., Ozinsky, A., *et al.* (2001). Leptospiral lipopolysaccharide activates cells through a TLR2-dependent mechanism. *Nat Immunol* *2*, 346-352.

- 
- Wesche, H., Gao, X., Li, X., Kirschning, C. J., Stark, G. R., and Cao, Z. (1999). IRAK-M is a novel member of the Pelle/interleukin-1 receptor-associated kinase (IRAK) family. *J Biol Chem* 274, 19403-19410.
  - Westwood, A., Elvin, S. J., Healey, G. D., Williamson, E. D., and Eyles, J. E. (2006). Immunological responses after immunisation of mice with microparticles containing antigen and single stranded RNA (polyuridylic acid). *Vaccine* 24, 1736-1743.
  - Wong, T. K., and Neumann, E. (1982). Electric field mediated gene transfer. *Biochem Biophys Res Commun* 107, 584-587.
  - Yamada, H., Gursel, I., Takeshita, F., Conover, J., Ishii, K. J., Gursel, M., Takeshita, S., and Klinman, D. M. (2002). Effect of suppressive DNA on CpG-induced immune activation. *J Immunol* 169, 5590-5594.
  - Yamamoto, M., Sato, S., Mori, K., Hoshino, K., Takeuchi, O., Takeda, K., and Akira, S. (2002). Cutting edge: a novel Toll/IL-1 receptor domain-containing adapter that preferentially activates the IFN-beta promoter in the Toll-like receptor signaling. *J Immunol* 169, 6668-6672.
  - Yang, S., Tutton, S., Pierce, E., and Yoon, K. (2001). Specific double-stranded RNA interference in undifferentiated mouse embryonic stem cells. *Mol Cell Biol* 21, 7807-7816.
  - Yarovinsky, F., Zhang, D., Andersen, J. F., Bannenberg, G. L., Serhan, C. N., Hayden, M. S., Hieny, S., Sutterwala, F. S., Flavell, R. A., Ghosh, S., and Sher, A. (2005). TLR11 activation of dendritic cells by a protozoan profilin-like protein. *Science* 308, 1626-1629.
  - Yasuda, K., Rutz, M., Schlatter, B., Metzger, J., Luppa, P. B., Schmitz, F., Haas, T., Heit, A., Bauer, S., and Wagner, H. (2006). CpG motif-independent activation of TLR9 upon endosomal translocation of "natural" phosphodiester DNA. *Eur J Immunol* 36, 431-436.
  - Yasuda, K., Yu, P., Kirschning, C. J., Schlatter, B., Schmitz, F., Heit, A., Bauer, S., Hochrein, H., and Wagner, H. (2005). Endosomal translocation of vertebrate DNA activates dendritic cells via TLR9-dependent and -independent pathways. *J Immunol* 174, 6129-6136.
  - Yoneyama, M., Kikuchi, M., Natsukawa, T., Shinobu, N., Imaizumi, T., Miyagishi, M., Taira, K., Akira, S., and Fujita, T. (2004). The RNA helicase RIG-I has an essential function in double-stranded RNA-induced innate antiviral responses. *Nat Immunol* 5, 730-737.