

Aus der Abteilung für Klinische Pharmakologie

Leiter: Prof. Dr. med. S. Endres

Medizinische Klinik Innenstadt

Klinikum der Universität

Ludwig-Maximilians-Universität München

Direktor: Prof. Dr. med. M. Reincke

**Immunstimulatorische DNA: Wirkung auf Effektorlymphozyten
des angeborenen und adaptiven Immunsystems**

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin

an der Medizinischen Fakultät der

Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Maria Margarete Günthner-Biller

aus Rosenheim

2011

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. S. Endres
2. Berichterstatter: Prof. Dr. Wolfgang Zimmermann
- Mitberichterstatter: PD Dr. Peter Kufer
Prof. Dr. Dr. h.c. Ulrich Koszinowki
- Mitbetreuung durch die
promovierten Mitarbeiter: Prof. Dr. med. V. Hornung
Prof. Dr. med. G. Hartmann
- Dekan: Prof. Dr. Dr. h.c. M. Reiser, FACR, FRCR
- Tag der mündlichen Prüfung: 03.03.2011

Meinen Eltern in Dankbarkeit

Inhaltsverzeichnis

| | |
|---|----------|
| 1. Einleitung | 1 |
| 1.1 Das humane Immunsystem..... | 1 |
| 1.2 Einführung in das humane Immunsystem | 1 |
| 1.2.1 Angeborene Immunität | 1 |
| 1.2.2 Adaptive Immunität..... | 2 |
| 1.3 Dendritische Zellen als Schnittstelle zwischen angeborener und adaptiver .. Immunität..... | 4 |
| 1.3.1 Die plasmazytoide dendritische Zelle (PDC)..... | 4 |
| 1.3.2 Charakteristika der PDC | 5 |
| 1.3.3 Funktionsweise der PDC | 6 |
| 1.3.3.1 PDC und Viren..... | 7 |
| 1.3.3.2 PDC und CpG | 8 |
| 1.3.3.3 PDC und Autoimmunität | 10 |
| 1.3.4 Signalkaskaden der PDC die zur IFN-Produktion führen | 12 |
| 1.3.5 Die myeloide dendritische Zelle..... | 13 |
| 1.4 Die Toll-like-Rezeptoren als Erkennungsmechanismus des | 15 |
| Immunsystems | 15 |
| 1.4.1 Toll-like-Rezeptoren und ihre Liganden | 16 |
| 1.4.2 Der Signalweg der Toll-like-Rezeptoren | 16 |
| 1.4.2.1 TLR Signaling über MyD88..... | 17 |
| 1.4.2.2 TLR Signaling unabhängig von MyD88 (TRIF abhängig) | 18 |
| 1.5 RNA Interferenz | 19 |
| 1.5.1 Geschichte der RNA-Interferenz..... | 20 |
| 1.5.2 Funktionsweise der RNA-Interferenz | 21 |
| 1.5.3 Transkriptionelles Silencing versus post-transkriptionelles Silencing | 23 |
| 1.5.4 siRNA – das Penicillin des 21 Jahrhunderts? | 23 |
| 1.5.4.1 Strukturelle Voraussetzungen von siRNA zum Einsatz | |
| beim Menschen | 24 |
| 1.5.4.2 Virus oder Spritze? – Schwierigkeiten der Applikation von siRNA im therapeutischen Bereich | 24 |
| 1.5.4.2.1 Applikation von siRNA durch viralen Vektoren | 25 |
| 1.5.4.2.2 Applikation von synthetisch produzierter siRNA | 25 |
| 1.6 Fragestellung | 26 |

| | |
|---|-----------|
| 2. Material und Methoden | 28 |
| 2.1 Geräte und Verbrauchsmaterialien..... | 28 |
| 2.1.1 Geräte | 28 |
| 2.1.2 Chemikalien | 28 |
| 2.1.3 Reagenziensätze..... | 29 |
| 2.1.4 Materialien für die Zellkultur | 29 |
| 2.1.5 Zytokine, Wachstumsfaktoren und Stimulanzen | 30 |
| 2.1.6 Zellkulturmedien, Puffer und Lösungen | 30 |
| 2.1.7 Antikörper..... | 32 |
| 2.1.8 Oligodesoxynukleotide | 32 |
| 2.1.9 Zelllinien | 34 |
| 2.2 Zellär-immunologische Methoden..... | 34 |
| 2.2.1 Zellkultur | 34 |
| 2.2.1.1 Allgemeine Kulturbedingungen | 34 |
| 2.2.1.2 Bestimmung der Zellzahl und Vitalität..... | 34 |
| 2.2.1.3 Kultivierung von Tumorzelllinien | 34 |
| 2.2.1.4 Kultivierung und Transfektion von Zellen des peripheren Blutes..... | 35 |
| 2.2.2 Durchflusszytometrie | 35 |
| 2.2.2.1 Allgemeines Funktionsprinzip | 35 |
| 2.2.2.2 Bestimmung von Oberflächenmolekülen..... | 37 |
| 2.2.3 Aufreinigung von Zellpopulationen | 37 |
| 2.2.3.1 Isolation von mononukleären Zellen des peripheren Blutes | 37 |
| 2.2.3.2 Aufreinigung mittels magnetischer Zellsortierung..... | 38 |
| 2.2.3.3 Aufreinigung mit der FACS-Methode | 38 |
| 2.2.4 Enzyme linked immunosorbent assay | 39 |
| 2.3 Tierexperimente | 39 |
| 2.3.1 In vivo Stimulation mit siRNA..... | 39 |
| 2.4 Statistische Analyse | 40 |
| 3. Ergebnisse | 41 |
| 3.1 Die Detektion doppelsträngiger siRNA durch die plasmazytoide dendritische Zelle führt zur Interferonproduktion..... | 41 |
| 3.1.1 Hemmung der TLR9 Expression in HEK293 Zellen mit siRNA | 41 |
| 3.1.2 Transfektion von gegen TLR9 gerichtete siRNA erhöht die IFN-alpha... Produktion in PDC anstatt sie zu hemmen | 43 |
| 3.1.3 Identifizierung der IFN-alpha induzierenden Sequenz | 46 |
| 3.1.3.1 Konfiguration | 46 |
| 3.1.3.2 Sequenz | 49 |

| | |
|---|-----------|
| 3.1.3.3 Längenabhängigkeit der immunologischen Aktivität | 50 |
| 3.1.4 Der Einfluss von RNA stabilisierender „locked nucleic acid“ auf die Funktionalität von siRNA 9.2 | 51 |
| 3.1.5 siRNA wird über TLR7 erkannt..... | 53 |
| 4. Diskussion | 56 |
| 4.1 Übersicht über die experimentellen Befunde | 56 |
| 4.2 Sind siRNAs zu klein, um vom Radar des Immunsystems detektiert zu werden? | 57 |
| 4.3 Aktivierung des humanen Immunsystems durch siRNAs..... | 58 |
| 4.3.1 Immunstimulation in verschiedenen Zellpopulationen..... | 58 |
| 4.3.2 Erkennung von siRNAs durch die PDC im humanen System | 59 |
| 4.3.3 Sequenzabhängigkeit der immunstimulatorischen Wirkung von siRNA . | 60 |
| 4.4 Einfluss methodischer Aspekte auf den Nachweis der immunologischen Aktivität von siRNA..... | 61 |
| 4.5 Chemische Modifikationsmöglichkeiten, die die immunologische Aktivität von siRNAs beeinflussen..... | 61 |
| 4.5.1 Applikationsmodus der siRNA | 61 |
| 4.5.2 Chemische Modifikationen der siRNA | 62 |
| 4.5.2.1 Backbone Modifikationen..... | 63 |
| 4.5.2.2 Modifikationen der Zuckermoleküle | 64 |
| 4.5.2.3 Sequenzmodifikationen der siRNA | 65 |
| 4.6 Von Bench to bedside | 65 |
| 4.6.1 Immunstimulatorische siRNA – als Therapie gegen virale Infektionen? . | 66 |
| 4.6.2 Immunstimulatorische siRNA – als Therapie gegen cancer immunoediting? | 67 |
| 5. Zusammenfassung | 68 |
| 6. Literaturverzeichnis | 70 |
| 7. Verzeichnis der Abkürzungen und Akronyme | 85 |
| 8. Danksagung | 87 |
| 9. Veröffentlichungen | 88 |

1. Einleitung

1.1 Das humane Immunsystem

Der Begriff Immunität leitet sich vom lateinischen Wort „immunitas“ ab, welches ursprünglich bedeutete, dass römische Senatoren während ihrer Amtsperiode befreit waren von verschiedenen Pflichten und Steuern. Historisch wird Immunität daher als Schutz vor etwas verstanden – meist vor Krankheit, hierbei vor allem vor ansteckenden Krankheiten.

Die Zellen, die diesen Schutz verantworten, stellen unser Immunsystem dar. Ihre Hauptaufgabe besteht darin, die in den Körper eindringenden Organismen zu erkennen und sie rechtzeitig auszuschalten – um so das Überleben des Organismus sicherzustellen.

Die letzten fünfzig Jahre haben in Bezug auf das Verständnis des Immunsystems große Fortschritte mit sich gebracht. Während bis zur Mitte des letzten Jahrhunderts die Immunologie weitgehend eine beschreibende Wissenschaft war, konnte sie sich durch die immensen Entwicklungen im Bereich der Labormethoden zur einer erklärenden Wissenschaft entwickeln – die nun in der Lage ist, strukturelle und biochemische Fragen zu beantworten.

1.2 Einführung in das humane Immunsystem

Das Immunsystem lässt sich in zwei große Untergruppen aufteilen – ein angeborenes und ein im Laufe des Lebens, nach Kontakt mit spezifischen Antigenen, erworbenes individuelles Immunsystem.

1.2.1 Angeborene Immunität

Die natürliche oder angeborene Immunität besteht, wie der Name bereits sagt, von Geburt an. Sie beinhaltet Mechanismen, die schon vor Auftreten einer Infektion vorhanden sind und in der Lage sind, rasch auf eindringende Pathogene zu reagieren. Charakteristisch für das angeborene Immunsystem ist dabei, dass die Reaktion, die als

Antwort auf eine Infektion auftritt, immer gleich ist – unabhängig vom Antigen. Diese Form des Immunsystems setzt sich dabei im Wesentlichen aus drei Komponenten zusammen. An vorderster Front stehen chemische und physikalische Barrieren wie Epithelien und Substanzen, die von diesen Epithelien produziert werden und so ein Eindringen von Keimen verhindern sollen. An zweiter Stelle stehen phagozytierende Zellen wie Neutrophile, Makrophagen sowie natürliche Killerzellen, die zur Aufgabe haben eingedrungene Pathogene zu beseitigen. Dabei werden sie von der dritten Säule des angeborenen Immunsystems, nämlich den löslichen Faktoren, die im Blut zu finden sind, unterstützt. Hierzu zählt zum einen das Komplementsystem aber auch die verschiedenen Zytokine, die als Antwort auf die Erkennung eines Pathogens ausgeschüttet werden.

Die Aktivierung des angeborenen Immunsystems hängt vom Erkennen bestimmter Antigen-Merkmale ab. Jene Merkmale haben sich im Laufe der Evolution als ideale Zellstrukturen für unser Immunsystem herauskristallisiert und werden von den sogenannten *pattern recognition receptors (PRRs)* erkannt. Auf den Effektorzellen des angeborenen Immunsystems befinden sich hierzu Rezeptoren, die in der Lage sind bestimmte hoch-konservierte Strukturen, die vielen Mikroorganismen gemeinsam sind, zu erkennen. Diese konservierten Strukturen oder Erkennungsmuster werden auch als *pathogen associated molecular patterns (PAMPs)* bezeichnet und verfügen über bestimmte gemeinsame Merkmale, welche sich dadurch auszeichnen, dass PAMPs spezifisch für bestimmte mikrobielle Pathogene sind und in dieser Form im Wirtsorganismus nicht vorkommen. Erkennungsmuster werden dabei in invarianter Form von einer großen Gruppe verschiedener Pathogene geteilt und sind essentiell für den Überlebensvorteil des Pathogens und daher nicht in der Lage sich durch äußeren Selektionsdruck zu verändern.

1.2.2 Adaptive Immunität

Im Gegensatz zur angeborenen Immunität entsteht die adaptive Immunität erst nach Kontakt mit verschiedenen Pathogenen und nimmt an Differenzierung und Umfang mit jedem Antigenkontakt zu. Hierbei ist das definierende Moment der adaptiven Immunität die Spezifität der Immunantwort gegenüber dem eindringenden Bakterium, Virus oder antigenen Protein. Diese Form der Immunantwort „erinnert“ sich an das jeweilige Makromolekül und führt so zu einer noch stärkeren Immunantwort bei erneutem Kontakt des Wirtsorganismus mit dem Eindringling. Adaptive Immunität ergänzt somit

die angeborene Immunität und kann als Entwicklungsschritt innerhalb der Phylogenese beobachtet werden – erst Wirbeltiere verfügen über eine adaptive Immunität, bestehend aus Lymphozyten und Antikörpern.

Es gibt zwei Arten des adaptiven Immunsystems – eine humorale Immunität und eine zellvermittelte Immunität. Die humorale Immunität wird über Antikörper vermittelt die von B-Zellen nach Antigenkontakt sezerniert werden. Antikörper erkennen spezifisch das jeweilige Antigen, neutralisieren es durch ihre Bindung und geben so gleichzeitig das Signal zur Phagozytose des Komplexes durch die entsprechenden Immunzellen. Die humorale Immunität ist der hauptsächliche Verteidigungsmechanismus von Vertebraten gegenüber extrazellulären Mikroben und deren Sekretionsprodukten.

Zellvermittelte oder auch zelluläre Immunität ist der Teil der adaptiven Immunität der über T-Zellen vermittelt wird. Intrazelluläre Mikroben wie Viren und auch einige Bakterien überleben und proliferieren innerhalb von Makrophagen und anderen Zellen und sind so für Antikörper unerreichbar. Schutz vor solchen Infektionen kommt von der zellulären Immunität, welche sich oftmals des Mechanismus der Lyse der infizierten Zelle bedienen.

Die adaptive Immunität ist durch folgende Merkmale definiert:

- **Spezifität:** Die Immunantwort ist spezifisch für ein bestimmtes Antigen.
- **Diversität:** Die Anzahl an antigenspezifischen Lymphozyten eines einzelnen Individuums ist extrem groß. Es wird angenommen, dass das menschliche Immunsystem zwischen 10^9 und 10^{11} verschiedenen Antigenen unterscheiden kann. Das bedeutet, dass es entsprechend viele verschiedene Lymphozytenklone gibt, die sich lediglich in der Struktur ihres Antigenrezeptors unterscheiden.
- **Klonalität:** Die Rezeptoren des adaptiven Immunsystems sind klonal verteilt. Das heißt, dass nicht alle Zellen des adaptiven Immunsystems die gleichen Rezeptoren tragen, sondern, dass jeweils ein Zellklon mit dem gleichen Rezeptor ausgestattet ist.
- **Gedächtnis:** Der wiederholte Kontakt des Immunsystems mit einem spezifischen Antigen führt zu einer Immunantwort die schneller und stärker ist als beim Erstkontakt. Dies geschieht hauptsächlich dadurch, dass es bei jedem erneuten Kontakt zu einer Proliferation bereits vorhandener spezifischer Lymphozytenklone kommt.

- Selbstlimitation der Immunantwort: Alle normalen Immunantworten ebbten auch nach einiger Zeit wieder ab und das Immunsystem kehrt in den ursprünglichen Aktivierungszustand zurück. Hierfür verantwortlich sind Feedbackmechanismen, die durch die ursprüngliche Immunantwort selbst ausgelöst worden sind und sicherstellen, dass es zu keiner überschießenden Reaktion kommt.

1.3 Dendritische Zellen als Schnittstelle zwischen angeborener und adaptiver Immunität

1.3.1 Die plasmazytoide dendritische Zelle (PDC)

1958 beschrieben die beiden Pathologen Karl Lennert und Wolfgang Remmele in ihrer Arbeit „Karyometrische Untersuchungen an Lymphknotenzellen des Menschen“ (Lennert et al. 1958) einen neuen Zelltypus der eine Plasmazell-ähnliche Morphologie aufwies und sich in T-Zell-Zonen von humanen Lymphknoten und der Milz befand (Lennert et al. 1958).

Bis es zu einer genaueren Beschreibung dieses Zelltyps kommen sollte, vergingen erst noch einige Jahrzehnte. 1988 beschrieb Facchetti et al. diese Zelle als „*plasmacytoid T cells*“ und 1999 wurde sie als „*plasmacytoid monocyte*“ bezeichnet (Facchetti et al. 1998; Cella et al. 1999). Alle diese Beschreibungen beruhten auf Oberflächenmarkern oder der Lokalisation des Zelltyps. Es war zudem seit 1997 bekannt, dass eine Subgruppe von dendritischen Zellen, die im peripheren Blut zu finden und CD4⁺ sowie CD11c⁻ waren, gleichzeitig identisch mit den bereits vorbeschriebenen plasmazytoiden T-Zellen war (Grouard et al. 1997). Dieser Befund wurde von der Entdeckung unterstützt, dass ein Großteil der dendritischen Zellen in den T-Zellarealen der Lymphknoten einen Rezeptor für die Alpha-Kette des Interleukin-3 (IL-3) überexprimiert (Olweus et al. 1997).

Über die Funktion dieser enigmatischen Zelle war jedoch bis dato nur wenig bekannt. Dies sollte sich 1999 ändern als Liu und Colonna unabhängig voneinander zeigen konnten, dass die CD11c⁻ IL-3 abhängige dendritische Zelle mit der sogenannten *IFN alpha producing cell* (IPC) identisch war (Siegal et al. 1999; Cella et al. 1999). Die IPC war bis zu diesem Zeitpunkt als Zelle eingeordnet worden, die keiner der bisher

bekanntes Zelllinien zuzuordnen war, die den *major histocompatibility complex* (MHC) II überexprimierte und auf Viren mit einer ausgeprägten IFN-alpha Produktion reagierte (Chehimi et al. 1989; Perussia et al. 1985).

1.3.2 Charakteristika der PDC

Zellen können nach verschiedenen Kriterien wie Abstammung, Aussehen, Lokalisation und Funktion charakterisiert werden. Von diesen Kriterien ist die Definition der Abstammung eine der schwierigsten. Im humanen System werden dabei zwei Arten von dendritischen Zellen unterschieden – die sich dabei durch ihre Abstammung unterscheiden: Die myeloide (mDC), auch als „*conventional*“ (cDC) bezeichnete dendritische Zelle und die plasmazytoide dendritische Zelle (PDC).

Eine der frühesten Beschreibungen der PDC ordnete diese aufgrund des vorhandenen Oberflächenrezeptors für GM-CSF der myeloiden Linie zu (Olweus et al. 1997). Andere Arbeiten hingegen argumentierten für eine Abstammung der PDC von lymphoiden Vorgängerzellen, vor allem aufgrund des vorhandenen pre-T-Zellrezeptors alpha (pT α) (Corcoran et al. 2003).

Aktuell wird davon ausgegangen, dass es eine relativ große Plastizität innerhalb der myeloiden und lymphoiden Abstammung gibt. So konnte Shigmatsu et al. zeigen, dass PDC sowohl von myeloiden wie auch lymphoiden Prekursorzellen abstammen können und bestimmte Merkmale, die der lymphoiden Linie zugeordnet worden waren, wie der pT α Rezeptor, auch in der myeloiden Linie zu finden sind (Shigmatsu et al. 2004).

Die humane PDC wurde ursprünglich als Lin⁻CD4⁺ MHCII⁺ oder als Lin⁻ ILT1⁻ ILT3⁺ Zelle definiert. Zusätzlich überexprimiert die PDC den Rezeptor für die Alpha-Kette des IL-3 (CD123) (Olweus et al. 1997; Rissoan et al. 1999). Diese Überexpression erklärt die Tatsache, dass das Überleben der PDC in vitro durch die Zugabe von IL3 zur Zellkultur stark verbessert wird (Grouard et al. 1997). Neben dem Fehlen der normalen Marker der myeloiden Zellreihe wie CD11b, CD11c, CD13 und CD33 sowie der Expression von CD45RA auf PDC im Vergleich zu CD45RO auf MDC gibt es aber noch eine Reihe von Oberflächenmolekülen die spezifisch für die PDC sind und sie von der myeloiden DC unterscheiden. Hierzu gehören die Toll-like-Rezeptoren.

Die PDC verfügt über TLR 7, 8 und 9, die alle endosomal lokalisiert sind und MyD88 als Adaptorprotein in der Signalingkaskade benutzen. Desweiteren exprimiert die PDC die sogenannten *blood dendritic cell antigens* (BDCA) (O'Doherty et al. 1993). Hiervon sind BDCA4 und BDCA2 auf der PDC-Oberfläche zu finden. Bei dem BDCA2-Antigen handelt es sich um ein transmembranes Glykoprotein, das zur Familie der C-Typ Lektine gehört (Dzionic et al. 2000). Die Aktivierung des BDCA2-Moleküls führt interessanterweise zur Hemmung der IFN-Produktion der PDC (Dzionic et al. 2001). Da BDCA2 diese funktionelle Problematik zeigt und auch auf CD123⁻CD11c⁺ Zellen zu finden war, hat sich der BDCA4 Rezeptor als Rezeptor zur Isolierung von PDC aus dem peripheren Blut etabliert (Dzionic et al. 2002). In letzter Zeit gab es jedoch Hinweise, dass auch die Selektion über BDCA4 zu einer Veränderung des Verhaltens in der Zellkultur führt, weshalb PDC nun oftmals über den Mechanismus einer negativen Selektion gewonnen werden (Fanning et al. 2006).

1.3.3 Funktionsweise der PDC

Dendritische Zellen werden klassischerweise über ihre Funktion charakterisiert, da DC-typische Oberflächenmarker nicht existieren. Obwohl viele Zellen in der Lage sind Interferon zu produzieren, wird die PDC oftmals als die „*professional IFN producing cell*“ bezeichnet (Fitzgerald-Bocarsly et al. 2008). Dies beruht auf ihrer Fähigkeit, bis zu 10 pg dieses Zytokins pro Zelle zu produzieren – und somit bis zu 100 Prozent mehr als andere Immunzellen (Fitzgerald-Bocarsly et al. 1989; Siegal et al. 2001). Weshalb ist also eine Zelle, die solch hohe Mengen an Interferon produzieren kann, so besonders?

Vor mehr als fünfzig Jahren veröffentlichten Isaacs und Lindenmann den ersten Artikel über eine Substanz die sie Interferon nannten. Den Namen leiteten sie von der Funktion der beschriebenen Substanz ab – der viralen Interferenz. Es handelte sich hierbei um die Beobachtung, dass die Anwesenheit eines Virus in der Lage war die Infektion durch ein zweites Virus in gleicher Kultur zu verhindern. Diese „Interferenz“ beruhte, wie sie zeigen konnten, auf einem löslichen Faktor – dem von ihnen so benannten Interferon (Isaacs et al. 1957).

Die Fähigkeit, durch die Interferonproduktion virale Mechanismen zu hemmen, prädestiniert die PDC an vorderster Front zur Immunabwehr gegen eindringende Viren beizutragen.

1.3.3.1 PDC und Viren

PDC sind Zellen, die innerhalb des Immunsystems auf die Viruserkennung spezialisiert sind. Sie produzieren IFN-alpha nach Kontakt mit einem breiten Spektrum an DNA- und RNA-Viren (Feldman et al. 1994). Die meisten dieser Viren haben eine Hülle, aber es konnte auch gezeigt werden, dass PDC auf nackte Viren, wie zum Beispiel das Polio-Virus, mit einer Interferonantwort reagieren (Palmer et al. 2000).

PDC sind in der Lage, innerhalb von sechs Stunden nach Aktivierung durch ein Virus bis zu 60% ihres neu induzierten Transkriptoms zur Produktion von IFN-alpha zu verwenden. Überdies können sie alle dreizehn bekannten Subtypen von IFN-alpha produzieren (Ito et al. 2006). Von PDC sezerniertes Interferon inhibiert jedoch nicht nur, wie von Isaac und Lindemann beschrieben, die Virusreplikation, sondern führt auch zur Aktivierung der antiviralen Funktion von NK-Zellen, B- und T-Zellen sowie myeloiden dendritischen Zellen. Sie aktivieren und koordinieren somit die angeborene und adaptive Antwort des Immunsystems in Bezug auf den viralen Eindringling.

PDC detektieren Viren hauptsächlich über einen endosomalen Weg. Dieser führt über die Toll-like-Rezeptoren-7 und -9 mit deren Hilfe PDC RNA (TLR7) und DNA (TLR9) Viren erkennen können. Da sich diese TLR transmembranös, jedoch intrazellulär, in einem endosomalen Kompartiment befinden, muss das Virus oder die Nukleinsäure des Virus dorthin gelangen. Für viele Viren erfolgt dies über Bindung an einen spezifischen Rezeptor mit anschließender Rezeptor-vermittelter-Endozytose. Im nächsten Schritt kommt es zur Ansäuerung des endosomalen Kompartimentes, was wiederum zur Fusion des Virus mit der Wand des Endosoms führt um dann im letzten Schritt zu einer Freisetzung des Virus ins Zytoplasma zu führen

Da PDC auf die Erkennung von Viren spezialisiert sind, müssen sie über einen modulierenden Mechanismus verfügen, der ihnen erlaubt, z.B. mit Hilfe des Fc-Rezeptors DNA- und RNA-Antikörper-Komplexe zu erkennen.

Hierfür eignen sich C-Lektin-Rezeptoren, sie verfügen über die Fähigkeit virale Glykoproteine zu erkennen (Fitzgerald-Bocarsly et al. 2008). PDC tragen auf ihrer Oberfläche das BDCA2 Antigen, welches zur Familie der C-Lektine gehört und ein Endozytoserezeptor ist (Dzionek et al. 2001). Ein weiterer Rezeptor auf der Oberfläche von PDC, der der Erkennung von Viren oder von DNA oder RNA komplexiert mit Antikörpern dient, ist der FcγRII (CD32)-Rezeptor. Wie bereits länger bekannt, spielt er

eine Rolle in der autoimmunvermittelten IFN-alpha Antwort besonders im Rahmen des Lupus erythematoses. Es konnte gezeigt werden, dass es in der Maus nach Oponierung zur Aufnahme des Coxsackie-B-Virus über den FcγRII-Rezeptor und Erkennung via TLR7 zur IFN-alpha Produktion kommt (Wang et al. 2007). Viren können aber auch durch direkte Injektion ins Zytoplasma eine Immunantwort in PDC auslösen. Die Mechanismen die hierfür verantwortlich sind, sollten im Rahmen dieser Arbeit mit untersucht werden.

1.3.3.2 PDC und CpG

PDC spielen nicht nur eine Rolle in der Abwehr gegenüber Viren, sondern sind auch in der Lage bakterielle Strukturen zu erkennen. Tokunaga konnte dabei als erster zeigen, dass bakterielle DNA immunstimulatorische Fähigkeiten hat (Tokunaga et al. 1984). 1995 entdeckte Arthur Krieg, dass eine bestimmte Sequenz von unmethylierten CG-Dinukleotiden verantwortlich ist für die immunstimulatorische Fähigkeit von bakterieller DNA (Krieg et al. 1995). Hemmi konnte 2000 zeigen, dass TLR9 verantwortlich für die Erkennung des CpG-Motifs ist und Bauer et al. zeigte kurz darauf, dass CpG Erkennung durch TLR9 Spezies spezifisch ist (Hemmi et al. 2000; Bauer et al. 2001).

CpG-Desoxynukleotide (CpG-ODN) führen in PDC jedoch nicht nur zur Produktion von IFN-alpha sondern auch zur Ausschüttung einer ganzen Reihe weiterer proinflammatorischen Zytokinen wie TNF-alpha und IL6. Wenn PDC gleichzeitig mit CpG-ODN und CD40L stimuliert werden, sind sie in der Lage große Mengen an IL12p70 zu produzieren. Diese so stimulierten PDC sind dann in der Lage naive T-Zellen in eine Th1-Richtung zu primen (Krug et al. 2001).

Im Anschluss an eine Stimulierung der PDC kommt es zur Ausschüttung von Zytokinen aber auch zur Aufregulation von kostimulatorischen Molekülen (CD80 und CD86) und *homing*-Rezeptoren (CCR7). Besonders die Hochregulation der kostimulatorischen Moleküle CD80 und CD86 spielt eine wichtige Rolle in der Aktivierung von T-Zellen, da es ohne kostimulatorisches Signal nur zur partiellen Aktivierung der T-Zelle und somit zu einer Toleranzentwicklung gegenüber dem auslösenden Stimulus kommen kann.

CpG-ODN sind jedoch nicht gleich CpG-ODN – sie unterscheiden sich besonders in ihrer Fähigkeit, unterschiedliche Immunzellen verschieden stark zu aktivieren. Hierbei kristallisierten sich drei Gruppen heraus: CpG A, CpG B und CpG C. CpG A ist

charakterisiert durch polyA-Sequenzen an beiden Enden, eine zentrale Palindromsequenz und CG-Dinukleotide innerhalb des Palindroms; der Prototyp des CpG A ist ODN 2216. ODN 2216 ist in der Lage PDC so zu stimulieren, dass sie große Mengen an IFN-alpha und IFN-beta produzieren. Demgegenüber steht CpG B – Prototyp ODN 2006, welches eine Hochregulation kostimulatorischer Moleküle, aber nur eine geringe IFN-alpha Antwort in PDC bedingt (Krug et al. 2001). CpG B aktiviert vor allem B-Zellen, führt zu einer hohen IL-6-Ausschüttung und trägt so zur Auslösung einer adaptiven Immunantwort bei (Krieg et al. 1995; Hartmann et al. 2000).

CpG C hingegen kann beide positiven Eigenschaften von CpG A und CpG B vereinen: neben einer starken IFN-alpha Induktion in PDC kann CpG C auch B-Zellen zur Proliferation und Zytokinproduktion anregen. CpG C verfügt über ein hexamerisches CpG Motiv am 5`Ende, das mit einer GC-reichen Palindrom-Sequenz verbunden ist. Um sein volles Potenzial erreichen zu können, müssen diese beiden Bereiche in Kontakt treten. Eine Zerstörung der Palindrom-Sequenz innerhalb von CpG C führt zum vollständigen Verlust der Fähigkeit eine IFN-alpha Antwort auszulösen (Vollmer et al. 2004).

Die Aktivierung von PDC und B-Zellen führt zu einer Aktivierung anderer Untergruppen von Immunzellen. Auch hier unterscheiden sich CpG A und CpG B voneinander. CpG A führt zu einer Antigen-unabhängigen Aktivierung von CD8 Gedächtnis-T-Zellen, fördert die IFN-gamma-Produktion und Aktivität von $\gamma\delta$ -T-Zellen und stimuliert NK-Zellen (Hornung et al. 2002; Rothenfusser et al. 2001). Im Gegensatz dazu ist CpG B nur ein schwacher Aktivator für NK- und $\gamma\delta$ -T-Zellen. Beide CpG-Klassen führen jedoch zu einer Hochregulation von kostimulatorischen Molekülen in myeloiden dendritischen Zellen und Monozyten.

1.3.3.3 PDC und Autoimmunität

Im Laufe der letzten Jahre ist zunehmend klarer geworden, dass PDC auch eine Schlüsselstellung im Rahmen von Autoimmunerkrankungen einnimmt. PDC sind in der Lage durch die Produktion von IFN-alpha und IL-12 eine Th1-Antwort auszulösen. Gleichzeitig können sie aber auch eine T-Zell-vermittelte Autoimmunität auslösen, die mit einer Differenzierung von B-Zellen in Plasmazellen und anschließender Produktion von Autoantikörpern einhergeht.

Aufgrund dieser Situation und der Tatsache, dass sich im extrazellulären Kompartiment körpereigene Nukleinsäuren befinden, die von nekrotischen und apoptotischen Zellen freigesetzt werden, ist es umso wichtiger, dass eine Unterscheidung zwischen fremder und körpereigener DNA stattfindet. Deshalb scheint es mehrere Sicherheitsebenen zu geben, die eine fälschliche Erkennung von Selbst als Fremd verhindern. Einer dieser Sicherungsmechanismen besteht darin, dass sich jene TLR, die DNA oder RNA erkennen können, innerhalb eines intrazellulären Kompartiments befinden und eine Erkennung ausschließlich dort stattfinden zu scheint. Während DNA von Pathogenen mittels Endozytose in die Zelle aufgenommen wird, geschieht dies für körpereigene DNA normalerweise nicht (Barton et al. 2006). Als zweite Sicherheitsvorkehrung kann das Vorhandensein von hohen Konzentrationen an körpereigener DNase im extrazellulären Raum gesehen werden. Dadurch wird eine rasche Degradierung der körpereigenen DNA sichergestellt, die von apoptotischen und nekrotischen Zellen freigesetzt wurde. Die Signifikanz dieses Mechanismus wird besonders bei Patienten mit SLE deutlich, bei denen überproportional häufig ein Defekt in der DNase1 gefunden wurde (Yasutomo et al. 2001).

Letztlich dienen auch strukturelle Unterschiede zwischen humaner und mikrobieller DNA als Unterscheidungskriterium. Bakterielle oder virale DNA enthält unmethylierte CpG Motive, die TLR9 binden und so eine Immunantwort auslösen. Humane DNA hingegen enthält nur sehr wenige solcher Motive und die meisten sind durch Methylierung für TLR9 „unkenntlich“ gemacht (Stacey et al. 2003). Eine ähnliche Situation trifft für TLR7 zu, da dieser Rezeptor ebenfalls nur unmodifizierte körperfremde RNA optimal detektiert.

Diese Kontrollmechanismen sind jedoch nicht undurchdringbar: Immunreaktionen auf körpereigene DNA bilden die Grundlage einiger Autoimmunerkrankungen. Das Krankheitsbild des systemischen Lupus erythematoses (SLE) ist diesbezüglich

besonders gut erforscht. Bei Patienten, die an dieser Erkrankung leiden, kommt es zu einer kontinuierlichen Aktivierung der PDC durch zirkulierende Immunkomplexe die körpereigene DNA und gegen diese DNA gerichtete Antikörper enthält (Barat et al. 2005). Patienten, die an SLE leiden haben erhöhte Interferonspiegel und gleichzeitig eine erniedrigte Anzahl an PDC im peripheren Blut – was wahrscheinlich durch die Umverteilung der PDC in die Haut bedingt ist. Die IFN-alpha Ausschüttung führt zu einer kontinuierlichen Aktivierung und Reifung myeloider dendritischer Zellen und einer damit verbundenen Aktivierung autoreaktiver T-Zellen. Durch die IFN- und IL6-Ausschüttung der PDC kommt es zusätzlich zu einer Stimulierung und Ausreifung von B-Zellen zu Autoantikörper-produzierenden Plasmazellen (Jego et al. 2003). Der auslösende Faktor, der zum Versagen der Toleranz gegenüber körpereigener DNA führt, ist bei SLE in der Komplexbildung zwischen DNA und DNA-spezifischen Autoantikörpern gefunden worden. Diese Komplexe können über den Fc-Rezeptor für IgG internalisiert werden und so in TLR9-haltige Endosome gelangen; dort kommt es dann zur Auslösung der Immunantwort über die Signalkaskade des TLR.

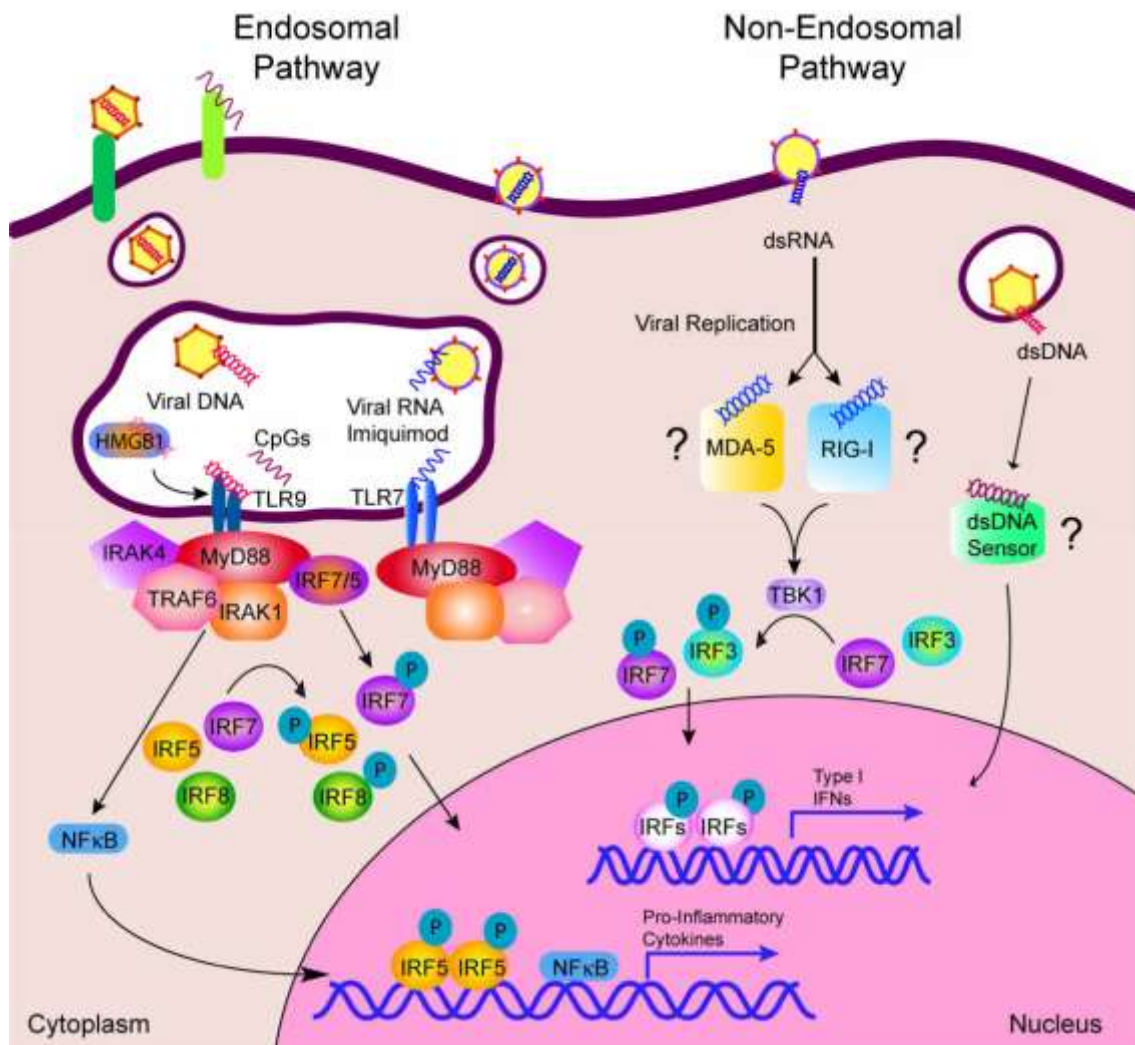
Die Signalkaskade der Toll-like-Rezeptoren ist jedoch bei weitem nicht die einzige Signalkaskade, die der Interferonregulation dient. Ein wichtiger weiterer Signalweg innerhalb der PDC ist der sogenannte *ITAM (immunoreceptor based tyrosine activation motif)*-Pathway. Diese Aktivierungskaskade benutzen die PDC-Oberflächenmoleküle *BDCA2 (blood dendritic cell antigen 2)*, *ILT7 (immunoglobulin like transcript 7)* und *FcεR1α (high affinity Fc receptor für IgE)*. Wie von Cao et al. und Watari et al. kürzlich gezeigt werden konnte, führt eine Aktivierung des ITAM-Pathway über die obengenannten Rezeptoren zu einer Inhibition der TLR-vermittelten IFN-alpha Produktion (Cao et al. 2007; Watari et al. 2008). Diese regulatorischen Rezeptoren und die damit verbundene Signalkaskade scheinen dazu zu dienen, die TLR vermittelte Interferonproduktion zu kontrollieren. Ein Versagen dieser Mechanismen führt hingegen zu einer Fehlregulation der IFN-alpha Produktion und einer damit verbundenen Prädisposition für Autoimmunerkrankungen.

1.3.4 Signalkaskaden der PDC die zur IFN-Produktion führen

Die Signalkaskade, die ablaufen muss, damit es zu einer Interferonproduktion kommt, ist aufgrund der weitreichenden Konsequenz, die eine Störung dieses Signalweges hat, wohl eine der am besten erforschten. Die Endstrecke dieser Signaltransduktionskaskade ist schon lange bekannt: Auf dem klassischen Weg, der im Zytoplasma der Zelle abläuft, kommt es nach Kontakt der Zelle mit einem Virus zur Phosphorylierung des Adaptormoleküls IRF-3, welches daraufhin im Zellkern die Transkription weniger IFN-Typ-I-Gene auslöst, was wiederum zur Hochregulierung des Adaptormoleküls IRF-7 führt. Letzteres wird nun phosphoryliert und führt im Zellkern in einer zweiten Transkriptionswelle zu einer endgültigen Hochregulation der Expression von vielen IFN-alpha Genen mit der Folge der IFN-alpha-Ausschüttung (Sato et al. 2000).

PDC unterscheiden sich in signifikanter Weise dadurch von „normalen“ Immunzellen, dass IRF-7 dauerhaft hochreguliert ist und somit sehr viel rascher im Zellkern eine IFN-alpha Antwort auslösen kann (Honda et al. 2005). PDC haben aber nicht nur dauerhaft hochreguliertes IRF-7, sondern auch IRF-4, -5 und -8 (Izaguirre et al. 2003). Dies spielt eine wichtige Rolle im Rahmen der Interferonantwort, die über den endosomalen Weg der TLR-Aktivierung ausgelöst wurde.

Ist die PDC über TLR9 stimuliert worden, muss es, damit es zur Interferonantwort kommt, zur Formation eines Komplexes kommen, der aus verschiedenen Transkriptionsfaktoren besteht. Diese sind der *receptor-associated factor 6 (TRAF6)* sowie die *interleukin-1 receptor-associated kinase 1 (IRAK1)* und 4 (*IRAK4*). IRAK4 phosphoryliert IRAK1 welche wiederum IRF-7 phosphoryliert damit dieses dann im Nukleus die Hochregulation der IFN-alpha Gene auslösen kann (Honda et al. 2004).



Fitzgerald-Bocarsly, 2008

1.3.5 Die myeloide dendritische Zelle

Die myeloide dendritische Zelle (MDC) bildet neben der plasmazytoiden dendritischen Zelle die zweite Säule der peripheren dendritischen Zellen im humanen System. Diese beiden Zellarten unterscheiden sich in ihren Aufgaben jedoch grundlegend. Während die PDC nach Kontakt mit den entsprechenden Antigenen eine Interferonantwort und die damit verbundene Aktivierung des Immunsystems auslöst, besteht die Aufgabe der MDC in einer Präsentatorfunktion und ist damit Initiator einer adaptiven Immunantwort.

MDC finden sich neben ihren Vorläuferzellen, die im peripheren Blut zu finden sind, in fast allen menschlichen Organen als gewebständige Zellen und werden oft als *professional antigen presenting cell* (APC) bezeichnet (Banchereau et al. 1998). Der Begriff *professional* bedeutet in diesem Zusammenhang die einzigartige Fähigkeit

dieser Zelle, eine Antigen spezifische T-Zellantwort auszulösen und unterscheidet sich dadurch von anderen Zellen mit der Fähigkeit zur Antigenpräsentation wie B-Zellen oder Makrophagen. Um dies erreichen zu können, befindet sich die MDC gehäuft an Stellen des Körpers, die vermehrt mit Pathogenen in Kontakt kommen, wie der Schleimhaut des Gastrointestinaltraktes sowie des respiratorischen Systems. Nachdem es zu einer lokalen Aktivierung der gewebsständigen mDC, ausgelöst durch die Erkennung und Phagozytose des Pathogens, gekommen ist, bewegt sie sich in die T-Zellareale des lymphatischen Systems. Die Fähigkeit, dort spezifische T-Zellen zu primen, hängt jedoch komplett vom Aktivierungszustand der MDC ab. Diese Aktivierung ist abhängig von PAMPs, die durch die MDC selbst erkannt werden, aber auch von sezernierten Zytokinen wie Interferon-alpha und Interleukin-6 (Geijtenbeek et al. 2004). Nach Stimulation durch PAMPs oder proinflammatorischen Zytokinen kommt es zur Hochregulation kostimulatorischer Moleküle auf der Oberfläche der MDC. Nur wenn kostimulatorische Marker wie CD40, CD80 und CD86 vorhanden sind, kann es zur T-Zell-Aktivierung und angemessenen Immunabwehr kommen. Fehlt diese Kostimulation kommt es zu der Ausbildung von tolerogenen T-Zellen (Jonuleit et al. 2000).

Lange Zeit waren Versuche mit myeloiden dendritischen Zellen auf Grund ihrer geringen Dichte, die eine Isolation erschwert, sehr schwierig. Durch die Verfügbarkeit von hämatopoetischen Wachstumsfaktoren und der damit verbundenen Entwicklung von Kulturprotokollen änderte sich diese Situation jedoch grundlegend. So können nun humane MDC aus CD34+ Stammzellen und Monozyten in vitro generiert werden (Caux et al. 1997; Romani et al. 1996). Die Fähigkeit relativ große Mengen an spezifischen und falls nötig auch Spender spezifischen myeloiden dendritischen Zellen generieren zu können öffnete den Weg hin zum klinischen Einsatz. Die hauptsächliche Anwendung ist hierbei der Einsatz als Adjuvanz in der Entwicklung von Vakzinestudien bei malignen Erkrankungen (Romani et al. 1996). Ziel des Einsatzes von tumorspezifischen MDC ist die Stimulation einer tumorantigenspezifischen T-Zellantwort und so die Auslösung einer Immunität gegenüber den für das Individuum spezifischen Krebszellen.

1.4 Die Toll-like-Rezeptoren als Erkennungsmechanismus des Immunsystems

Die Familie der Toll-like-Rezeptoren spielt eine zentrale Rolle in der Erkennung von Pathogenen. Das Toll-Protein wurde das erste Mal in der Drosophila als essentielles Protein in der Festlegung der dorsoventralen Polarität beschrieben (Hashimoto et al. 1988). 1996 konnte Lemaitre zeigen, dass das Toll-Protein auch eine wichtige Rolle für die Abwehr von Pilzinfektionen in der Drosophila hat. Fliegen, die eine Mutation im Toll-Gen aufwiesen, waren anfällig gegenüber Pilzinfektionen, nicht aber gegenüber bakteriellen Pathogenen (Lemaitre et al. 1996).

Bei Toll handelt es sich um einen transmembranen Rezeptor, dessen extrazelluläre Domäne sogenannte *leucine rich repeat (LRR) motifs* enthält. Der zytoplasmatische Teil des Toll-Proteins verfügt über Ähnlichkeiten mit denen der humanen Interleukin-1-Rezeptor-Familie und wird deshalb als Toll/IL-1R (TIR) homologe Domäne bezeichnet (Kopp et al. 1999). Der extrazelluläre Anteil des Toll-Rezeptors hat jedoch keinerlei Ähnlichkeit zu den IL1-Rezeptoren.

1997 wurde von Medzithov et al. bei einer Datenbanksuche eine dem Toll entsprechende humane Gensequenz identifiziert und es konnte gezeigt werden, dass die Überexpression dieses Proteins zur Induktion von inflammatorischen Molekülen führt (Medzithov et al. 1997). Dieser erste humane Toll-Rezeptor wurde anfänglich als hToll bezeichnet und ist jetzt als TLR4 klassifiziert.

Die TLR-Familie enthält bisher zehn humane (TLR1-TLR10) und zwölf murine Rezeptoren (TLR1-TLR9 und TLR11-TLR13). Jeder der einzelnen TLR erkennt ein spezifisches Muster. Sie bilden damit eine Schlüsselstelle innerhalb des angeborenen Immunsystems in Bezug auf die Erkennung von eindringenden Mikroorganismen.

1.4.1 Toll-like-Rezeptoren und ihre Liganden

Folgende Toll-like-Rezeptoren und ihre jeweiligen Liganden sind bisher bekannt.

| | |
|-----------|--|
| TLR1/TLR2 | Triacyl lipopetide |
| TLR2 | Peptidoglycan Lipopetide, Lipoteichoic acid, Zymosan, Glycolipide, Phenol lösliches Modulin |
| TLR3 | dsRNA |
| TLR4 | LPS, Taxol, RSV fusion Protein HSP, Fibronectin, Hyaluronsäure |
| TLR5 | Flagelin |
| TLR6 | Diacyl Lipopetide |
| TLR7 | ssRNA, Imidazoquinoline |
| TLR8 | ssRNA, Imidazoquinoline (nur im Menschen) |
| TLR9 | CpG DNA |
| TLR10 | unbekannt |

1.4.2 Der Signalweg der Toll-like-Rezeptoren

Die Erkennung von PRRs führt zur Dimerisierung der Toll-like-Rezeptoren und subsequenten Aktivierung einer intrazellulären Signalkaskade. Ziel der Geninduktion ist die Produktion von proinflammatorischen Zytokinen und weiteren anti-mikrobiellen Effektormolekülen zum Schutz des Organismus vor eindringenden Pathogenen. Gemeinsam ist hierbei allen TLR, dass sie den Transkriptionsfaktor NF- κ B aktivieren, der wiederum eine zentrale Rolle in der Produktion von proinflammatorischen Zytokinen besitzt. Bevor es zur Aktivierung von NF- κ B kommt, müssen eine Reihe von intrazellulären Proteinen rekrutiert werden, denen allen gemeinsam ist, dass sie über eine TIR-Domäne verfügen.

Bisher sind fünf solcher Adapterproteine bekannt:

- *myeloid differentiation primary response protein 88* (MyD88)
- *MyD88-adapter like* (Mal) = *TIR domain-containing adapter* (TIRAP)
- *TIR domain containing adapter inducing interferon- β* (TRIF) = *TIR-containing adapter molecule-1* (TICAM-1)
- *TRIF related adapter molecule* (TRAM) = *TICAM-2*
- *Sterile alpha and HEAT Armadillo motifs* (SARM)

1.4.2.1 TLR Signaling über MyD88

Wie oben beschrieben, ähnelt die zytoplasmatische Komponente der TLRs dem der IL1-Rezeptorfamilie. Diese beiden Rezeptorklassen teilen sich eine intrazelluläre Region die als Toll-II-1R (TIR) Domäne bezeichnet wird (Martin et al 2002). Die TIR-Domäne verfügt über ein Adaptormolekül, den sogenannten *myeloid differentiation factor 88* (MyD88). Anfangs wurde angenommen, dass alle TLRs dieses Adaptorprotein zur Aktivierung der inflammatorischen Kaskade benutzen. 2004 konnte Akira et al. jedoch zeigen, dass es auch TLRs gibt die eine MyD88-unabhängige Aktivierung des Immunsystems auslösen und TLR3 MyD88-unabhängig ist (Akira et al. 2004).

Mittlerweile ist klar, dass es nach Aktivierung von MyD88 zur Rekrutierung von Kinasen aus der Familie der IL-1-Rezeptoren – abgekürzt als IRAK1-4 (*IL1R associated kinase*) kommt. Die Komplexbildung aus MyD88 und IRAK1-4 führt zur Hyperphosphorysierung von IRAK1 wodurch gleichzeitig eine Lösung der Kinase aus dem Komplex bewirkt wird. Anschließend bindet IRAK1 mit dem in der Signalkaskade weiter unten gelegenen TNF-Adaptor Molekül TRAF-6 (*tumor necrosis factor receptor associated factor 6*) (Deng et al. 2000). Bei TRAF-6 handelt es sich um eine Ligase, die die TGF- β -Kinase TAK1 aktiviert (Ninomiya-Tsuji et al. 1999). In Folge davon kommt es zur Ausschaltung von Kinasen, die ansonsten NF- κ B in eine inaktive Form umwandeln würden. Durch die Ausschaltung dieser Kinasen kann NF- κ B zum Nukleus diffundieren und dort die Produktion von Interferon sowie weiteren proinflammatorischen Zytokinen bewirken.

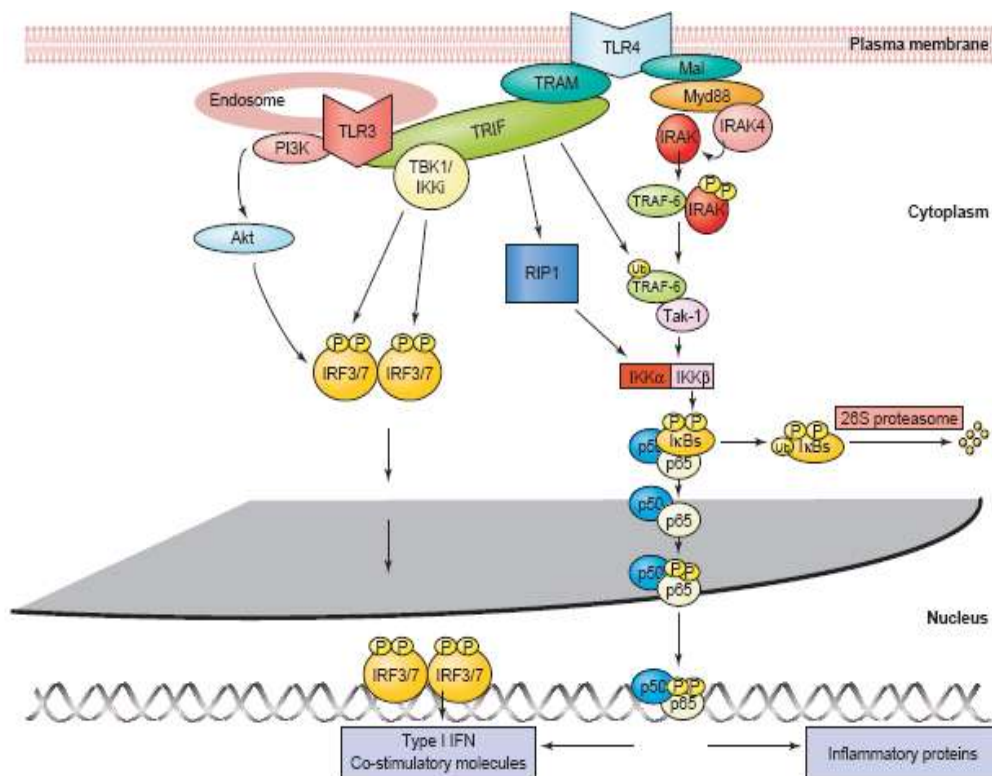
1.4.2.2 TLR Signaling unabhängig von MyD88 (TRIF abhängig)

Der Adaptor, der den MyD88 unabhängigen Aktivierungsweg definiert, ist TRIF. TRIF steht für „*TIR domain containing adapter inducing interferon β* “; synonym wird auch die Bezeichnung „*TIR containing adapter molecule-1 (TICAM-1)*“ benutzt. Diese Doppelbezeichnung rührt daher, dass dieses Adaptorprotein relativ zeitgleich von zwei verschiedenen Arbeitsgruppen entdeckt wurde. So beschrieb Yamamoto 2002 einen Adaptor den er als TRIF bezeichnete und der in dominant negativer Form zu einer Hemmung der TLR3 abhängigen Interferon β Aktivierung führte (Yamamoto et al. 2002). Gleichzeitig beschrieb Oshiumi et al. den gleichen Adaptor, bezeichnete ihn jedoch als TICAM-1 (Oshiumi et al. 2003). Mithilfe von TRIF-Knockout-Mäusen konnte gezeigt werden, dass keine Aktivierung von NF- κ B erfolgt und das auch nach Stimulation mit LPS oder poly I:C zu keiner Hochregulation von IFN-Genen kommt (Yamamoto et al. 2003; Hoebe et al. 2003).

Sowohl im Signalweg von TLR3 wie auch TLR4 bindet TRIF an einen Komplex mit einer Kinase die als TBK1 (*TRAF family member associated NF- κ B activator (TANK)-binding kinase 1*) bezeichnet wird (Fitzgerald et al. 2003). Dadurch kommt es zur Phosphorylierung und damit verbundenen Aktivierung von IFR3/7 und der Induktion von IFN-alpha (Sato et al. 2003).

Der grundlegende funktionelle Unterschied zwischen dem Signaling über MyD88 beziehungsweise TRIF scheint in der Geschwindigkeit der Immunantwort zu liegen. Kawai et al. konnte dies 2001 mit MyD88 Knockout Mäusen zeigen. Die über MyD88 erfolgte Immunantwort führt zu einer schnellen Aktivierung von NF- κ B verbunden mit der Induktion von proinflammatorischen Molekülen. Dahingegen bewirkte die Immunantwort über TRIF eine langsame Aktivierung von NF- κ B verbunden mit der Hochregulierung von IFN-Genen sowie kostimulatorischen Molekülen (Kawai et al. 2001). Das liegt wahrscheinlich daran, dass die TRIF-abhängige Signaltransduktionskaskade nicht wie bei MyD88 von der Zelloberfläche ausgelöst wird, sondern erst vom endosomalen Kompartiment aus aktiviert werden kann.

Die Rolle von SARM ist noch nicht abschließend geklärt. Während eine Knockout Maus, die defizient für SARM war, keine zentrale Schnittstelle für SARM im Immunsystem suggerierte, zeigten Knockdown Experimente in humanen Zellen eine Rolle für SARM als Negativ-Regulator im Rahmen von TLR-Antworten.



Moynagh 2005

1.5 RNA Interferenz

In den frühen neunziger Jahren des vergangenen Jahrhunderts machten Forscher unterschiedlichster Richtung im Rahmen von Genmanipulationen eine gemeinsame unerwartete Feststellung – in bestimmten Versuchsanordnungen kam es immer wieder zu einem unerwarteten Ausschalten von Genfunktionen. Anstatt dies zu ignorieren, wurde versucht dieses Phänomen, das in Pflanzen als Ko-Suppression, in Pilzen als „quelling“ und in Nematoden als „RNA interference“ bezeichnet wurde, weiter untersucht.

Die Veröffentlichung von Fire und Mello 1998, die den dsRNA-abhängigen Mechanismus des post-transkriptionellen Gen *silencing* beschrieb, führte zu einer Revolution weit über die RNA-Biologie hinaus (Fire et al. 1998). Die Tatsache, dass dsRNA zu einer sequenzspezifischen Hemmung der Genexpression und somit der Proteinentstehung führen kann führte zu vielen weiteren weitreichenden Entdeckungen im Bereich der Genregulation.

Der RNAi-Prozess kann in drei Schritte unterteilt werden. Im ersten Schritt wird doppelsträngige RNA, die entweder in der Zelle vorhanden oder von außen eingebracht wurde, mit Hilfe des Ribonukleaseenzym III (RNase III), auch Dicer genannt, in kleine RNA-Duplexe geschnitten. Diese RNA-Duplexe haben eine ungefähre Länge von 20-30 Basenpaaren. Im nächsten Schritt werden die Duplexe gespalten und der Einzelstrang wird auf einen Proteinkomplex geladen, der als *RNA-induced silencing complex* (RISC) bezeichnet wird (Hammond SM et al. 2000). Im dritten Schritt bindet dieser RISC-Komplex mit seiner einzelsträngigen „*guide*“ RNA an ein komplementäres RNA-Molekül. Anschließend wird die komplementäre RNA mit Hilfe einer Endonuklease gespalten und so die Proteinentstehung verhindert.

Die Beschreibung, dass dsRNA als Trigger zur Abschaltung von Genen in *Caenorhabditis elegans* dienen kann, änderten neben der RNA-Forschung auch die Antisense-Forschung. Die Auslösung einer unspezifischen Immunantwort durch das angeborene Immunsystem nach Erkennung der Antisense-Moleküle stellte bis dato ein großes Problem dar. Untersuchungen zur Klärung und Charakterisierung der Ursache dieser unspezifischen Effekte führten letzten Endes zur Entdeckung der CpG Sequenz als immunstimulatorisches Element der DNA (Krieg et al. 2002)

Die ersten Arbeiten mit RNAi in Zellen von Vertebraten zeigten keinerlei unspezifische immunstimulatorische Effekte im Sinne einer Interferonantwort (Elbashir et al. 2001). Aufgrund dieser Ergebnisse sollte die Methode der RNA-Interferenz in dieser Arbeit in humanen PDC zur Untersuchung des TLR Signaling verwendet werden.

1.5.1 Geschichte der RNA-Interferenz

Die Arbeiten, die zur Entdeckung des Phänomens der RNA-Interferenz führen sollten, wurden bereits Mitte der achtziger Jahre durchgeführt. 1984 berichtete Izant von einem Versuch, bei dem ein DNA-Konstrukt in Gewebszellen eingeschleust wurde, das Antisense RNA kodierte, die komplementär zur mRNA der Thymidin-Kinase war. Als Folge davon kam es zu einer massiven Inhibierung der Thymidin-Kinase in diesen Zellen (Izant et al. 1984). Diese Arbeit führte unter anderem dazu, dass das Feld der Antisense-Forschung in den folgenden Jahren intensiv weiter bearbeitet wurde. So konnte in multiplen weiteren Arbeiten belegt werden, dass die Aktivität von Genen durch Antisense-DNA gehemmt wird (Melton et al. 1985; Harland et al. 1985, Fire et al. 1991).

Ein weiteres Schlüsselmoment lieferten Guo und Kemphues mit ihrer Veröffentlichung in der Zeitschrift *Cell* 1995 (Guo et al. 1995). In Antisense-Studien wurde bis zu diesem Zeitpunkt die Sense-RNA lediglich als Negativ Kontrolle benutzt. Guo zeigte nun, dass sowohl die Sense, als auch die Antisense-RNA zum gleichen Phänotypen führt (Gou et al. 1995). Craig Mello bezeichnete diese Entdeckung kurze Zeit später als *RNA Interference* oder RNAi (Mello et al. 1997) um sie so von der klassischen Antisense-inhibition abzugrenzen.

Ein weiteres Rätsel bezüglich des Wirkmechanismus von RNAi konnte 1998 von Andrew Fire gelöst werden. Fire machte die Beobachtung, dass doppelsträngige RNA (dsRNA) für die sequenzspezifische Degradierung von mRNA verantwortlich ist. In Versuchen mit über Gel aufgereinigter ssRNA konnte er zeigen, dass diese nur noch zu einem sehr geringen Grad in der Lage war mRNA zu hemmen und so zur Entwicklung eines bestimmten Phänotyps in *C. elegans* zu führen. Doppelsträngige RNA jedoch führte zu einem signifikanten Abbau von mRNA und als Folge zur Ausbildung des entsprechenden Phenotyps (Fire et al. 1998).

Nach der Entdeckung, dass RNAi in *C. elegans* funktioniert, stellte sich die Frage, ob dies auch auf andere Organismen zutrifft. Anfänglich wurde davon ausgegangen, dass RNAi in Wirbeltieren aufgrund der dort vorhandenen dsRNA abhängigen Protein-Kinase R (PKR) nur geringe Einsatzmöglichkeiten hat. PKR hat als Aufgabe, virale oder sonstige körperfremde Doppelstrang RNA zu erkennen und eine globale Immunantwort auszulösen. Dadurch kommt es zum Abbau der fremden dsRNA beziehungsweise zum Zelltod der betroffenen Zelle. Wianny et al konnte jedoch in Mäusen zeigen, dass auch dort das Prinzip der sequenzspezifischen Ausschaltung von Genen durch die Methode der RNAi funktioniert ohne eine signifikante Immunantwort auszulösen (Wianny et al. 2000).

1.5.2 Funktionsweise der RNA-Interferenz

Die potente Hemmung, die durch die Methode der RNA-Interferenz erreicht werden kann, legt die Vermutung nahe, dass es sich hierbei um eine katalytische oder amplifizierende Reaktion handeln muss. Aus der Vielzahl von Publikationen zu dem Thema RNAi kristallisierte sich relativ schnell ein Modell zur Funktionsweise heraus (Hutvagner et al. 2002).

Die Kernelemente der RNA-Interferenz bestehen aus drei Schritten. Als erstes kommt es zur Zerteilung der doppelsträngigen RNA in kleinere 21 bis 28 Basenpaar große Fragmente die am 3'Ende einen Überhang von zwei Nukleotiden haben. Dieser Zerteilungsvorgang erfolgt durch ein ATP-abhängiges Enzym, das der Familie der RNasen-III angehört und als Dicer bezeichnet wird (Bernstein et al. 2001). Dieses Enzym beinhaltet verschiedene Enzyme. Dazu gehören eine ATP-abhängige RNA-Helicase, die sogenannte PAZ-Domain, zwei RNasen und eine dsRNA bindende Region. Die 21 bis 28 Basenpaar langen Produkte dieser Spaltung werden als „*short interfering RNA (siRNA)*“ bezeichnet (Hammond et al. 2000). In einem zweiten Schritt werden die einzelnen Doppelstrangmoleküle in Einzelstrangmoleküle gespalten. Die einzelnen siRNA Moleküle gehen nun eine Verbindung mit einem Proteinkomplex ein, der als „*RNA-induced silencing complex (RISC)*“ bezeichnet wird (Zamore et al. 2000). Die siRNA dient dabei als Template, das dem RISC Komplex den Weg zur komplementären mRNA im Zytosol weist. Nunmehr sucht im dritten Schritt der mit dem Einzelstrang beladene RISC-Komplex das Transkriptom nach einer komplementären RNA ab. Sobald diese gefunden ist, spaltet eine Endonuklease, die Teil des RISC-Komplexes ist und zu der Familie der Argonaut-Proteine gehört, die entsprechende RNA (Hutvagner et al. 2008).

In verschiedenen Organismen enthält der Mechanismus der RNAi teilweise unterschiedliche Proteine, doch das Prinzip ist gleich und besteht aus zwei Komponenten. Die kurzen RNA-Sequenzen, die die Spezifität bestimmen und den Argonaut-Proteinen, die für die Degradierung der spezifischen mRNA zuständig sind. Abhängig von der Art der Argonaut-Proteine und der Spezifität der siRNA mit der komplementären Sequenz der mRNA ist auch der Effekt unterschiedlich. Dies kann dazu führen, dass das Prinzip siRNA dazu benutzt wird, das Ausmaß der Proteinsynthese zu kontrollieren – über die Stabilisierung der genomischen Integrität bis hin zur kompletten Ausschaltung der Proteinsynthese (Chapman et al. 2007).

1.5.3 Transkriptionelles Silencing versus post-transkriptionelles Silencing

Der oben beschriebene Mechanismus läuft auf zwei verschiedene Arten ab: als transkriptionelles Hemmung „*transcriptional gene silencing (TGS)*“ und als post-transkriptionelle Hemmung „*post transcriptional gene silencing*“ von Genen (Matzke et al. 2005; Zamore et al. 2000).

Transkriptionelles Gen *silencing* ist sowohl in Hefen, Pflanzen, aber auch in Zellen von Säugetieren zu finden (Wassenegger et al. 1994; Morris et al. 2004; Ting et al. 2004). In Hefen erfolgt der Prozess des TGS über einen Komplex der als „*RNA induced transcriptional silencing complex (RITS)*“ bezeichnet wird (Verdel et al. 2004). In humanen Zellen ist der Mechanismus noch nicht endgültig geklärt, aber es ist belegt, dass die beiden Argonaut-Proteine AGO1 und AGO2 essentiell für den Gesamtprozess sind (Kim et al. 2006).

Beim post-transkriptionellen *silencing* unterscheidet man zwei Formen: direktes sequenzspezifisches *silencing* und translationale Unterdrückung verbunden mit dem Abbau der Ziel-RNA. Direktes sequenzspezifisches *silencing* findet statt, wenn die Ziel-mRNA direkt komplementär zur siRNA innerhalb des RISC-Komplexes ist. Sollte die Ziel-mRNA nur teilweise mit der siRNA im RISC-Komplex übereinstimmen, kommt es zur translationalen Unterdrückung und in deren Folge zum Abbau der RNA. Dieser Mechanismus wird hauptsächlich von sogenannten microRNAs (miRNA) benutzt. miRNAs gehören zur Untergruppe der *endogene small RNAs*. Es handelt sich hierbei um 21 bis 25 Basenpaar lange RNA-Moleküle deren Aufgabe die Regulation der Genexpression auf post-transkriptioneller Ebene ist.

1.5.4 siRNA – das Penicillin des 21 Jahrhunderts?

Die Möglichkeit mit Hilfe von siRNA die Genexpression zu modulieren und somit die Entstehung von Proteinen zu unterdrücken ist eine der bedeutendsten Entdeckungen der letzten zwanzig Jahre. Die Tatsache, dass dieser Mechanismus auch in vivo funktioniert wurde 2002 von McCaffrey und Kollegen in Mäusen gezeigt (McCaffrey et al. 2002). Nur sechs Jahre nach der Entdeckung von RNAi konnte bereits die erste klinische Studie im humanen System gestartet werden – als Behandlungsversuch der altersbedingten Makuladegeneration. Die Tatsache, dass siRNAs die Genexpression

verändern und gleichzeitig im humanen System eingesetzt werden können, eröffnet weitreichende therapeutische Optionen – die Methode der RNAi könnte somit zum Penicillin des 21. Jahrhunderts werden.

1.5.4.1 Strukturelle Voraussetzungen von siRNA zum Einsatz im humanen System

Die meisten aktuell angewandten therapeutischen Ansätze verwenden synthetisch produzierte siRNAs. Diese Methode hat den Vorteil, dass chemische Modifikationen möglich sind, die zu einer zusätzlichen Stabilität der Moleküle, einer Vermeidung von ungewünschten Effekten sowie einer besseren Bindungsfähigkeit führen. Mittlerweile gibt es einen empirisch ermittelten Konsens hinsichtlich der Kriterien, die von synthetisch erzeugten siRNAs erfüllt werden sollten, um den Einsatz im humanen System zu erleichtern:

- Zur Erleichterung der Aufnahme in den RISC-Komplex empfiehlt sich eine niedrigere thermische Stabilität am 5'Ende des Antisense-Stranges im Vergleich zu Sense-Strang
- Der Anteil der Guanosin- und Cytidin-Nukleotide sollte unter 50 Prozent liegen
- Das Einfügen von Phosphothioaten in die jeweilige siRNA erhöht die Widerstandsfähigkeit gegenüber Ribonukleasen ohne die Aktivität zu stören (Morrissey et al. 2005)
- Modifikationen mit Fluoro- β -D-Arachnidonsäure erhöhen die Stabilität und Wirksamkeit von siRNAs im Serum (Dowler et al. 2006)
- Die Zugabe von Cholesterinderivaten erhöht die Wahrscheinlichkeit der Aufnahme von siRNA in die Zelle (Lorenz et al. 2004)

1.5.4.2 Virus oder Spritze? – Schwierigkeiten der Applikation von siRNA im therapeutischen Bereich

Die Art der Applikation beziehungsweise der Transport und die Aufnahme der siRNA in die gewünschte Zelle ist eine der großen Herausforderungen der RNAi-Technologie. Die beiden hauptsächlich verwendeten Applikationsformen sind die Virus-basierte Applikation mittels shRNA und die Applikation von chemisch synthetisierten siRNAs mit Hilfe von Transportsubstanzen.

1.5.4.2.1 Applikation von siRNA durch viralen Vektoren

Bei diesem Verfahren werden die entsprechenden siRNA Sequenzen in einen viralen Vektor eingebracht und stehen dabei unter der Kontrolle eines RNA Pol II oder Pol III Promotors. Diese Methode ist besonders dann günstig, wenn es z.B. um die Behandlung von Viruserkrankungen geht die einen chronischen Charakter haben, da sie durch eine relativ lange Wirkdauer der siRNA gekennzeichnet ist. Beispiele für eine erfolgreiche Applikation dieses Systems ist die auf Lentiviren basierende Blockierung des Ras Oncogenes und Hemmung des Tumorwachstums in Mäusen (Brummelkamp et al. 2002). Für die Überwindung der schwierigen Blut-Hirnschranke scheinen sich Adenoviren als Vektoren ebenfalls zu eignen. So konnte Xia et al. zeigen, dass mit Hilfe einer spezifischen adenoviralen shRNA die spinocerebellare Ataxie im Mausmodell behandelt werden konnte (Xia et al. 2004). Trotz der offensichtlichen Vorteile dieses Systems darf nicht übersehen werden, dass Viren mutieren können und auch apathogene Viren in der Lage sind, immunstimulatorische Wirkungen zu erzeugen.

1.5.4.2.2 Applikation von synthetisch produzierter siRNA

Die Applikation von synthetisch produzierter siRNA hat die Schwierigkeit zu überwinden, dass siRNA Moleküle aufgrund ihrer Größe und negativen Ladung nur relativ schwer die Zellmembran überwinden können. Deshalb sind sie auf Hilfsstoffe angewiesen, die als Transport-Hüllproteine fungieren – wie Polykatione, Nanopartikel unterschiedlichster Herkunft, Cholesterinmoleküle oder Chitosan. Chitosan hat den Vorteil, dass es an Schleimhäuten anhaftet und damit gut geeignet ist für intranasale oder bronchiale Applikationen (Bitko et al. 2005). Eine weitere Hilfsmethode ist die Verlinkung von Transferrin mit einem Cyclodextrin-Polykation-Polymer welches die siRNA umschließt. Über den Transferrinrezeptor wird der Komplex in die Zielzelle aufgenommen. Mit Hilfe dieses Ansatzes konnte in Mäusen die Tumorprogression im Rahmen eines Ewings-Sarkoms zum Stillstand gebracht werden (Bartlett et al. 2007).

Ein großer Schritt hin zur therapeutischen Anwendbarkeit von siRNA wurde mit der Entwicklung der sogenannten „*stable nucleic acid lipid particles (SNALPs)*“ getan (Morrissey et al. 2005). Was diese Methode von den anderen bis dato entwickelten unterscheidet, ist die Tatsache, dass relativ niedrige Dosierungen an siRNA nötig sind, um einen langanhaltenden Effekt zu erzielen. Dies wird erreicht durch einen

doppellagigen Lipidmantel, der eine Mischung aus kationischen Lipiden enthält, die mit Polyethylenglycol überzogen sind. Diese Biopolymere sind im Durchmesser circa 120 Nanometer groß. Der Lipidmantel schützt die innenliegende siRNA vor Serum-Nukleasen und erlaubt gleichzeitig die endosomale Aufnahme und anschließende Freisetzung der siRNA ins Zytoplasma der Zelle.

1.6 Fragestellung

DNA- und RNA-Moleküle stellen in bestimmten Konstellationen für das angeborene Immunsystem ein potentes Gefahrensignal dar und sind in der Lage, eine effektive adaptive Immunantwort zu induzieren.

Zum Zeitpunkt des Beginns dieser Arbeit gab es erst wenige Daten zum Einsatz von siRNA im humanen System. Es wurde jedoch unterstellt, dass aufgrund der Kürze der verwendeten RNA-Moleküle keine Erkennung durch das Immunsystem erfolgt. Ein Auftreten von Off-Target-Effekten wie beispielsweise einer Stimulation des Immunsystems galt als ausgeschlossen.

Genaueres Wissen über die exakten Funktionsmechanismen und eine Abgrenzung sekundärer indirekter Effekte ist entscheidend für das mechanistische Verständnis und die konsekutive rationale Entwicklung einer erfolgreichen Therapie.

Die Methode der RNAi schien daher ein ideales Instrument zu sein, gezielt Proteine in Zellen des Immunsystems auszuschalten, um anschließend funktionelle Studien durchführen zu können, um so die Entwicklung einer auf CpG-Oligonukleotiden basierenden Immuntherapie voranzutreiben.

Gegenstand vorliegender Arbeit war es somit, zunächst die neue Technologie der RNA-Interferenz zu nutzen, um einzelne Zielgene in humanen PDCs auszuschalten. Als „proof of concept“ Target sollte der Rezeptor TLR9 in seiner Expression und somit seiner Funktion als CpG-Rezeptor ausgeschaltet werden. Hierzu wurden vier unabhängige siRNA-Moleküle gegen die *coding region* der humanen TLR9-mRNA entwickelt.

Im Laufe der Vorversuche zu diesem Projekt zeigte sich jedoch, dass die bis dahin allgemeingültige These, siRNAs seien zu klein sind, um vom Immunsystem erkannt zu werden, in Frage gestellt werden musste.

Aufgrund dieser Tatsache ergab sich eine völlig neue Situation, die zwei zentrale Fragen beinhaltete:

- (1) Ist die Erkennung von siRNA und die damit verbundene Auslösung einer Immunantwort sequenzabhängig?
- (2) Über welchen Mechanismus wird siRNA vom humanen System erkannt?

2. Material und Methoden

2.1 Geräte und Verbrauchsmaterialien

2.1.1 Geräte

| | |
|--------------------------------|--|
| CO ₂ -Brutschrank | Fa. Heraeus (Hanau, D) |
| Eismaschine | Fa. Ziegler (Isernhagen, D) |
| ELISA Reader | Fa. Dynatech-Laboratories (Guernsey, GB) |
| FACSCalibur | Fa. Becton Dickinson (San Jose, CA, USA) |
| FACStarplus | Fa. Becton Dickinson (San Jose, CA, USA) |
| Gene Quant RNA/ DNA Calculator | Fa. Pharmacia Biotech (Freiburg, D) |
| Hamilton Spritze | Fa. Hamilton Co. (Reno, Nevada, USA) |
| Kamera Nikon F90X | Fa. Nikon GmbH (Düsseldorf, D) |
| Lamin Air (HB 244 8) | Fa. Heraeus (Hanau, D) |
| Light Cycler | Fa. Roche (Mannheim, D) |
| Midi MACS | Fa. Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, D) |
| Mikroskop (Axiovert 25) | Fa. Zeiss (Jena, D) |
| Mini MACS | Fa. Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, D) |
| Omnifuge 2 ORS | Fa. Heraeus (Hanau, D) |
| pH-Meter | Fa. WTW (Weilheim, D) |
| Photokammer | Fa. Kodak (Rochester, NY, USA) |
| Power Pac 200 Spannungsgerät | Fa. Biorad (München, D) |
| Scintillation Counter | Fa. Biorad (München, D) |
| Vortex VF2 | Fa. Bender & Hobein AG (Zürich, CH) |
| Vortexer | Fa. Janke & Kunkel (Staufen, D) |
| Waage (LP 6209) | Fa. Sartorius (Göttingen, D) |
| Waage (SBC 21) | Fa. Scaltec Instruments (Heiligenstadt, D) |
| Wasser-Deionisierungsmaschine | Fa. SG Reinstwasser-Sys. (Hamburg, D) |
| Zentrifuge (5417 R) | Fa. Eppendorf (Hamburg, D) |

2.1.2 Chemikalien

| | |
|---------------------------------------|---|
| 2-Aminopurin | Fa. Sigma-Aldrich (Steinheim, D) |
| Brefeldin A | Fa. Sigma-Aldrich (Steinheim, D) |
| Chloroquin | Fa. Sigma-Aldrich (Steinheim, D) |
| Dimethylsulfoxid (DMSO) | Fa. Sigma-Aldrich (Steinheim, D) |
| Ethylen-Diamin-Tetraessigsäure (EDTA) | Fa. Sigma-Aldrich (Steinheim, D) |
| FACSFlow | Fa. Becton Dickinson (Heidelberg, D) |
| FACSSafe | Fa. Becton Dickinson (Heidelberg, D) |
| Geneticin 418-Sulfat | Fa. GibcoBRL (Paisley, GB) |
| Heparin-Natrium | Fa. Ratiopharm (Ulm, D) |
| Ortho-mune Lyse-Reagenz | Fa. Ortho-Clinical Diagnostics (Neckarsgümd, D) |
| Lipofectamine 2000 | Fa. Invitrogen (Karlsruhe, D) |
| RNase | Fa. Ambion (Foster City, USA) |
| To-Pro-3-Iodid (TOPRO-3) | Fa. Molecular Probes (Leiden, NL) |

Tris-Borat-EDTA (TBE)
Trypan-Blau

Fa. Sigma-Aldrich (Steinheim, D)
Fa. Sigma-Aldrich (Steinheim, D)

2.1.3 Reagenziensätze

Zellisolation mittels der MACS Methode:

| | |
|---------------------------|--|
| B Cell Isolation Kit | Fa. Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, D) |
| BDCA-1 Cell Isolation Kit | Fa. Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, D) |
| BDCA-2 Cell Isolation Kit | Fa. Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, D) |
| BDCA-4 Cell Isolation Kit | Fa. Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, D) |
| CD4+ T Cell Isolation Kit | Fa. Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, D) |
| CD45RO MicroBeads | Fa. Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, D) |
| CD8 MicroBeads | Fa. Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, D) |
| Monocyte Isolation Kit | Fa. Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, D) |
| NK Cell Isolation Kit | Fa. Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, D) |
| Pan T Cell Isolation Kit | Fa. Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, D) |

RNA Isolation, reverse Transkription und PCR:

| | |
|--|-------------------------------------|
| First Strand cDNA Synthesis Kit | Fa. Roche Diagnostics (Mannheim, D) |
| High Pure RNA Isolation Kit | Fa. Roche Diagnostics (Mannheim, D) |
| LightCycler FastStart DNA Sybr Green I | Fa. Roche Diagnostics (Mannheim, D) |

Bestimmung von Zytokinen mittels ELISA:

| | |
|--------------------------|-----------------------------------|
| Human IL12 p70 ELISA | Fa. BD Pharmingen (Heidelberg, D) |
| Human IFN γ ELISA | Fa. Endogen (Boston, USA) |
| Human IFN α ELISA | Fa. Bender Med Systems (Wien, A) |
| Human TFN α ELISA | Fa. BD Pharmingen (Heidelberg, D) |

2.1.4 Materialien für die Zellkultur

| | |
|---|--------------------------------------|
| Biocoll Separationsmedium | Fa. Biochrom (Berlin, D) |
| Bovines Serum Albumin (BSA) | Fa. GibcoBRL (Paisley, GB) |
| Dulbecco's minimal essential | Fa. PAA (Linz, A) |
| Fetales Kälberserum (FCS) | Fa. GibcoBRL (Paisley, GB) |
| Humanes AB Serum | Fa. BioWhittaker (Wakersville, USA) |
| Humanes Serum Albumin (HSA) | Fa. Pharmacia & Upjohn (Erlangen, D) |
| L-Glutamin | Fa. PAA (Linz, A) |
| Optimem | Fa. Invitrogen (Karlsruhe, D) |
| Phosphate buffered saline (PBS) | Fa. PAA (Linz, A) |
| Penicillin | Fa. PAA (Linz, A) |
| Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 Medium | Fa. Sigma-Aldrich (Steinheim, D) |
| Streptomycin | Fa. PAA (Linz, A) |

Plastikmaterialien für die Zellkultur wurden von den Firmen Greiner (Frickenhausen, D), Falcon (Heidelberg, D), Becton Dickinson (Le Pont de Claix, F), Bibby Sterrillin (Stone, Staffordshire, GB) und Corning (Corning, USA) bezogen.

2.1.5 Zytokine, Wachstumsfaktoren und Stimulanzen

| | |
|---|--|
| Calcium-Ionomycin | Fa. Sigma-Aldrich (Steinheim, D) |
| Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) | Fa. R&D Systems (Wiesbaden, D) |
| Interferon- β | Fa. PBL Biomedical Laboratories (New Brunswick, USA) |
| Interferon α 2a | Fa. PBL Biomedical Laboratories (New Brunswick, USA) |
| Interleukin-2 | Fa. R&D Systems |
| Interleukin-3 | Fa. R&D Systems (Wiesbaden, D) |
| Interleukin-4 | Fa. R&D Systems (Wiesbaden, D) |
| Interleukin-12 | Fa. R&D Systems (Wiesbaden, D) |
| Loxoribine | Fa. Sigma-Aldrich (Steinheim, D) |
| Lipopolysaccharid (LPS) (Herkunft: <i>Salmonella typhimurium</i>) | Fa. Sigma-Aldrich (Steinheim, D) |
| Phytohämagglutinin (PHA) | Fa. Sigma-Aldrich (Steinheim, D) |
| Poly(I:C) | Fa. Sigma-Aldrich (Steinheim, D) |
| R 848 | Fa. InvivoGen (Toulouse, F) |

2.1.6 Zellkulturmedien, Puffer und Lösungen

Folgende Medien und Puffer wurden für die Zellkultur verwendet:

| | |
|------------------------------|---------------------------------|
| <u>RPMI-Vollmedium:</u> | <u>IMDM-Vollmedium:</u> |
| 100 IU/ ml Penicillin | 100 IU/ ml Penicillin |
| 100 μ g/ ml Streptomycin | 100 μ g/ ml Streptomycin |
| 1,5 mM L-Glutamin | 1,5 mM L-Glutamin |
| 10 Vol % FCS | 2 Vol % humanes A/ B-Serum |
| in RPMI 1640-Medium | in IMDM-Medium |
| | |
| <u>MACS-Puffer:</u> | <u>Erythrozyten-Lysepuffer:</u> |
| 2 mM EDTA | Ortho-mune Lysereagenz |
| 0,5 Vol % BSA | in PBS |
| pH 7,2 | |
| in PBS | |
| | |
| <u>Kryo-Medium:</u> | <u>TE-Puffer:</u> |
| 50 Vol % IMDM-Vollmedium | 10 mM Tris Chlorid |
| 40 Vol % Humanes AB-Serum | 1 mM EDTA |
| 10 Vol % DMSO | pH 8,0 |
| | in Wasser |

Lösungen für molekularbiologische Methoden:Lyse-/ Bindepuffer:

4,5 M Guanidiniumchlorid
50 mM Tris-HCl
30 Vol % Triton X-100
pH 6,6
in Wasser

DNase Inkubationspuffer:

1 M NaCl
20 mM Tris-HCl
10 mM MnCl₂
pH 7,0
in Wasser

Waschpuffer I:

5 M Guanidiniumchlorid
20 mM Tris-HCl
60 Vol % Ethanol
pH 6,6
in Wasser

Waschpuffer II:

20 mM NaCl
2 mM Tris-HCl
80 Vol % Ethanol
pH 7,5
in Wasser

Elutionspuffer:

Nuclease-freies
steriles Wasser

TBE-Puffer:

89 mM Tris-Borat
2 mM EDTA
pH 8,3
in Wasser

2.1.7 Antikörper

Zusammenstellung der in dieser Arbeit verwendeten Antikörper:

| Bezeichnung | Spezifität | Klon | Herkunft |
|-------------------|--------------|----------|-----------------|
| Anti BDCA-2 | BDCA-2 | AC144 | Miltenyi Biotec |
| Anti BDCA-4 | BDCA-4 | AD5-17F6 | Miltenyi Biotec |
| Anti CD3 | CD3 | UCHT19 | BD/ Pharmingen |
| Anti CD4 | CD4 | RPA-T8 | BD/ Pharmingen |
| Anti CD8 | CD8 | G42-8 | BD/ Pharmingen |
| Anti CD11c | CD11c | B-ly6 | BD/ Pharmingen |
| Anti CD14 | CD14 | 3E2 | BD/ Pharmingen |
| Anti CD19 | CD19 | HIB19 | BD/ Pharmingen |
| Anti CD40 | CD40 | 5C3 | BD/ Pharmingen |
| Anti CD56 | CD56 | B159 | BD/ Pharmingen |
| Anti CD69 | CD69 | FN50 | BD/ Pharmingen |
| Anti CD80 | CD80 | L307.4 | BD/ Pharmingen |
| Anti CD83 | CD83 | HB15e | BD/ Pharmingen |
| Anti CD86 | CD86 | IT2.2 | BD/ Pharmingen |
| Anti CD123 | CDw123 | 7G3 | BD/ Pharmingen |
| Anti IFN γ | IFN γ | 25723.11 | BD/ Pharmingen |
| Anti IFN α | IFN α | Poly | PBL |
| Anti IFN β | IFN β | Poly | PBL |
| Anti IL4 | IL4 | 8D48 | BD/ Pharmingen |

2.1.8 Oligodesoxynukleotide

Komplett oder teilweise Phosphorothioat-modifizierte ODNs wurden freundlicherweise von Coley Pharmaceutical Group (Wellesley, USA) zur Verfügung gestellt. Die RNA Oligonukleotide wurden von Dharmacon und Curevac nach unseren Angaben synthetisiert und käuflich erworben. Kleine Buchstaben stehen für Verknüpfung durch Phosphorothioate, große Buchstaben für Verknüpfung durch Phosphodiester am 3'-Ende der Base. Fett gedruckt sind die jeweiligen CpG-Dinukleotide:

DNA Oligonukleotide

| Bezeichnung | Nukleotid-Sequenz (5' → 3') | Referenz |
|-------------|---|--------------------------|
| ODN 2006 | tcg tcgttttg tcg ttttg tcg tt | [Hartmann et al., 2000a] |
| ODN 2137 | tg ct gc ttttg gc ttttg gc tt | [Hartmann et al., 2000a] |
| ODN 1585 | ggGGTCAAC CG TTGAggggggG | [Ballas et al., 1996] |
| ODN 2216 | ggGGGAG CGATCG TCggggggG | [Krug et al., 2001a] |
| ODN 2243 | ggGGGAG GCATGCT CggggggG | [Krug et al., 2001a] |

RNA Oligonukleotide

Alle Basen sind Ribonukleotide mit der Ausnahme von dT (deoxyThymidin)

| siRNA | Name | Sequenzen 5' → 3' |
|---------|---------|---|
| RNA9.1 | (1155) | UGGACGGCAACUGUUUUAdTdT UAAUACAGUUGCCGUCCAdTdT |
| RNA9.2 | (1647) | AGCUUAACCUGUCCUUCAdTdT UUGAAGGACAGGUUAAGCUdTdT |
| RNA9.3 | (1653) | ACCUGUCCUUCUUUACCAAdTdT UGGUAAUUGAAGGACAGGUdTdT |
| RNA9.4 | (2251) | CUCAUUCACGGAGCUACCAAdTdT UGGUAGCUCCGUGAAUGAGdTdT |
| RNA9.2s | N | AGCUUAACCUGUCCUUCAA |
| | L8A | AAAAAAAAACUGUCCUUCAA |
| | L9A | AAAAAAAAAUGUCCUUCAA |
| | L10A | AAAAAAAAAAGUCCUUCAA |
| | L11A | AAAAAAAAAAUCCUUCAA |
| | L12A | AAAAAAAAAAACCUUCAA |
| | R3A | AGCUUAACCUGUCCUUAAA |
| | R4A | AGCUUAACCUGUCCUAAAA |
| | R5A | AGCUUAACCUGUCCAAAAA |
| | R8A | AGCUUAACCUGAAAAAAAAA |
| | DR | UGUCCUUCAAUGUCCUUCAA |
| | 19U | AGCUUAACCUGUCCUUCAU |
| | 18/19UU | AGCUUAACCUGUCCUUCUU |
| | hairpin | AGCUUAACCUGUCCUUCAA- CUACACAAA- UUGAAGGACAGGUUAAGCU |
| | 5'F | F -AGCUUAACCUGUCCUUCAA |
| | 3'F | AGCUUAACCUGUCCUUCAA- F |
| | 5'LNA | AGCU UAACCUGUCCUUCAA |
| | 3'LNA | AGCUUAACCUGUCCU UCAA |
| | 5'3'LNA | AGCU UAACCUGUCCU UCAA |
| RNA9.2a | n | UUGAAGGACAGGUUAAGCU |
| | 5'LNA | UUGA AGGACAGGUUAAGCU |
| | 3'LNA | UUGAAGGACAGGUUA AGCU |
| | 5'3'LNA | UUGA AGGACAGGUUA AGCU |
| | polyA | AAAAAAAAAAAAAAAAAAAA |
| | polyU | UUUUUUUUUUUUUUUUUU |

2.1.9 Zelllinien

Folgende Zelllinien wurden in der vorliegenden Arbeit verwendet:

| Zelllinie | Zellart | Herkunft | Referenz |
|-----------|-----------------------------|---|------------------------|
| HEK 293 | Human embryonic kidney cell | Prof. Golenbock, University of Massachusetts, USA | [Latz et al., 2004] |
| BL41 | Burkitt lymphoma cell line | American Type Culture Collection | |

2.2 Zellulär-immunologische Methoden

2.2.1 Zellkultur

2.2.1.1 Allgemeine Kulturbedingungen

Die Zellkultur erfolgte in einem Begasungsbrutschrank bei einer Temperatur von 37 C, 95% Luftfeuchtigkeit und einem 5%igen CO₂/ Luftgemisch. Sämtliche Experimente und Manipulationen mit Zellen wurden ausschließlich unter sterilen Bedingungen in einem Laminar-Air-Flow durchgeführt.

2.2.1.2 Bestimmung der Zellzahl und Vitalität

Zur Bestimmung der Lebendzellzahl wurde der Trypanblauausschlusstest durchgeführt. Lebende Zellen schließen den Farbstoff aus, tote Zellen werden blau angefärbt. Zellzahlen wurden durch Auszählen geeigneter Verdünnungen in einer Neubauer-Zählkammer ermittelt.

2.2.1.3 Kultivierung von Tumorzelllinien

Die Tumorzelllinien wurden in 25 bis 75 ml Kulturflaschen in RPMI-Vollmedium mit FCS kultiviert und regelmäßig lichtmikroskopisch auf Anzeichen von Zelluntergang oder mikrobieller Verunreinigung inspiziert. Das Medium wurde, dem Tumorzell-Wachstum entsprechend, alle zwei bis drei Tage dekantiert und durch frisches Medium substituiert. In sämtlichen Zelllinien wurde eine mögliche Kontamination mit Mykoplasmen ausgeschlossen.

2.2.1.4 Kultivierung und Transfektion von Zellen des peripheren Blutes

Aufgereinigte Zellpopulationen bzw. PBMCs wurden in 96-Well Rundboden-Platten in RPMI-Vollmedium mit 10 % FCS kultiviert. Für Transfektionsversuch wurden 100 000 Zellen pro Well in 100 µl OPTIMEM dem 10ng/ml IL-3 zugegeben worden war kultiviert. Anschließend wurden die Zellen mit 200ng Nukleinsäure, die mit 0,5µl Lipofectamin 2000 komplexiert worden transfiziert. Der Überstand wurde nach 4 Stunden vorsichtig abgenommen und durch OPTIMEM Medium ersetzt. Für die Elektroporationsversuche wurden die Zellen in isoosmolaren Elektroporationspuffer genommen und mit oder ohne siRNA (2,5 µg/ml) für 50µs bei 100V einmal gepulst. Nach 5 Minuten wurde RPMI-Vollmedium zugegeben und die Zellen in 96-Well Rundboden Platten in Kultur genommen.

2.2.2 Durchflusszytometrie

2.2.2.1 Allgemeines Funktionsprinzip

Die Durchflusszytometrie mittels eines *Fluorescence activated cell sorters* (FACS) bietet die Möglichkeit, Zellen anhand ihres Phenotyps zu unterscheiden und zu quantifizieren. Dazu werden die zu untersuchenden Zellen mit fluoreszierenden Antikörpern gegen ein entsprechendes Oberflächenantigen markiert und in einem laminaren Flüssigkeitsstrom hintereinander einzeln durch einen Laserstrahl geführt.

Zelleigenschaften wie Größe, Form, Membranoberfläche und intrazelluläre granuläre Bestandteile führen zu einer Lichtstreuung, die von je einer Linse in Verlaufsrichtung des Laserstrahls (Vorwärtsstreulicht) und einer rechtwinklig dazu angebrachten (Seitwärtsstreulicht) gesammelt und photometrisch detektiert wird. Das Vorwärtsstreulicht wird wesentlich durch die Zellgröße, das Seitwärtsstreulicht durch die intrazelluläre Granularität bestimmt. Die gewünschte Zellpopulation wird anhand dieser Kriterien ausgewählt und weiter auf ihre Fluoreszenzeigenschaften untersucht. Der Laserstrahl regt das Chromophor, der für die Oberflächenmarkierung verwendeten Antikörper, zur Emission von Lichtquanten an, die durch eine Linse gesammelt werden. Filter trennen das gesammelte Licht nach Wellenlängenbereichen und lenken es zu unterschiedlichen Detektoren. So können die Signale mehrerer verschiedener Fluoreszenzfarbstoffe bei einer Mehrfarbenanalyse getrennt aufgenommen und quantitativ ausgewertet werden. Die Fluoreszenzintensität ist dabei proportional zur

Anzahl der pro Zelle gebundenen Antikörper und damit zur Anzahl der untersuchten Oberflächenmoleküle. Zu diesen Fähigkeiten der FACS-Analyse kommt beim FACS-Sorter noch die Möglichkeit dazu, die so charakterisierten Zellen einzeln in Tropfen zu verpacken, diese mit einer elektrischen Ladung zu versehen und zwischen Kondensatorplatten abzulenken, so dass Zellen nach ihren Eigenschaften aufgetrennt und in verschiedene Auffanggefäße sortiert werden können.

Bei der direkten Immunfluoreszenz werden Fluorochrom-gekoppelte Antikörper verwendet, die direkt an Oberflächenmoleküle binden. Bei dem Verfahren der indirekten Immunfluoreszenz werden die Zellen in einem ersten Schritt mit einem unmarkierten Antikörper inkubiert und erst in einem zweiten Schritt mit einem Fluorochrom-gekoppelten Antikörper gefärbt, der gegen den Fc-Teil des ersten Antikörper gerichtet ist.

Die Auftrennung der verschiedenen Fluoreszenzintensitäten durch die Lichtfilter gelingt nicht vollständig, da sich die Spektren der eingesetzten Farbstoffe zum Teil überlappen. Diese Überlappung wird durch Kompensation korrigiert, indem von jedem registrierten Fluoreszenzsignal der Anteil abgezogen wird, der durch Überlappung entsteht. Hierzu werden bei jedem Versuch Kontrollproben hergestellt, bei denen jeweils nur eine Eigenschaft mit einem bestimmten Fluorochrom angefärbt ist, während die anderen Fluorochrome, gebunden an geeignete Isotypen-Antikörper, als Negativkontrolle dienen. Hierbei wird sichtbar, wie stark ein bestimmtes Fluorochrom in die anderen Kanäle hineinstrahlt und ermöglicht so die Kompensation. Ebenso kann mit Hilfe der Isotypen die Signalverstärkung der einzelnen Kanäle so justiert werden, dass sich Zellen mit entsprechenden Antigenen bzw. Eigenschaften qualitativ und quantitativ unterscheiden und vergleichen lassen.

Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe und die dazugehörigen maximalen Emissions- und Exzitations-Wellenlängen:

| Fluoreszenzfarbstoff | Exzitation | Emission |
|---|------------|----------|
| Fluorescein-Isocyanat (FITC) | 494 nm | 518 nm |
| Phycoerithrin (PE) | 565 nm | 575 nm |
| Propidiumiodid (PI) | 536 nm | 617 nm |
| Allophycocyanin (APC) | 650 nm | 660 nm |
| TOPRO-3 | 642 nm | 661 nm |
| Peridinin-Chlorophyll-A-Protein (PerCP) | 488 nm | 675 nm |

2.2.2.2 Bestimmung von Oberflächenmolekülen

Für FACS-Analysen wurden 5×10^5 - 3×10^6 Zellen in einem FACS-Röhrchen abzentrifugiert, der Überstand abgenommen und die Zellen im zurücklaufenden Tropfen resuspendiert. Zur Färbung wurden die Zellen daraufhin 15 min bei 4 °C unter Lichtausschluss mit FITC, PE, PerCP oder APC gekoppelten Antikörpern (direkte Fluoreszenz) bzw. einem unmarkierten Antikörper (indirekte Fluoreszenz) inkubiert und anschließend mit PBS einmal gewaschen. Bei indirekter Fluoreszenz wurde anschließend der Inkubationsschritt, diesmal mit einem fluoreszenzgekoppeltem Isotyp-spezifischem Antikörper, wiederholt. Wenn nötig wurde PI oder TOPRO-3 zur Anfärbung toter Zellen kurz vor der FACS-Analyse hinzugegeben. Die Fluoreszenzintensität der gefärbten Zellen wurde auf einem FACSCalibur gemessen und anschließend mit Hilfe der Cell Quest Software analysiert.

2.2.3 Aufreinigung von Zellpopulationen

2.2.3.1 Isolation von mononukleären Zellen des peripheren Blutes

Gesunden Spendern wurde 100 ml heparinisieretes Blut abgenommen, wobei pro 10 ml Blut 100 µl Heparin (5000 U/ml) verwendet wurde. Das Blut stand bei Raumtemperatur maximal 2 h, bevor daraus die Fraktion der mononukleären Zellen präpariert wurde.

Hierzu wurde das Blut auf vier Röhrchen à 50 ml verteilt, die zuvor mit je 15 ml Ficoll-Hypaque gefüllt worden waren. Anschließend wurde auf 50 ml mit sterilem, 0,9 % NaCl vorsichtig aufgefüllt, ohne dass sich dabei die drei Phasen vermischten. Nach Zentrifugation (1000 g, 20 °C, 15 min, Beschleunigung 1, Bremsung 1) fand man in jedem Blue Cap von oben nach unten die folgende Schichtung vor: Plasma, Ring aus mononukleären Zellen, Ficoll, Erythrozyten. Der PBMC-Ring wurde vorsichtig abpipettiert, in ein neues Blue Cap gegeben, mit NaCl auf 50 ml aufgefüllt und wiederum zentrifugiert (520 g, 20 °C, 15 min, Beschleunigung 9, Bremsung 4). Anschließend folgten zwei weitere Waschschriffe, bei denen zunächst der Überstand dekantiert, das Zellpellet mit 10 ml NaCl resuspendiert und jeweils zwei Suspensionen zusammenpipettiert, erneut auf 50 ml aufgefüllt und zentrifugiert wurden (400 g, 4 °C, 10 min, Beschleunigung 9, Bremsung 4). Vor dem letzten Waschschriff wurde das Zellpellet in 5 ml Erythrozyten-Lysepuffer resuspendiert und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert, um die verbliebenen Erythrozyten zu lysieren. Zuletzt wurde

das Zellpellet in dem gewünschten Kulturmedium aufgenommen, die Zellen mit Hilfe einer Neubauer-Kammer und Trypanblaufärbung gezählt und auf die gewünschte Konzentration verdünnt. Es wurden nur solche mononukleäre Zellfraktionen weiterverwendet, von denen über 95 % den Supravitalfarbstoff Trypanblau dank intakter Zellmembranen ausschlossen.

2.2.3.2 Aufreinigung mittels magnetischer Zellsortierung

Bei der *Magnetic Activated Cell Sorting* (MACS) Isolationsmethode werden Zellen mit speziellen Antikörpern markiert, die an paramagnetische Mikropartikel mit einem Durchmesser von ca. 50 nm gekoppelt sind. Nachdem die Zellen für 15 min in einem speziellen MACS-Puffer bei 4 °C mit den Microbeads markiert wurden, werden sie gewaschen und anschließend in MACS-Puffer resuspendiert. Anschließend wird die markierte Zellsuspension auf eine Trennsäule gegeben, die eine paramagnetische Matrix enthält. Die Säule wird in das Magnetfeld eines starken Permanentmagneten eingebracht und somit alle mit Microbeads beladenen Zellen in der Matrix zurückgehalten. Alle unmarkierten Zellen werden durch mehrmaliges Spülen mit MACS-Puffer aus der Säule entfernt, so dass nur die gewünschte Zellpopulation in der Säule zurückgehalten wird. Anschließend lässt sich die markierte Zellpopulation mit einem Stempel aus der Säule außerhalb des Magnetfelds eluieren. Sowohl die markierte als auch die unmarkierte Zellfraktion lässt sich anschließend in Kultur nehmen. Das MACS-System kann entweder zur Anreicherung (positive Selektion) oder zum Ausschluß einer Zellpopulation (Depletion) aus einer Gesamtzellpopulation eingesetzt werden.

Zur Aufreinigung nach der MACS-Methode wurden in dieser Arbeit ausschließlich Reagentiensätze der Firma Miltenyi Biotec nach dem entsprechendem Hersteller Protokoll verwendet.

2.2.3.3 Aufreinigung mit der FACS-Methode

Für Zellsortierungen wurden unter sterilen Bedingungen 1 - 100 x 10⁶ Zellen mit FACS-Antikörpern markiert, in Medium gewaschen, in 1,5 - 2 ml Medium resuspendiert und zur Entfernung von Zellaggregaten durch eine Nylonmembran mit 100 µm Poren

filtriert. Die Sortierung wurde mit einem FACStar^{plus} an der *sorting-facility* des GSF (Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit, München) mit freundlicher Unterstützung von Dr. Ellwart durchgeführt.

2.2.4 Enzyme linked immunosorbent assay

Zur Bestimmung verschiedener Proteine im Überstand von Zellkulturen wurde ein ultrasensitiver *enzyme linked immunosorbent assay* (ELISA) durchgeführt.

Hierzu werden Zell-freie Kultur-Überstände abgenommen und bei Bedarf entsprechend mit Medium verdünnt. Neben einer Standardreihe mit bekannter Proteinmenge werden nun alle Proben in Wells pipettiert, die mit einem Protein spezifischen Antikörper beschichtet sind. Während der zwei-stündigen Inkubationszeit bindet das vorhandene Protein an die Antikörper. Nach drei Waschschritten wird nun ein zweiter, biotinylierter Antikörper zugegeben, der das bereits gebundene Protein an einem anderen Epitop bindet. Nach 30 min folgt ein weiterer Waschschriff. Daraufhin wird ein Streptavidin-Peroxidase-Konjugat zugegeben, welches an Biotin bindet. Durch Verwendung mehrerer Biotin-Streptavidin-Brücken pro Antikörper, wird eine Signalverstärkung und somit eine höhere Sensitivität erreicht. Nach Entfernung des überschüssigen Konjugates durch einen weiteren Waschschriff, gibt man die Substratlösung hinzu, gebundenes Enzym wird nun zu Farbstoff umgesetzt. Die Farbintensität, die proportional zur Protein Konzentration der Probe ist, wird dann mittels eines ELISA-Readers eingelesen. Durch die Standardreihe besteht die Möglichkeit die genaue, in der Probe enthaltene Konzentration zu errechnen.

2.3 Tierexperimente

2.3.1 In vivo Stimulation mit siRNA

Zur in vivo Stimulation mit siRNA wurden 129P2/OlaHsd, 129/svHsd und C57BL/6 Mäuse in Narkose versetzt und die siRNA intravenös in die retroorbitale Vene injiziert. Die zu injizierende siRNA wurde hierzu in einem ersten Schritt mit DOTAP (1,2-dioleoyloxy-3-trimethylammonium-propan) komplexiert. Hierzu wurden 30µl DOTAP mit 5µg Nukleinsäure in 170µl Hepes gepufferter Saline(HBS) komplexiert und für 20 Minuten inkubiert. Die Kontrollmäuse wurde entweder HBS mit DOTAP oder HBS

alleine injiziert. Den Mäusen wurde nach 7, 18 und 24 Stunden Blut aus dem Schwanz abgenommen. Das Vollblut wurde für 30 Minuten bei 37° Grad koaguliert und anschliessend Serum durch Zentrifugation gewonnen.

2.4 Statistische Analyse

Bei multiplen Versuchen sind die Ergebnisse als arithmetisches Mittel angegeben, wobei die Streuung der Werte jeweils als Standardfehler der Mittelwerte (*standard error of mean*, SEM) dargestellt werden. Um die statistische Signifikanz der Unterschiede einzelner Ergebnisse zu berechnen, wurde der zweiseitige Student-t-Test für paarige Stichproben parametrischer Verteilungen angewendet. Statistische Signifikanz wurde bei p-Werten $< 0,05$ bzw. $p < 0,01$ angenommen und ist durch Markierung mit einem * bzw. ** angezeigt. Alle statistischen Berechnungen wurden mit dem Programm StatView D-4.5 (Abacus Concepts, CA, USA) durchgeführt. Die rechnerische Auswertung und graphische Darstellung der Daten erfolgte mittels der Programme Microsoft Excel und Microsoft PowerPoint (Microsoft Cooperation, CA, USA)

3. Ergebnisse

3.1 Die Detektion doppelsträngiger siRNA durch die plasmazytoide dendritische Zelle führt zur Interferonproduktion

Das initiale Ziel dieser Arbeit war es, die neue Technologie der RNA Interferenz zu nutzen um einzelne Zielgene in humanen PDCs auszuschalten. Als „*proof of concept*“ Target sollte hierzu der schon bekannte Rezeptor TLR9 in seiner Expression und somit seiner Funktion als CpG-Rezeptor ausgeschaltet werden. Hierzu wurden vier unabhängige siRNA-Moleküle gegen die *coding region* der humanen TLR9 mRNA nach gängigen Design-Kriterien entwickelt.

3.1.1 Hemmung der TLR9 Expression in HEK293 Zellen mit siRNA

Um die Effekte des TLR *Signaling* vorab in einer leicht zu transfizierenden Zelllinie zu untersuchen, benutzten wir HEK293 Zellen, die stabil mit einem TLR9-Konstrukt transfiziert worden waren (Latz et al. 2004). HEK 293 Zellen exprimieren normalerweise kein TLR9, können jedoch künstlich mit TLR9 rekonstituiert werden und so sensitiv für den TLR9-Liganden CpG-DNA gemacht werden. Am C-terminalen Ende der TLR9 *coding region* wurde zur besseren Detektion im FACS oder Mikroskop ein gelbes Fluoreszenzprotein (YFP) angebracht, das die Signaltransduktion durch diesen Rezeptor nicht beeinträchtigt. Als Negativkontrolle wurde eine siRNA, die gegen TLR2 gerichtet war, eingesetzt und als Positivkontrolle diente eine siRNA die gegen YFP gerichtet war. Die TLR9-HEK293 Zellen wurden ausplattiert und dann anschließend mit Hilfe kationischer Lipide (Lipofectamine 2000) transfiziert. Nach 20, 30 und 54 Stunden wurde die Expression von YFP und somit indirekt die TLR9-Expression mittels FACS bestimmt. Hierbei zeigte sich, dass zwei der vier siRNAs eine starke Hemmung der TLR9 Expression vermittelten. Wie erwartet kam es durch die anti-TLR2 siRNA zu keiner Hemmung der TLR9-Expression, wohingegen die anti-YFP-siRNA eine starke Hemmung der TLR9-YFP-Expression verursachte (Abbildung 1).

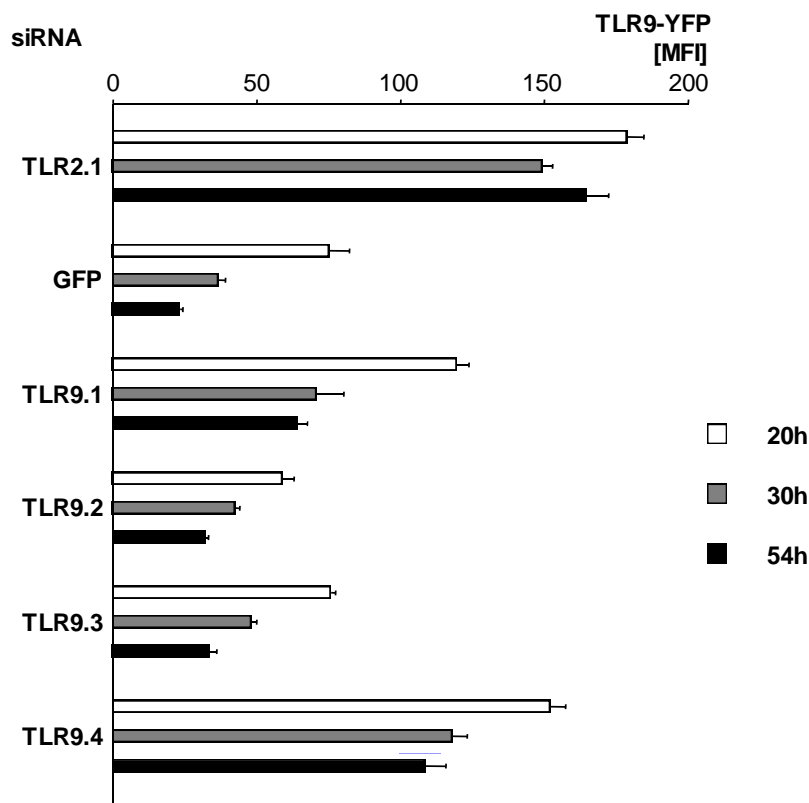
HEK 293 cell line

Abbildung 1 Die Expressionshemmung von TLR9 in HEK293 Zellen unterscheidet sich in verschiedenen siRNA Sequenzen

TLR9-293 Zellen wurden zu 10 000 Zellen/well ausplattiert. 24 Stunden später wurden die Zellen mit siRNA (50 nM) transfiziert und dann nach einer weiteren Inkubationsphase von 20, 30 oder 54 Stunden auf TLR9 Expression mittels FACS analysiert. Die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) aus Triplikaten wurde zusammengefasst und wird als Mittelwert +/- Standardabweichung (SEM) dargestellt. Ein repräsentatives Experiment aus drei Versuchen wird gezeigt.

3.1.2 Transfektion von gegen TLR9 gerichtete siRNA erhöht die IFN-alpha Produktion in PDC anstatt sie zu hemmen

In einem Vorversuch untersuchten wir auch die Möglichkeit der IFN-Induktion durch lange dsRNA in PDC. Zu diesem Zweck wurden PDCs mit Poly I:C (TLR3) oder 500 bp lange dsRNA transfiziert. Im Gegensatz zu den Daten in HEK 293 Zellen (Abb.1), kam es hier zu keiner Induktion von IFN-alpha. Somit gingen wir davon aus, dass dsRNA-Transfektion und auch siRNA-Moleküle in PDCs keine unspezifische IFN-Antwort hervorrufen sollten (Daten nicht gezeigt). Im nächsten Versuch transfizierten wir PDCs mit der bereits etablierten siRNA9.2 (ca. 80% Knockdown von TLR9) und 9.4 (kein Knockdown von TLR9) um sie anschließend mit dem TLR9-Liganden CpG ODN 2216 sowie einem Liganden für TLR7 zu stimulieren. Überraschenderweise zeigte sich anstatt der erwarteten Inhibierung der Interferonproduktion durch siRNA9.2, eine gesteigerte IFN-Produktion. Umgekehrt zeigte siRNA9.4 eine leichte Verminderung der IFN-Produktion, obwohl sich diese siRNA als eine ungeeignete anti-TLR9 siRNA erwiesen hatte (Abbildung 2a).

Die IFN-Produktion der siRNA-transfizierten PDC schien zudem unabhängig von der Stimulation durch TLR9 zu sein, zumal Aktivierung von TLR7 ein ähnliches Muster aufwies (Abbildung 2b). In der Tat zeigte sich, dass die siRNA-Transfektion per se ohne zusätzlich TLR-Stimulation zu einer potenten IFN-Produktion in PDC führte (Abb. 2c). Da hierbei siRNA9.2 eine deutlich stärkere IFN-Produktion hervorrief als siRNA9.4, erklärten sich nun auch die Sequenz-abhängigen Befunde der TLR9- und TLR7-Agonisten stimulierten PDC. Bei wiederholten Versuchen (n= 11 Spender) zeigte sich ein konsistentes Muster der IFN-Produktion bezogen auf die vier verschiedene TLR9 siRNAs (Abbildung 2a). Hierbei zeigte sich, dass besonders siRNA9.2 und 9.3 signifikant mehr Interferon produzierten als siRNA9.1 und 9.4 ($P < 0.0001$ für siRNA9.1 im Gegensatz zu siRNA9.2; $P < 0.0001$ für siRNA9.1 im Gegensatz zu siRNA 9.3, $P < 0.0001$ für siRNA9.1 im Gegensatz zu siRNA9.4 sowie $P < 0.001$ für siRNA9.3 im Gegensatz zu siRNA9.4).

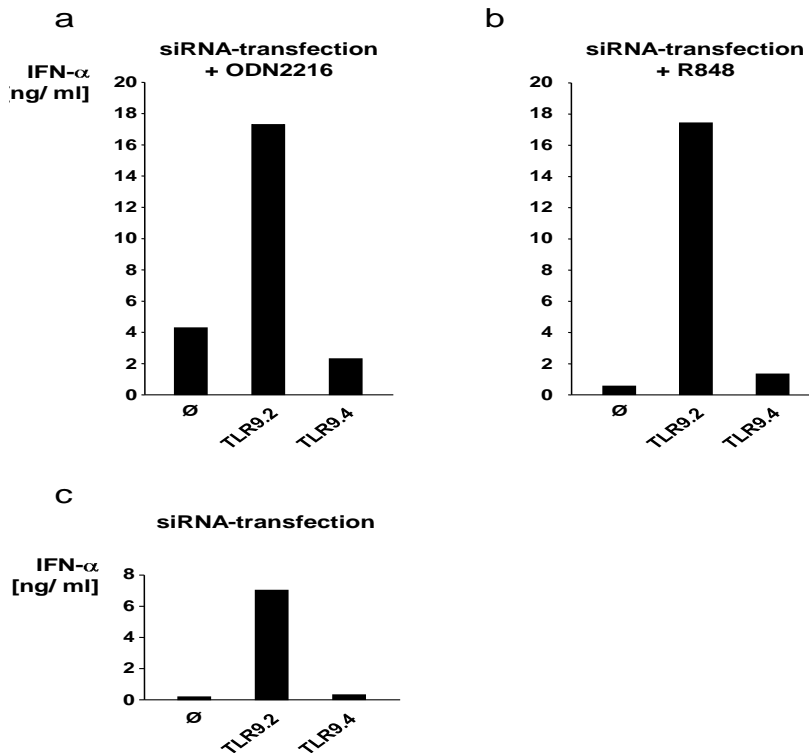


Abbildung 2 Die Transfektion von siRNA gegen TLR9 erhöht die IFN alpha Produktion

PDC wurden zu 50 000 Zellen/well ausplattiert. Anschließend wurden die Zellen mit siRNA (50 nM) transfiziert und dann mit dem Stimulus für TLR9 (ODN 2216) bzw. für TLR7 (R848) stimuliert bzw. transfiziert ohne weitere Stimulierung. Nach 24 Stunden wurden die Überstände abgenommen und mittels Elisa auf Interferon alpha untersucht. Die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) aus Triplikaten wurde zusammengefasst und wird als Mittelwert +/- Standardabweichung (SEM) dargestellt. Ein repräsentatives Experiment aus vier Versuchen wird gezeigt.

Um auszuschließen, dass die Unterschiede zwischen den einzelnen siRNAs durch unterschiedlich starke RNA-Degradation herbeigeführt wurden oder geringe Konzentrationsunterschiede bereits für die beobachteten Unterschiede verantwortlich gemacht werden konnten, führten wir zusätzlich einen *dose response* Versuch für alle vier Sequenzen durch. Hier zeigte sich, dass selbst in der niedrigsten Dosierung siRNA9.2 und 9.3 höhere Werte an IFN-alpha induzierten als siRNA9.1 in der höchsten Konzentration (Abbildung 3). Ähnliche Experimente in primären B-Zellen oder myeloiden dendritischen Zellen zeigten keine Interferoninduktion durch siRNA Moleküle.

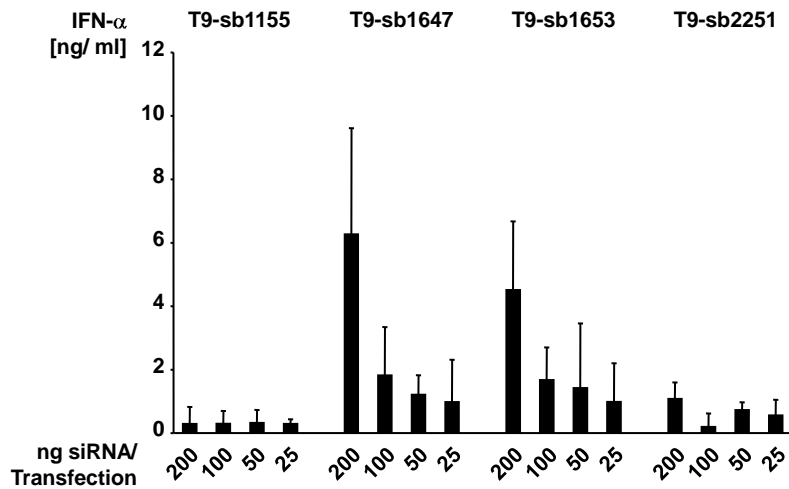


Abbildung 3 Die immunstimulatorische Aktivität ist eine Dose-Response unabhängige Funktion der transfizierten siRNA

PDC wurden zu 50 000 Zellen/well ausplattiert. Anschließend wurden die Zellen mit den vier verschiedenen gegen TLR9 gerichteten siRNA Sequenzen in steigenden Konzentrationen transfiziert (25, 50, 100, 200 ng). Nach 24 Stunden wurden die Überstände abgenommen und mittels Elisa auf IFN-alpha untersucht. Die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) aus Triplikaten wurde zusammengefasst und wird als Mittelwert +/- Standardabweichung (SEM) dargestellt. Ein repräsentatives Experiment aus 3 Versuchen wird gezeigt.

Interessanterweise erwiesen sich diejenigen siRNAs als potente IFN-Induktoren, die auch gleichzeitig einen effektiven Knockdown von TLR9 bewerkstelligten. Um zu testen, ob der Knockdown von TLR9 mit der IFN-Induktion verknüpft war, testeten wir zusätzlich eine Reihe von siRNAs für die es kein spezifisches Target – sprich Ziel-mRNA - in PDC gab. Wir wählten hierfür unterschiedliche Toll-like-Rezeptoren, die nicht von PDC exprimiert werden (TLR2, TLR3, TLR4). In dieser Versuchsreihe zeigte sich eindeutig, dass keine Korrelation zwischen der Fähigkeit der verschiedenen siRNAs eine Interferonantwort zu induzieren und dem Vorhandensein einer Ziel-mRNA bestand. Dies bestätigte somit die Vermutung, dass die Interferon-alpha Induktion in PDC sequenzabhängig ist und nicht vom Vorhandensein einer Ziel-mRNA abhängt (Abbildung 4).

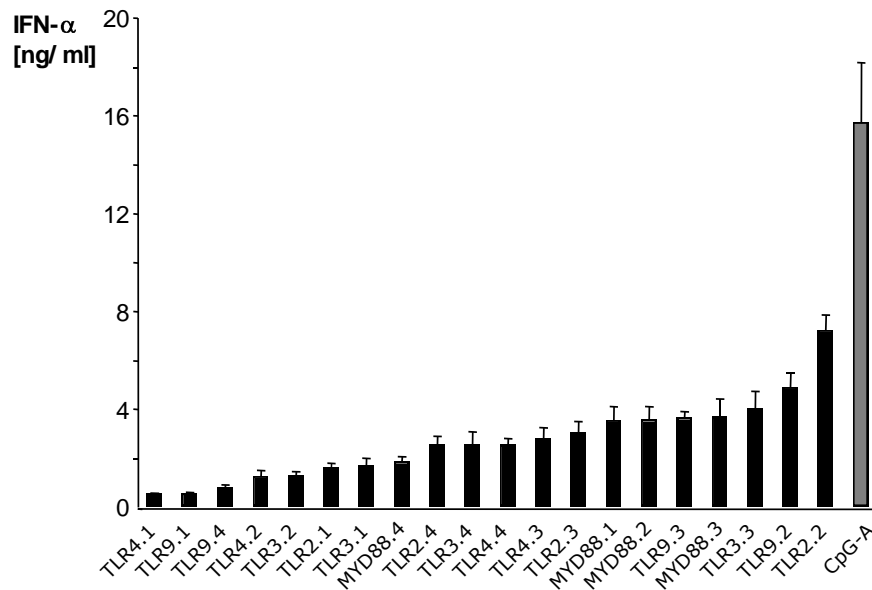


Abbildung 4 Die Interferonantwort in PDC ist unabhängig vom Vorhandensein des spezifischen Targets

PDC wurden zu 50 000 Zellen/well ausplattiert. Anschließend wurden die Zellen mit siRNA gegen TLR 2,3,4,9 sowie MyD88 (50 nM) transfiziert. Nach 36 Stunden wurden die Überstände abgenommen und mittels Elisa auf IFN-alpha untersucht. Die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) aus Triplikaten wurde zusammengefasst und wird als Mittelwert +/- Standardabweichung (SEM) dargestellt. Ein repräsentatives Experiment aus fünf Versuchen wird gezeigt.

3.1.3 Identifizierung der IFN-alpha induzierenden Sequenz

3.1.3.1 Konfiguration

Während der Durchführung dieser Arbeiten wurde von zwei unabhängigen Gruppen veröffentlicht, dass einzelsträngige RNA-Moleküle über TLR7 erkannt werden (Diebold et al 2004; Bauer et al 2004). Insbesondere aus den Vorarbeiten von Diebold et al. war bekannt, dass die Anzahl an Uridin- und Guanosinanaloga in RNA eine Rolle für die Erkennung und Auslösung einer Immunantwort in PDC spielt (Diebold et al. 2004). Eine Analyse der Anzahl an Uridin- und Guanosinanaloga unserer verwendeten siRNAs ergab keinerlei Korrelation zwischen Menge an U beziehungsweise G und der Fähigkeit der jeweiligen Sequenz eine Interferonantwort zu induzieren. Daraus leitete sich für uns die Hypothese ab, dass womöglich eine spezifische Nukleotidsequenz Ursache für die immunologische Aktivität sein könnte. Um dies näher zu untersuchen, verglichen wir die Fähigkeit der Einzelstränge von siRNA9.2 und der des Doppelstranges hinsichtlich der Fähigkeit Interferon zu induzieren. Interessanterweise

entsprach hierbei die Aktivität des Sense-Stranges in etwa der Aktivität des Doppelstranges, während der Antisense-Strang nur eine geringe Interferonantwort auslöste. Gleichzeitig zeigte sich, dass lediglich der Antisense-Strang in der Lage war (wie auch der Doppelstrang), die TLR9-Expression zu hemmen.

Da siRNA durch einen Annealing Prozess entsteht, der Anti-Sense als auch Sense-Strang enthält, bestand die Möglichkeit, dass die immunstimulatorische Aktivität des Doppelstrangs auf dem Vorhandensein von nicht komplett annealten Sense-Einzelsträngen beruht. Um diese Möglichkeit auszuschließen führten wir einen Versuch durch, in dem Sense-Strang und Doppelstrang mit RNase T1 inkubiert wurde und nach 3 Stunden die Menge an Sense- wie auch Doppelstrang durch eine Gelelektrophorese bestimmt wurde. RNase T1 degradiert unter den gewählten Inkubationsbedingungen nur einzelsträngige, jedoch keine doppelsträngigen RNA Moleküle. Erwartungsgemäß zeigte sich eine komplette Degradierung des Sense-Stranges nach 3 Stunden mit konsekutivem Verlust der Fähigkeit IFN-alpha zu induzieren (Abbildung 5). Die Immunantwort in Form der Interferonproduktion war jedoch beim Doppelstrang unverändert.

Um den möglichen Einfluss von Einzelstrang-RNA in der Interferoninduktion zusätzlich auszuschließen, entwarfen wir eine Einzelstrang-siRNA, die aufgrund der Sequenzkomposition dazu führte, dass die siRNA die Form eines Hairpins annimmt – analog einer *short hairpin* (sh)RNA. Die *hairpin* Konfiguration dieses Moleküls wird thermodynamisch stark bevorzugt, ein einzelsträngiges Vorliegen dieses Moleküls ist unter normalen Zellkulturbedingungen (37°C) nicht möglich. In dieser *hairpin* RNA befand sich die komplette Sequenz der siRNA 9.2 in dem doppelsträngigen Abschnitt der *hairpin* RNA. Auch die Transfektion dieser RNA zeigte keinen Unterschied zwischen der regulären siRNA9.2 und der *hairpin* siRNA in der Fähigkeit IFN-alpha in PDC zu induzieren (Abbildung 6). Zusammenfassend konnten diese Versuche eindeutig belegen, dass RNA sowohl in einzelsträngiger, aber auch in doppelsträngiger Konfiguration in PDC erkannt wird und zu einer IFN-Produktion führen kann.

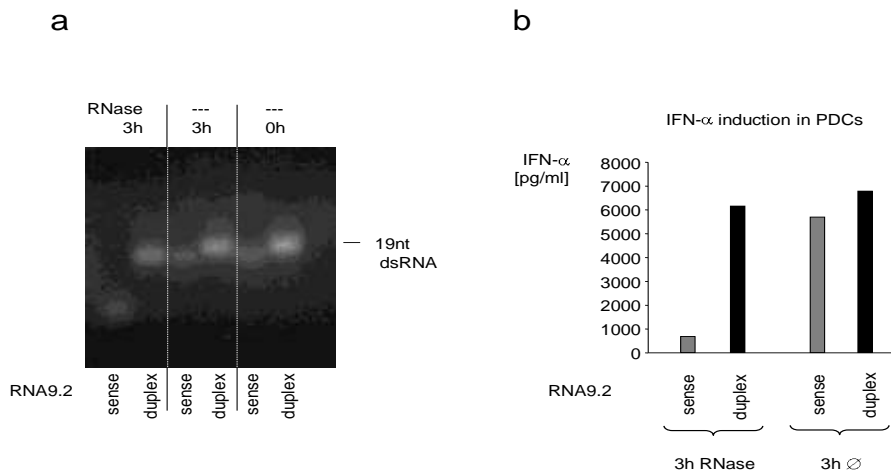


Abbildung 5 Die Immunantwort, ausgelöst durch die Transfektion mit siRNA, ist nicht abhängig von der Stimulation durch Einzelstrang RNA

Die Einzelstrang-siRNA 9.2 bzw. der entsprechende Doppelstrang wurde mit RNase T1 (266 µg/ml) für 3 Stunden inkubiert. Nach 3 Stunden wurden 4 µl des Ansatzes auf 3% Agarose Gel aufgetragen und analysiert. Als Positivkontrolle wurde ein Ansatz ohne RNase benutzt (linke Spalte Abbildung 5a). Nach Entfernung der RNase mit Hilfe von siRNA Purification columns wurden 3 µl des Ansatzes zur Transfektion von PDCs (50 000 Zellen/well) verwendet. Nach 36 Stunden wurde der Überstand abgenommen und die Interferonmenge mittels ELISA bestimmt (Abbildung 5b).

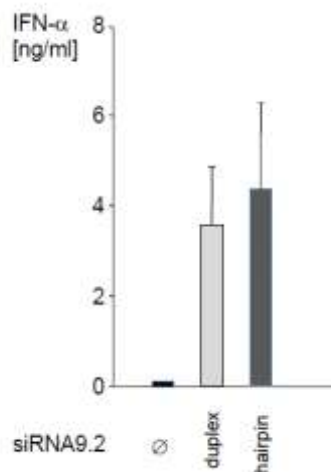


Abbildung 6 Einzelstrang hairpin RNA führt zur Interferonproduktion in PDC

Die verwendete hairpin siRNA kann aufgrund thermodynamischer Eigenschaften bei Zellkulturbedingungen nur als Doppelstrang vorliegen. siRNA 9.2 und Hairpin siRNA wurde zur Transfektion von PDCs (50 000 Zellen/well) verwendet. Nach 36 Stunden wurde der Überstand abgenommen und die Interferonmenge mittels ELISA bestimmt (n=2).

3.1.3.2 Sequenz

In dem Pool verschiedener siRNAs, die wir in ihrer Fähigkeit, IFN zu induzieren, verglichen hatten, befanden sich zwei siRNAs mit potenter immunstimulatorischer Fähigkeit, die sich in 13 Basen in ihrer Sequenz überlappten (siRNA9.2 und 9.3). Aufgrund der gemeinsamen Fähigkeit, Interferon zu induzieren, vermuteten wir, dass sich ein mögliches Sequenzmotiv für die immunologische Aktivität eventuell in den 13 Basen am 3'Ende des Sense-Stranges von siRNA9.2 bzw. am 5'Ende von siRNA9.3 befinden könnte. Ein weiterer Befund, der diese These stütze war, dass sich die immunologische Fähigkeit von siRNA9.2 verringerte, wenn an das 3'Ende ein FITC Molekül angebracht wurde. Diese Modifikation könnte durch die räumliche Nähe zu dem möglichen 13-mer-Motiv die Erkennung durch den entsprechenden Rezeptor stören. Eine FITC-Modifikation am 5'Ende führte zu keiner Verringerung der IFN-Produktion. In der Tat zeigte sich, dass eine Modifikation am 5'Ende die Aktivität sogar deutlich erhöhte (Abbildung 7).

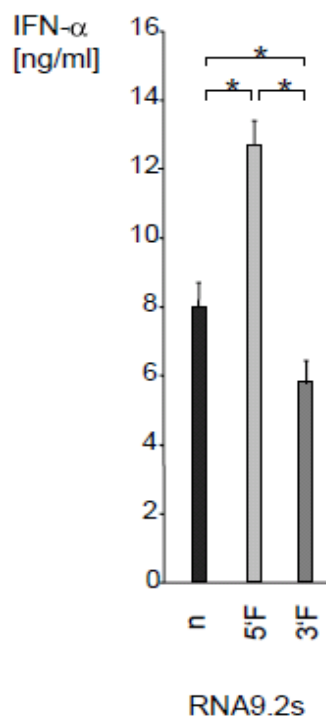


Abbildung 7 Die immunstimulatorische Fähigkeit von siRNA9.2 ist beeinflussbar durch Veränderungen an den Sequenzenden

PDC (50 000/well) wurden mit dem sense Strang von siRNA 9.2 (n), sowie siRNAs, die entweder am 3` (3`F) oder am 5` (5`F)-Ende mit einem FITC-Molekül versehen worden waren stimuliert. Nach 36 Stunden wurde der Überstand abgenommen und die IFN-alpha Produktion mittels ELISA gemessen. Die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) aus Triplikaten wurde zusammengefasst und wird als Mittelwert +/- Standardabweichung (SEM) dargestellt. Ein repräsentatives Experiment aus drei Versuchen wird gezeigt.

Um das mögliche Motiv der immunstimulatorischen RNA weiter einzugrenzen, beschlossen wir, gezielt Sequenz-Veränderungen in die aktive siRNA 9.2 Sense-RNA einzuführen. Aufgrund der fehlenden immunstimulatorischen Aktivität eines 19-mer poly-Adenosin-RNA-Stranges, wählten wir Adenosin als "Platzhalter-Base" für die folgenden Versuchsreihen. Wurden die ersten (vom 5'Ende aus) 10 Positionen von siRNA9.2 durchgehend mit Adenosin Nukleotiden ersetzt (L10A), zeigte sich keine deutliche Abnahme der immunstimulatorischen Aktivität von siRNA9.2. Eine weitere Modifikation (L11A), die das G an Position 11 durch ein A ersetzte, führte jedoch zu einem fast kompletten Verlust der Aktivität. Im Gegensatz hierzu zeigte sich, dass das Ersetzen von acht Basen vom 3'Ende aus zu einem kompletten Verlust der immunologischen Aktivität führte. Zusammenfassend zeigten diese Ergebnisse somit, dass sich das immunologisch aktive Motiv von siRNA9.2 in den Positionen 11-19 befindet (Motiv: 5'-GUCCUCAA-3').

3.1.2.3 Längenabhängigkeit der immunologischen Aktivität

Weiterhin wollten wir untersuchen, ob es eine Längenabhängigkeit in der immunologischen Aktivität von siRNA Molekülen gab. Hierzu wurden verkürzte Versionen von siRNA9.2 Sense generiert, die entweder nur 16 oder 12 Basen lang waren. Bei diesen Versuchen zeigte sich, dass die dsRNA 19 Basenpaare lang sein musste, um eine potente IFN-alpha Antwort auszulösen. Das 16-mer und das 12-mer zeigten hier eine stark verringerte immunologische Aktivität.

In weiteren Versuchen wollten wir untersuchen, ob eine zusätzlich gesteigerte IFN-Antwort induziert werden konnte, wenn das bereits identifizierte aktive Sequenzmotiv 5'-GUCCUCAA-3' mehrfach in einem RNA Molekül integriert wurde. Ein 19-mer RNA Oligonukleotid, das dieses Motiv exakt zwei Mal hintereinander aufführte (9.2DR), zeigte tatsächlich eine gesteigerte Aktivität im Vergleich zu siRNA9.2. Eine Verdoppelung konnte hierbei jedoch nicht erreicht werden.

3.1.4 Der Einfluss von RNA stabilisierender „locked nucleic acid“ auf die Funktionalität von siRNA 9.2

Locked nucleic acid (LNA) Moleküle werden oft benutzt um die Stabilität – vor allem die thermische Stabilität – von Oligonukleotiden zu erhöhen (Kaur et al. 2006). Hierzu wird das Ribose-Molekül mit einer zusätzlichen Brücke versehen, die das 2' und 4' Kohlenstoffatom verbindet. Dies führt zu einer Stabilisierung des Ribosemoleküls in der 3' Konformation. Uns stellte sich nun die Frage, ob die Verwendung solcher LNA-Moleküle Veränderungen in Bezug auf die immunstimulatorische Antwort oder die Fähigkeit, die TLR9 Expression zu hemmen, haben würde.

Hierzu tauschten wir am Sense-Strang jeweils entweder am 5' oder am 3' Ende vier Nukleotide durch LNA-Nukleotide aus. Der Austausch am 5' Ende zeigte keinerlei Konsequenz bzgl. der immunologischen Aktivität von siRNA9.2 wohingegen die Veränderung am 3' Ende zu einem deutlichen Verlust der IFN-alpha Aktivität führte (Abbildung 8). Diese Versuche bestätigen somit wiederum die Beobachtung, dass sich das immunologisch aktive Motiv am 3' Ende der siRNA9.2 befindet.

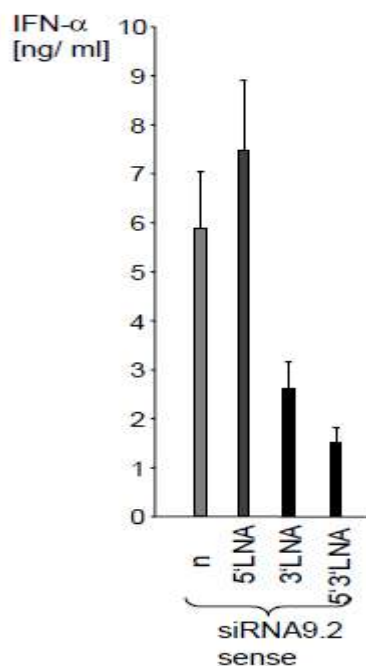


Abbildung 8 Locked nucleic acid Modifikationen zeigen, dass IFN-alpha-Induktion und Silencing zwei voneinander unabhängige Funktionen sind.

PDC (50 000/well) wurden mit siRNA9.2 transfiziert, die entweder am 5' Ende, am 3' Ende oder an beiden Enden vier Nukleotide durch LNA-Nukleotide ersetzt bekommen hatten. Nach 36 Stunden wurde der Überstand abgenommen und mittels ELISA auf IFN-alpha untersucht. Die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) aus Triplikaten wurde zusammengefasst und wird als Mittelwert +/- Standardabweichung (SEM) dargestellt. Ein repräsentatives Experiment aus drei Versuchen wird gezeigt.

Im darauffolgenden Versuchen wollten wir nun den Einfluss von LNA-Modifikationen auf die immunologische Aktivität eines Doppelstrangs untersuchen. Hierzu wurden, wie für 9.2 Sense beschrieben, drei verschiedene LNA-modifizierte Versionen des Antisense-Strangs von siRNA 9.2 generiert und mit den modifizierten Sense-Strängen zu einem Doppelstrang hybridisiert. Da jeweils vier verschiedene RNA-Einzelstränge vorlagen (ein unmodifizierter Sense oder Antisense Strang + drei LNA-modifizierte Sense oder Antisense Stränge) ergaben sich hierbei 16 verschiedene Doppelstrangkombinationen. In vorausgegangen Versuchen hatten wir beobachtet, dass der Antisense-Strang von siRNA9.2 für die immunologische Aktivität der 9.2 siRNA nicht verantwortlich war. Im Einklang mit dieser Beobachtung zeigte sich, dass die LNA-Modifikationen des Antisense-Strangs keinen Einfluss auf die immunologische Aktivität hatte. Wie bereits bei der Testung der Einzelstränge beobachtet, führte eine LNA-Modifikation am 3'Ende von 9.2 Sense zu einer deutlichen Reduktion der IFN-Induktion, wohingegen die LNA-Modifikation am 5'Ende toleriert wurde (Abbildung 9).

Ein anderes Bild ergab sich, wenn die Knockdown Aktivität der siRNA Moleküle untersucht wurde. Jegliche LNA-Modifikationen des Antisense-Strangs ergab eine deutliche Reduktion der Knockdown Aktivität im Vergleich zu dem unmodifizierten Antisense-Strang. Insbesondere die LNA-Modifikationen am 5'Ende des Antisense-Strangs führten zu einer dramatischen Abnahme der *silencing* Aktivität. Diese Befunde sind im Einklang mit dem Mechanismus der RNA Interferenz. So konnte gezeigt werden, dass ein siRNA Duplex vom 5'Ende des Antisense-Strangs über einen aktiven Prozess entwunden wird. Wird die thermodynamische Stabilität am 5'Ende des Antisense Strangs erhöht (z.B. durch LNA), so wird ein Auseinanderweichen der beiden RNA-Stränge deutlich erschwert. LNA-Modifikationen am Sense-Strang hatten hingegen keinen Einfluss auf die *silencing* Aktivität der siRNA.

Insgesamt konnte somit eine klare Dichotomie der beiden Funktionalitäten – erstens Knockdown Aktivität und zweitens immunologische Aktivität herausgearbeitet werden.

LNA-Modifikationen am 3' Ende des Sense Strangs führen zu einer deutlichen Reduktion der immunologischen Aktivität der hier untersuchten siRNA9.2, wobei die Knockdown Aktivität nicht beeinflusst wird. LNA-Modifikationen am Antisense-Strang führen zu einer deutlichen Reduktion der Knockdown Aktivität, beeinflussen jedoch nicht die immunologische Aktivität. Somit können aus diesen verschiedenen Sense und Antisense Kombinationen exemplarisch vier siRNA Moleküle gewählt werden, die die immunologische Aktivität (I) oder RNAi Aktivität (R) unabhängig voneinander positiv (+)

oder negativ (-) ausüben: z.B. No. 1: I+/R+, No. 13: I+/R-, No. 3: I-/R+ oder No. 16: I-/R-.

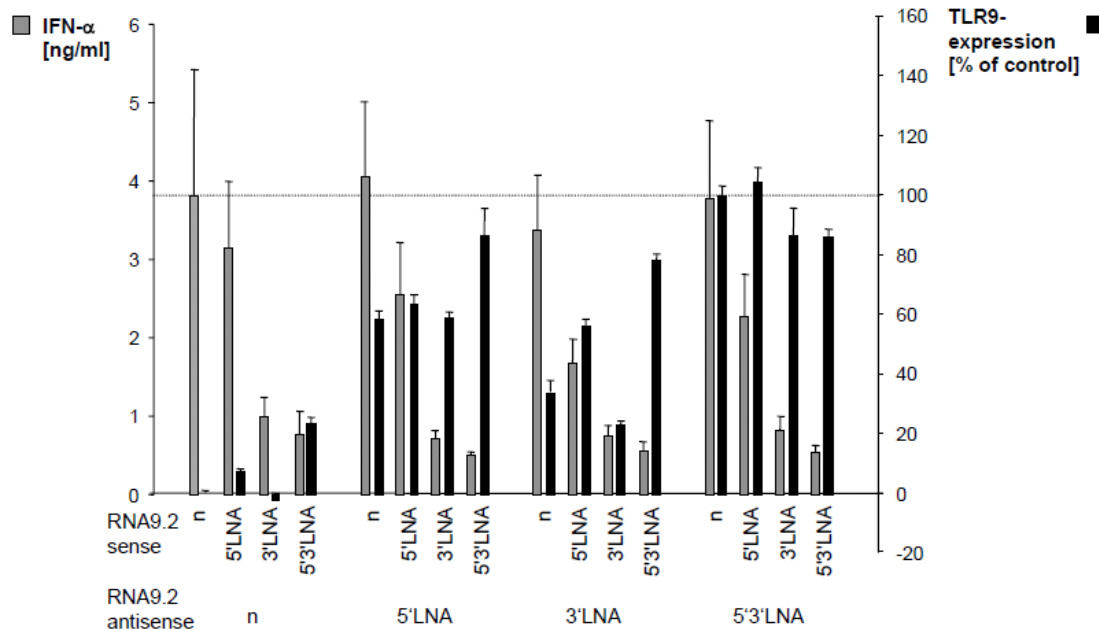


Abbildung 9 Veränderungen am 3'Ende führen zu einer Abnahme der immunologischen Aktivität, nicht jedoch der Aktivität des Knockdowns von siRNA9.2

PDC (50 000/well) wurden in 96-Well-Platten ausplattiert und mit verschiedenen am 3' und 5' Ende modifizierte siRNA-Duplexen transfiziert. Nach 36 Stunden wurde der Überstand abgenommen und auf Interferon alpha Produktion mittels ELISA untersucht. Gleichzeitig wurden HEK293 Zellen die stabil TLR9 exprimierten mit den gleichen Konstrukten transfiziert. Nach 20 Stunden wurde die TLR9-Expression mittels FACS Analyse gemessen. Die TLR9-Expression wird in Prozent angegeben. Die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) aus Triplikaten wurde zusammengefasst und wird als Mittelwert +/- Standardabweichung (SEM) dargestellt. Ein repräsentatives Experiment aus drei Versuchen wird gezeigt.

3.1.5 siRNA wird über TLR7 erkannt

Abschließend wollten wir den Mechanismus der IFN-Induktion durch siRNAs in PDC klären. Hierzu wechselten wir in das murine System, da es hier möglich ist, mit Zellen von Knockout-Tieren zu arbeiten und somit erlaubt, eindeutig mechanistische Fragestellungen zu lösen. Hierzu wurden zuerst Knochenmarkszellen von Wildtyp-Tieren in vitro mit den bereits bekannten RNA-Molekülen stimuliert. Hierbei zeigte sich, dass, ähnlich dem humanen System, siRNA-Doppelstrang-RNA Moleküle oder Einzelstrang-RNA-Moleküle eine potente Typ-I-IFN-Antwort induzierten. Die im humanen System bereits beobachtete Sequenz-Abhängigkeit bestätigte sich auch im murinen System (siRNA9.2 Sense zeigte eine deutlich stärkere IFN-Antwort im Vgl. zu

9.2 Antisense) (Abb. 10). Da sich die Interferonantwort auf siRNA in Knochenmarkszellen der Maus als komplett PDC-abhängig erwies, verzichteten wir aus technischen Gründen auf eine Aufreinigung von murinen PDCs für diese und folgende Experimente. Eigene Versuche mit Knochenmarkskulturen aus MyD88-defizienten Mäusen hatten bereits impliziert, dass ein TLR-abhängiger Mechanismus für die Erkennung von siRNA Molekülen notwendig war (Daten nicht gezeigt).

Ferner zeigte sich, dass die RNA-Erkennung stark durch den endosomalen Inhibitor Chloroquin gehemmt werden konnte. Chloroquin war insbesondere als Inhibitor endosomaler TLRs bekannt, so dass sich TLR3, TLR7, TLR8 und TLR9 als mögliche Kandidaten herauskristallisierten. Letztlich, in Anbetracht der damals kürzlich beschriebenen Erkennung von RNA-Viren und RNA-Molekülen durch TLR7, erschien uns eine Untersuchung dieses Rezeptors am sinnvollsten. Hierzu wurden Knochenmarkszellen aus TLR7-defizienten Mäusen und Kontrollmäusen gewonnen um anschließend die Knochenmarkskulturen mit den bekannten Stimuli zu aktivieren. Hierbei zeigte sich, dass die siRNA-abhängige und die Einzelstrang-RNA-abhängige IFN-Induktion komplett TLR7-abhängig war, wohingegen CpG-DNA als TLR9 Stimulus nicht in seiner Fähigkeit, IFN zu induzieren, beeinträchtigt war.

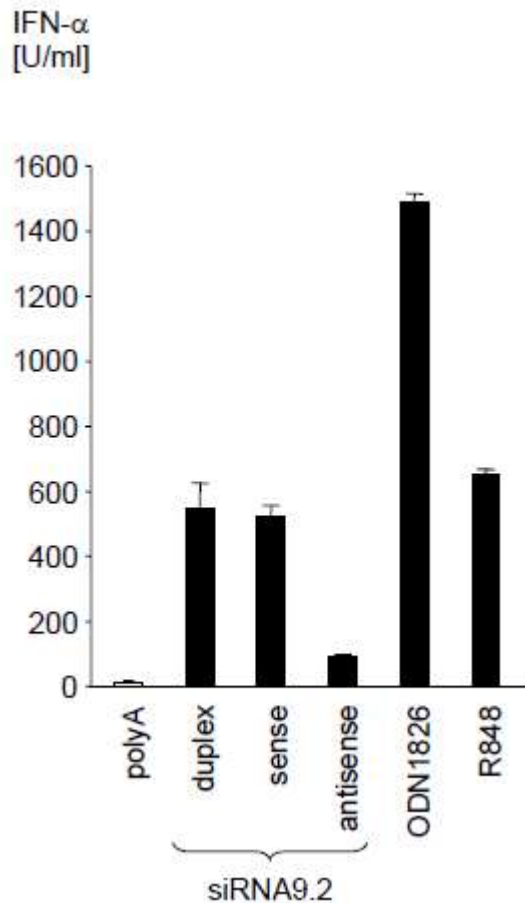


Abbildung 10. Die Fähigkeit von siRNA zur Interferonproduktion ist auch im murinen System sequenzabhängig.

Knochenmarkszellen der Maus (Stamm 129v) wurden für 36 Stunden mit siRNA9.2, siRNA9.2s, siRNA9.2a, Poly A, ODN 1826 oder R848 inkubiert. Anschließend wurde der Überstand abgenommen und mit Hilfe eine mausspezifischen ELISA (PBL Biomedical Laboratories) gemessen. Die mittlere Fluoreszenzintensität [MFI] aus Triplikaten wurde zusammengefasst und wird als Mittelwert +/- Standardabweichung (SEM) dargestellt. Ein repräsentatives Experiment aus drei Versuchen wird gezeigt.

4. Diskussion

4.1 Übersicht über die experimentellen Befunde

RNA Interferenz ist eine potente Methode zur Manipulation der Genexpression. Im Anschluss an die Erstbeschreibung des Einsatzes von siRNA im eukaryonten System durch Tuschl et al. kam es zu einer wahrlichen Explosion von Arbeiten im Bereich der RNAi (Elbashir et al. 2001). Die meisten dieser Untersuchungen im humanen System erfolgten jedoch mit Zellkulturlinien und nicht mit primären Zellen des Immunsystems. Aufgrund dieser Tatsache konnte und wurde die Möglichkeit von unspezifischen Nebenwirkungen von RNAi im humanen Immunsystem negiert. Sledz et al. konnte 2003 zeigen, dass die Transfektion von siRNA in Tumorzelllinien zur Hochregulation von IFN-abhängigen Genen führt und in dieser Arbeit wurde eine Rolle für PKR in diesem System impliziert (Sledz et al. 2003). Darauf folgende Arbeiten konnten jedoch diese Daten nicht replizieren und auch unsere Experimente in Zelllinien zeigten, dass synthetische siRNAs hier keine Immunantwort hervorriefen.

Basierend auf diesen ermutigenden Vorarbeiten, versuchten wir mittels siRNA in humanen PDC einzelne Zielgene auszuschalten. PDC stellen eine sehr seltene und schwierig aufzureinigende Zellpopulation dar und eine Zelllinie, die PDC-Eigenschaften besitzt, war zu dem Zeitpunkt der Durchführung dieser Arbeit nicht verfügbar. Überdies lassen sich PDC durch gängige Techniken der Plasmid-Transfektion oder Antisense-Verfahren nicht manipulieren, so dass mechanistische Fragestellungen mit *loss of function* Ansätzen in PDC schwer, wenn überhaupt, möglich sind. In diesem Zusammenhang erschien die Technik der RNAi als äußerst geeignet, in diesen Zellen gezielt einzelne Signaltransduktionsmechanismen zu manipulieren und somit interessante immunologische Fragestellungen zu adressieren.

RNAi hatte sich insbesondere durch die sehr hohe Spezifität im target-knockdown hervorgetan und ferner den großen Vorteil, dass auch sehr geringe Zellzahlen für die Experimente eingesetzt werden konnten. In Vorarbeiten erschien uns die PDC als geeignete Zielzelle, da lange Doppelstrang-RNA hier keine Immunantwort induzierte. Als *proof of concept* wählten wir den bereits bekannten Immunrezeptor TLR9 als Zielstruktur in PDC, um die Antwort auf CpG-DNA zu inhibieren. Interessanterweise zeigte sich jedoch in diesen Experimenten, dass kurze doppelsträngige RNAs (siRNAs), sowie einzelsträngige RNA per se eine potente Immunantwort in PDC

hervorriefen. Dieses Phänomen erwies sich als Sequenz-abhängig. Exemplarisch an einem potenten siRNA Molekül (9.2) konnten wir die wichtigsten Eigenschaften für einen potenten, immunstimulatorischen RNA-Liganden herausarbeiten (Sequenz, Länge, Modifikationen). Ferner ergab sich durch diese Versuche die interessante Möglichkeit, immunstimulatorische Aktivität von Knockdown Aktivität rational zu trennen. Als Mechanismus für die Fremderkennung von kurzen RNA Molekülen konnten wir zudem eine nicht-redundante Rolle des Toll-like-Rezeptor 7 identifizieren.

4.2 Sind siRNAs zu klein, um vom Radar des Immunsystems detektiert zu werden?

Lange doppelsträngige RNA kommt in eukaryoten Zellen normalerweise nicht vor und löst daher eine Reihe von Mechanismen aus, die dem Schutz der Zelle vor eindringenden Pathogenen dient. Die Bildung doppelsträngiger RNA während der viralen Replikation wird von den Zellen des Immunsystems als Warnsignal interpretiert und führt somit zur Auslösung einer Immunantwort und zum Translationsstopp (Ahluquist et al. 2002; Plasterk et al. 2002). In den letzten Jahren wurden die Mechanismen, die im Rahmen dieses Prozesses ablaufen müssen, zunehmend besser verstanden. Zwei Gene, die diesen Prozess, der im Anschluss an die Erkennung von doppelsträngiger RNA abläuft, steuern, sind OAS1 sowie PKR. Die *2'5'oligoadenylate synthetase* (OAS1) wird durch dsRNA aktiviert und führt zur sequenzunabhängigen Degradation von RNA durch RNase L (Minks et al. 1979). Die Protein Kinase R führt nach ihrer Aktivierung zur Phosphorylierung des Translation Faktors EIF2A und dadurch zur Hemmung der Translation. Alexopoulou konnte 2001 zeigen, dass dsRNA auch über die Erkennung durch den Toll-like-Rezeptor 3 zur Auslösung einer Interferonantwort führen kann (Alexopoulou et al. 2001). Yoneyama et al zeigte 2004 das RIG-I, eine zytoplasmatische Helicase, ebenfalls durch dsRNA aktiviert wird und in Folge zur Transkription von IFN-beta Genen führt (Yoneyama et al. 2004).

Ausschlaggebend ist jedoch, dass im Vorfeld dieser Arbeit davon ausgegangen wurde, dass lediglich lange doppelsträngige RNA, nicht jedoch RNA kürzer als 30 Basenpaare in der Lage sei, eine Sequenz-unabhängige Hemmung der Translation und einer IFN-Induktion auszulösen. siRNA-Duplexe wurden als zu kurz betrachtet, um vom Immunsystem als Gefahrensignal erkannt zu werden (Elbashir et al. 2001; Bitko et al. 2001).

In der vorliegenden Arbeit konnten wir nun zeigen, dass die bisher angenommene These, die Erkennung von dsRNA durch das Immunsystem sei von der Länge der dsRNA abhängig nicht mehr gültig ist (Elbashir et al. 2001; Bitko et al. 2001). Die Transfektion von PDC mit einer 500 Basenpaar langen dsRNA führte nicht zur Auslösung einer Interferon Antwort, wohingegen jedoch einige der getesteten siRNA-Sequenzen sehr wohl in der Lage waren, Interferonantworten in PDC auszulösen, die dem Niveau von CpG-Oligonukleotiden entsprachen.

4.3 Aktivierung des humanen Immunsystems durch siRNAs

2003 gab es erste Hinweise, dass der Einsatz von siRNAs im humanen System durch die Induktion von Typ I Interferon kompliziert werden könnte (Sledz et al. 2003). Sledz et al. konnte zeigen, dass die Transfektion von 21 Basenpaar langer doppelsträngiger siRNA entgegen der bis dahin postulierten Meinung in der Lage ist, eine Interferonantwort auszulösen. Die Transfektion von siRNA gegen Lamin A/C in einer Glioblastom Zelllinie führte zu einer dosisabhängigen Hochregulation von Stat1, einem Protein der Interferonsignalkaskade. In diesen Experimenten wurde jedoch auch 5'Triphosphat siRNA in einigen Schlüsselexperimenten eingesetzt, was die immunstimulatorische Aktivität rückblickend erklärt – zumal Triphosphat-RNA ein potenter Aktivator der zytosolischen RNA Helikase RIG-I ist.

4.3.1 Immunstimulation in verschiedenen Zellpopulationen

Die unterschiedlichen Ergebnisse bzgl. der immunstimulatorischen Fähigkeit von siRNAs beruhen unter anderem auf der Verwendung unterschiedlicher Zielzellen. Die meisten Arbeiten wurden mit Zellkulturlinien durchgeführt, die oftmals nur mehr über eine geringe immunologische Stimulationsfähigkeit verfügen. So vermutete Kariko et al., dass die Auslösung einer IFN-Antwort auf den Stimulus siRNA über TLR3 erfolgt (Kariko et al. 2004). Diese Versuche wurden mit HEK293 Zellen durchgeführt, die eine Überexpression von TLR3 zeigen. Diese Überexpression führte zu einer vielfach erhöhten IFN Produktion nach Stimulation mit siRNAs. Eine solche Überexpression kann gleichzeitig mit einer Hochregulation von zytosolischen RNA Rezeptoren einhergehen, die so indirekt die IFN Antwort verstärken und dadurch ein falsch positives Ergebnis liefern. Im Gegensatz dazu benutzte Sledz et al. *mouse embryonic*

fibroblasts (MEFs) von denen bekannt ist, dass sie über genetische Defekte bzgl. der Interferonkaskade verfügen (Sledz et al. 2003). Desweiteren fehlt den meisten der üblicherweise verwendeten Zelllinien die Rezeptoren TLR7 und TLR8. Dies könnte eine Erklärung dafür sein, weshalb in diesen Studien keine Immunantwort ausgelöst wurde (Sioud et al. 2006). Manche Zelllinien verfügen des Weiteren über eine defekte TLR-Signalkaskade – so konnte beispielsweise trotz Überexpression von TLR7 in HEK293 Zellen keine Immunantwort auf immunstimulatorische siRNAs ausgelöst werden (Judge et al. 2005). Reynolds et al. konnte zeigen, dass erheblich Unterschiede bzgl. der Immunantwort in häufig verwendeten Zelllinien bestehen. So führte der gleiche Versuchsansatz zu erheblichen Unterschieden in HEK293 und HeLa Zellen. Mit Hilfe von Microarray Assays konnte dabei gezeigt werden, dass es in den bezüglich des Überlebens unempfindlichen HEK293 Zellen zur Induktion von 63 Genen kam, während in den empfindlichen HeLa Zellen mehr als 300 Gene als Folge der Transfektion hochreguliert wurden (Reynolds et al. 2006).

4.3.2 Erkennung von siRNAs durch die PDC im humanen System

Im Gegensatz zu Zelllinien, die oftmals aufgrund oben erwähnter Ursachen nur mehr eine geringe Fähigkeit zur Immunantwort besitzen, reagieren primäre Immunzellen aus dem peripheren Blut sehr sensitiv auf immunstimulatorische Reagenzien. Zu diesen primären Immunzellen gehört auch die plasmazytoide dendritische Zelle, die spezialisiert ist auf die Erkennung von Viren und die dadurch ausgelöste Interferonantwort. PDC sind in der Lage, nach entsprechendem Stimulus, große Mengen an Interferon zu produzieren (Rothenfusser et al. 2002). Um Viren erkennen zu können, verfügen PDC über die im Endosom lokalisierten Rezeptoren TLR7 und TLR9.

Die initiale Überlegung dieser Arbeit war es, den Einfluss von Viren auf die TLR9 vermittelte Interferonantwort genauer zu untersuchen. Deshalb entwickelten wir eine Reihe von siRNA-Sequenzen, die sich gegen TLR9 richteten: Zunächst wurden sie an HEK293 Zellen getestet, die TLR9 stabil exprimierten. In diesen Versuchen kam es zu keiner messbaren Immunantwort als Folge der Transfektion. Im Anschluss an diese Versuche wurden PDC mit den gleichen, gegen TLR9 gerichteten Sequenzen transfiziert. Überraschenderweise zeigte sich bei diesen Zellen eine reproduzierbare Auslösung einer IFN-Antwort.

Überdies kam es zu einer Verstärkung der Interferonantwort in jenen Versuchsansätzen, in denen PDC erst mit einer gegen TLR9 gerichteten siRNA inkubiert worden waren um anschließend mit CpG Oligonukleotiden stimuliert zu werden. Sowohl Poly I:C, der Prototyp der dsRNA, wie auch eine 500 Basenpaar lange dsRNA führten zu keiner IFN-alpha Produktion in PDC.

Diese Arbeit zeigt somit, dass die Wahl der Zielzelle einen entscheidenden Einfluss im Rahmen von RNAi Untersuchungen spielt. Da plasmazytoide dendritische Zellen in allen in vivo Ansätzen vorhanden sein werden, ist dieser Aspekt von immenser Bedeutung für etwaige spätere klinische Applikationen.

4.3.3 Sequenzabhängigkeit der immunstimulatorischen Wirkung von siRNA

Im Vorfeld dieser Arbeit zeigte Heil in Untersuchungen, dass die Häufigkeit von GU Sequenzen in Einzelstrang RNA eine Rolle hinsichtlich der immunstimulatorischen Fähigkeit hat (Heil et al. 2004). Im Rahmen dieser Arbeit zeigte sich, dass dies bezogen auf die immunstimulatorische Fähigkeit von siRNA9.2 und siRNA9.3 keine Relevanz hat. Deshalb stellte sich die Frage, ob eine bestimmte Nukleotidsequenz die immunologische Aktivität bestimmen könnte. Um ein mögliches Motiv besser charakterisieren zu können, untersuchten wir die immunologische Wirkung von Sense- und Antisense-Strang. Hierbei zeigte sich, dass lediglich der Sense Strang die gleiche immunstimulatorische Kapazität wie der Duplex aufwies. siRNA9.2 und siRNA9.3 zeigen eine Übereinstimmung in der Basensequenz von 13 Basen. Nach verschiedenen Modifikationen sowohl am 3` wie auch am 5`Ende konnten wir die immunstimulatorische Sequenz 5`-GUCCUCAA-3` identifizieren. Eine graduelle Veränderung der Sequenzen führte auch zu einem zunehmenden Verlust der immunstimulatorischen Fähigkeit. Bei einem Austausch von mehr als sechs Basen kam es zu einem völligen Verlust der immunologischen Wirkung. Entgegen der im Vorfeld publizierten Untersuchungen konnten wir keine Abhängigkeit der immunologischen Aktivität vom GU Anteil beobachten. Die Immunantwort die von Poly U Sequenzen hervorgerufen wurde, war im Vergleich zu siRNA9.2 und siRNA9.3 schwach. Ebenso zeigte eine höhere Anzahl an Gs oder Us oder ein höheres Verhältnis keine Veränderung der Immunantwort. Im Anschluss an diese Arbeit gab es eine Reihe weiterer Publikationen mit weiteren immunstimulatorischen Sequenzen, die über TLR7 sowie TLR8 erkannt werden (Judge et al. 2005; Sioud et al. 2005; Diebold et al. 2006).

4.4 Einfluss methodischer Aspekte auf den Nachweis der immunologischen Aktivität von siRNA

Methodische Aspekte, die zu einem falsch positiven Ergebnis führen, sind bei jedem Versuchsansatz zu berücksichtigen. In dieser Arbeit stellt sich diesbezüglich die Frage, ob die immunologische Aktivität der jeweiligen siRNA Sequenzen gegebenenfalls durch Verunreinigungen mit Einzelstrangmolekülen ausgelöst worden sein könnte, die im *Annealing* Prozess übrig geblieben waren. Aufgrund dieser Überlegung wurden die siRNA Komplexe mit RNase T1 behandelt. Diese Behandlung führte zu keiner Veränderung der immunstimulatorischen Aktivität, obwohl einzelsträngige RNAs durch diese Behandlung degradiert wurden. Somit kann eine Aktivierung durch Einzelstrang RNA ausgeschlossen werden. Um diese Möglichkeit endgültig auszuschließen, wurde eine stabile hairpin siRNA entwickelt, die die immunstimulatorische Sequenz enthielt – auch hier zeigte sich keine Veränderung der immunologischen Aktivität.

4.5 Chemische Modifikationsmöglichkeiten, die die immunologische Aktivität von siRNAs beeinflussen

Im Zusammenhang mit immunstimulatorischen Effekten von siRNAs gibt es im Moment drei große Teilbereiche, die versuchen, diesen unspezifischen Effekt zu reduzieren: die Arten der Applikation, die Sequenzspezifität und strukturelle Veränderungen.

4.5.1 Applikationsmodus der siRNA

Ein nicht zu vernachlässigender Aspekt im Rahmen der RNAi-Technologie ist die Applikationsweise. Mit Hilfe von Microarray Versuchen konnte gezeigt werden, dass sowohl Lipofectin als auch Oligofectamin die Genexpression verändert (Omidi et al. 2003). Spagnou et al. konnte zeigen, dass Lipofectamin 2000 sowohl allein als auch im Komplex mit verschiedenen siRNA Molekülen einen toxischen Effekt auf HeLa- und IGROV-1-Zellen hat (Spagnou et al. 2004). Auch die Art der Immunantwort kann vom Applikationsmodus abhängen. Judge et al. zeigte, dass die Transfektion mit Lipofectamin oder Polylysinkomplexen zur Sekretion verschiedener inflammatorischer

Zytokine führte, während die Verwendung von SNALPs oder siRNAs im Komplex mit Polyethyleimine (PEI) keine IFN-alpha Antwort auslöste (Judge et al. 2005).

Diese Beobachtung konnten wir ebenfalls in unseren Versuchen bestätigen – besonders PDC zeigten ein verstärktes Absterben in Versuchen mit kationischen Lipiden. Um einen möglichen immunstimulatorischen Effekt, der durch kationische Lipide ausgelöst werden könnte, auszuschließen, verwendeten wir in dieser Arbeit auch die Methode der Elektroporation, um siRNA in die Zielzelle zu transportieren. Hierbei zeigte sich, dass sich die Ergebnisse aus den Versuchen, die mit Lipofectamin durchgeführt wurden reproduzieren ließen. Auch hier war siRNA9.2 die Sequenz, die zur höchsten Interferonproduktion in PDC führte – was bedeutet, dass die Sequenz und nicht die Tatsache der Komplexbildung mit kationischen Lipiden ursächlich für die Immunantwort ist.

Interessanterweise scheint nicht nur die Art der Applikation eine Rolle zu spielen sondern auch welche Zielzelle für welche Methode benutzt wird. So wird die siRNA bei Verwendung von kationischen Lipiden sowohl in das zytoplasmatische als auch in das endosomale Kompartiment eingebracht. Dies spielt eine Rolle bei Zellen, die über die Rezeptoren RIG-I sowie verschiedene TLRs verfügen, da in diesem Fall beide aktiviert werden (Almofiti et al. 2003; Boussif et al. 1995).

4.5.2 Chemische Modifikationen der siRNA

Mittlerweile gibt es eine Reihe bekannter chemischer Modifikationsmöglichkeiten von siRNAs, die dazu führen, die Off-Target-Effekte zu reduzieren ohne die Fähigkeit des *silencing* zu kompromittieren. Die Modifikationen lassen sich in vier Kategorien einteilen: Backbone Modifizierungen, Modifizierung der Zuckermoleküle, Veränderungen der Basen sowie Veränderungen an den Enden der siRNA (*terminal modification*).

Auch im Rahmen dieser Arbeit stellte sich die Frage, ob eine chemische Veränderung der siRNA-Struktur zu einer Veränderung der immunologischen Wirkung führen würde. Wir benutzten daher siRNA, die im Sinne einer *locked nucleic acid (LNA)* sowohl im Sense- als auch im Antisense-Strang modifiziert worden waren. Es zeigte sich, dass Veränderungen am 3'Ende nicht jedoch am 5'Ende zu einer Hemmung der IFN-alpha Induktion durch den Sense-Strang führten. Um dies genauer zu untersuchen kreierten

wir ein Panel von insgesamt 16 verschiedenen Varianten der siRNA9.2 mit LNA-Veränderungen an verschiedenen Positionen bzw. ohne LNA-Veränderungen. Hierbei zeigte sich, dass LNA-Veränderungen am 3'Ende wie auch Veränderungen am 3'- und am 5'Ende des Sense-Stranges zu einer deutlichen Hemmung der Interferon Produktion führten. Veränderungen am Antisense-Strang jedoch führten zu keiner Veränderung der immunstimulatorischen Fähigkeit.

4.5.2.1 Backbone Modifikationen

Bei den Backbone Modifikationen handelt es sich um eine Veränderung der Ester Verbindung zwischen den einzelnen Nucleosiden. Die dabei am häufigsten verwendete Veränderung ist die sogenannte Phosphothioat Veränderung (PS Modifikation) (Eckstein et al. 2002). Hierbei wird ein Sauerstoff Atom mit einem Schwefel Atom ersetzt, um so eine PS-Gruppe zu erhalten. Dies führt zu einer erhöhten Resistenz gegenüber Nucleasen und einer Verbesserung der Pharmakokinetik (Chiu et al. 2003; Harborth et al. 2003). Diese Modifikation hat jedoch den Nachteil, dass sie aufgrund einer unspezifischen Bindung an Membran Proteine die Zytotoxizität erhöht (Harborth et al. 2003). Harborth konnte jedoch zeigen, dass die Verlagerung der PS Modifikationen an die Enden der siRNA zu einer Reduzierung des zytotoxischen Effektes führen (Harborth et al. 2003). Zwei weitere Möglichkeiten der Backbone-Modifikation sind die Boranophosphat Modifikation sowie die Verwendung von *peptid nucleic acids* (PNA). Bei Boranophosphat Modifikationen wird das Sauerstoff Atom mit einer BH_3 Gruppe ersetzt (Li et al. 2007). Hall et al. konnte zeigen, dass diese Veränderung in der Lage ist, die Stabilität der siRNA gegenüber Nucleasen um das 300fache zu erhöhen (Hall et al. 2006). Die dritte Backbone Modifikation ist der Ersatz des Zuckermoleküls durch ein Peptid – die sogenannte *peptide nucleic acid* (PNA) (Nielsen et al. 1991). Diese Veränderungen führen ebenfalls zu einer Verbesserung des *silencing* Effektes sowie der Stabilität im Serum (Potenza et al. 2008). In nachfolgenden Studien konnte unsere Gruppe zeigen, dass Phosphorothioat-modifizierte siRNA9.2 sense eine gesteigerte Immunstimulation aufwies, was sich mit großer Wahrscheinlichkeit durch die erhöhte Resistenz gegen Ribonucleasen erklären lässt.

4.5.2.2 Modifikationen der Zuckermoleküle

Die am häufigsten verwendeten Veränderungen der Zuckermoleküle befinden sich am 2´Ende des Zuckerringes. Es handelt sich meist um 2´OMe-, 2´Fluoro sowie 2´MOE-Veränderungen. Der Vorteil dieser Veränderungen ist die Erhöhung der thermischen Stabilität der siRNA (Kraynack et al. 2006). Kraynack et al. konnte auch zeigen, dass eine 2´OMe-Veränderung in Kombination mit einer PS-Modifikation einen synergistischen Effekt aufweist im Sinne einer Verbesserung der Bindungsaffinität des Sense-Stranges an die Ziel mRNA (Kraynack et al. 2006). Eine ebenfalls die Stabilität der siRNA verbessernde Zuckermodifikation ist die Verwendung eines 2´-fluoro-β-D-Arabinonukleotides (FANA) (Watts et al 2007). Gleichzeitig führt der Einbau von 2´OMe-Modifikationen in immunstimulatorischen siRNAs zu einer Hemmung der Aktivierung von TLR7 und TLR8 (Judge et al. 2006). Die Vermutung hierbei ist, dass 2´OMe-Modifikationen die Bindung der RNA an TLR7 und TLR8 inhibieren (Robbins et al. 2007).

Die in dieser Arbeit verwendete Veränderung des Zuckermoleküls – die *locked nucleic acid* Modifikation (LNA) ist eine Veränderung des Ribose Rings an der 2´ und 4´ Position im Sinne einer Verbindung durch eine Methylenbrücke. Der Furanose Ring ist somit in der 3´ Konformation fixiert und spiegelt somit ein Standard-RNA-Molekül wieder. Dies verbessert die Struktur des Phosphodiester Backbones und führt zu einer engeren Bindung des Sense-Stranges an die Ziel mRNA (Bondensgaard et al. 2000). Wie auch wir in dieser Arbeit zeigen konnten, nimmt die Aktivität des Sense-Stranges mit steigender Anzahl der LNA-Modifikationen ab. Elmen et al. zeigte, dass die Aktivität der siRNA verloren geht, wenn LNA Modifikationen an Position 10, 12 und 14 des Sense-Stranges eingebaut (Elmen et al. 2005). Dieser Funktionsverlust könnte aufgrund der Zunahme in der thermischen Stabilität mit jeder LNA-Modifikation und somit einer erschwerten Auflösung des siRNA Duplexes einhergehen (Elmen et al. 2005).

4.5.2.3 Sequenzmodifikationen der siRNA

Wie wir in dieser Arbeit zeigen, gibt es siRNA Sequenzen, die eine immunstimulatorische Wirkung haben und somit einen immunstimulatorischen Effekt auslösen. Eine Frage, die sich im Anschluss an die Ergebnisse dieser Arbeit stellte war, ob es Veränderungsmöglichkeiten innerhalb der siRNA-Sequenzen gibt, die eine Veränderung der immunstimulatorischen Aktivität zu Folge haben. Hornung et al. konnte in diesem Zusammenhang zeigen, dass beispielsweise die Aktivierung von RIG-I unabhängig von der dsRNA-Sequenz ist. Mit zunehmender Länge der dsRNA nimmt die Aktivierung zu, wird aber von Überhängen am 3'Ende wieder gehemmt (Hornung et al. 2006). Kato et al. konnte zeigen, dass sowohl RIG-I als auch MDA5 sensitiv gegenüber der Länge, Struktur und Phosphorylierung waren (Kato et al. 2008).

Gleichzeitig führt das Anfügen von Triphosphaten am 5'Ende zu einer Aktivierung von RIG-I wohingegen MDA5 von langer dsRNA aktiviert wird, wobei Triphosphate am 5'Ende nicht notwendig sind (Hornung et al. 2006). Eberle et al. konnte auch zeigen, dass die Substitution von Uridin mit 2'Desoxyuridin oder Thymidin zu einer Verringerung der IFN Produktion in PBMC führte (Eberle et al. 2008).

4.6 Von Bench to bedside

Eine der Schwierigkeiten des Einsatzes von siRNA im therapeutischen Bereich ergibt sich durch die Schwierigkeit der Applikation. siRNAs sind um ein Vielfaches größer als die sogenannten *small molecule drugs*, werden von Enzymen im Blut leicht abgebaut und sind aufgrund ihrer negativen Oberflächenladung nur schwer in der Lage, die Zellmembran zu passieren (Singh et al. 2009; Whitehead et al. 2009). Diese Problematik kann umgangen werden, wenn die siRNA direkt ins Zielorgan eingebracht werden kann. Dies war bisher am Auge zur Behandlung der Makuladegeneration (Shen et al. 2006) möglich und wurde erfolgreich im Bereich der Lunge zur Behandlung von Infektion mit *respiratory syncytial virus* angewendet (DeVincenzo et al. 2008). Bei vielen Krankheitsbildern ist jedoch eine systemische Applikation nötig, um einen Therapieerfolg erzielen zu können. Systemisch applizierte siRNAs müssen eine Reihe von Hürden überwinden bevor sie in die Zielzelle gelangen. Die erste Hürde stellt bereits die Filtration durch die Niere dar, die den Komplex aus dem Blut filtern könnte. Anschließend könnte es zu einer Phagozytose durch Makrophagen kommen. Sollte die

siRNA diese beiden Hürden überwunden haben, müsste sie die Endothelmembran der Gefäße überwinden, um zur Zielzelle zu gelangen. Um letzteres erreichen zu können, müsste das Transportpartikel, das die negativ geladene siRNA enthält, eine positive Oberfläche aufweisen. Da humanes Serum eine negative Ladung aufweist, stellt dies eine weitere Hürde dar (Auguste et al. 2008). Dies kann durch die Verwendung von pegylierten siRNA Partikeln verbessert werden, da es so zu einer Vergrößerung der Oberfläche und damit Verhinderung der Aggregation kommt (Auguste et al. 2008). Am vielversprechendsten sind jedoch Ansätze, die kationische Lipide als Vehikel nutzen, um die siRNA-Moleküle zu verpacken. Die Reagenzien entsprechen im Wesentlichen dem von uns benutztem Lipofectamin 2000, sind jedoch auf erhöhte Serumstabilität und geringe Toxizität optimiert. Insbesondere die SNALP-Technologie der Firma Tekmira scheint hier eine Vorreiterrolle in der klinischen Anwendung zu nehmen.

4.6.1 Immunstimulatorische siRNA – als Therapie gegen virale Infektionen?

Das angeborene Immunsystem ist der erste Verteidigungsmechanismus des Körpers gegenüber eindringenden Viren und Pathogenen. Interferon spielt hierbei eine zentrale Rolle in der Steuerung der Immunantwort durch die Koordinierung der Expression antiviraler Gene (Sadler et al. 2008). Aufgrund dieser Tatsache spielt der Einsatz von Interferon eine wichtige Rolle in der Behandlung von Virusinfektionen wie Hepatitis B oder C (Webster et al. 2009). Es wird angenommen, dass weltweit zwischen 150-200 Millionen Menschen mit Hepatitis C infiziert sind. Hepatitis C ist in einem Viertel der Fälle die Ursache einer akuten Hepatitis, in 60-70 Prozent der Fälle ist der Erreger der Grund für eine chronische Hepatitis und in der Hälfte der Fälle der Auslöser für Leberzirrhose, Leberversagen und schließlich hepatozelluläres Karzinom (Tiemann et al. 2009). Diese Zahlen verdeutlichen, welche weitreichenden Konsequenzen eine effektive Behandlung der Viruserkrankungen mit sich bringen würde.

Der Einsatz RNAi basierten Therapien in der Behandlung von chronischen viralen Infektionen wie HIV und Hepatitis C wird aktuell im Rahmen mehrerer Studien untersucht und die ersten Publikationen hierzu zeichnen ein vielversprechendes Bild (Arbuthnot et al. 2007; Watanabe et al. 2007; Berkhout et al. 2009). Zwei Gruppen konnten den antiviralen Effekt, der durch die sequenzspezifische Aktivierung von TLR7 mittels siRNA entsteht bereits in der Influenza Infektion im Mausmodell zeigen (Robbins et al. 2008; Nguyen et al. 2009).

Die Kombination aus dem *silencing* bestimmter Gene mit Hilfe von RNAi, der gleichzeitigen Aktivierung der Interferonproduktion und der Rekrutierung von TLR7/8 lässt annehmen, dass dies eine Verstärkung der therapeutischen Wirkung mit sich bringt - drei Funktionen die durch immunstimulatorische siRNA geleistet werden. Dieses Zusammenspiel führt letzten Endes, wie von Watanabe et al. gezeigt, zu einer stark verbesserten Elimination des Virus (Watanabe et al. 2007). Anz et al konnte in einer kürzlich erschienen Arbeit zeigen, dass immunstimulatorische siRNA außerdem in der Lage ist, die durch regulatorische T-Zellen hervorgerufene Immunsuppression aufzuheben (Anz et al. 2010).

4.6.2 Immunstimulatorische siRNA – als Therapie gegen cancer immunoediting?

Im Rahmen der Tumorentstehung kommt es zu einem Prozess der als *cancer immunoediting* bezeichnet wird. Hierunter versteht man jene Geschehnisse, die dazu führen, dass die initial funktionierende Elimination von neu entstandenen Tumorzellen durch das Immunsystem so verändert wird, dass dieses nicht mehr in der Lage ist, die defekten Zellen zu erkennen und zu vernichten. Die Konsequenz hieraus ist die Entwicklung einer klinisch relevanten Tumorerkrankung des Individuums.

Wie in dieser Arbeit gezeigt, gibt es siRNA-Sequenzen, die in der Lage sind eine Immunantwort im Sinne einer Interferonantwort auszulösen. In den vergangenen Jahren hat sich gezeigt, dass Interferon neben seiner antiviralen Eigenschaften auch eine zentrale Rolle in der Interaktion zwischen Tumorzellen und Immunzellen hat (Bui et al. 2007). Aufgrund der Komplexität der Tumorgenese sind Therapien nötig, die in der Lage sind, zentrale Funktionen innerhalb der Tumorzelle zu hemmen und gleichzeitig das Immunsystem aktivieren, um so der Entwicklung eines Tumorescape-Mechanismus vorzubeugen.

Poeck et al. konnten in ihrer Arbeit mit Melanomzellen zeigen, dass es möglich ist, eine gleichzeitige Aktivierung des Immunsystems verbunden mit der Ausschaltung zentraler Gene zu erreichen (Poeck et al. 2008). Dies erfolgte in jenem Fall über die Aktivierung der zytosolischen Helicase *retinoic acid induced protein 1* (Rig-I). Das gleiche Funktionsprinzip ist auch möglich unter Verwendung der in dieser Arbeit beschriebenen Aktivierung von TLR7 durch immunstimulatorische siRNA-Sequenzen (Schlee et al. 2006). So zeigten Bourquin et al., dass immunstimulatorische siRNA in der Lage ist, eine Aktivierung von natürlichen Killerzellen auszulösen mit subsequenter Hemmung des Tumorwachstums (Bourquin et al. 2009).

5. Zusammenfassung

Hintergrund

Die Fähigkeit mit Hilfe von *short interfering RNA* (siRNA) die Genexpression zu modulieren und somit die Entstehung von Proteinen zu unterdrücken ist eine der bedeutendsten Entdeckungen der letzten zwanzig Jahre. siRNA wird hierbei im Rahmen der RNA-Interferenz benutzt, um den unerwünschten Effekt der Interferon Induktion zu umgehen, der bei der Benutzung von langer doppelsträngiger RNA ausgelöst wird. Die Tatsache, dass der siRNA-Mechanismus auch in vivo funktioniert, wurde 2002 von McCaffrey und Kollegen in Mäusen gezeigt (McCaffrey et al. 2002). Nur sechs Jahre nach der Entdeckung von RNAi wurde bereits die erste klinische Studie im humanen System gestartet – als Behandlungsversuch der altersbedingten Makuladegeneration. Die Tatsache, dass siRNAs die Genexpression verändern können und gleichzeitig im humanen System eingesetzt werden können, eröffnet somit völlig neue therapeutische Möglichkeiten.

Fragestellung

Das initiale Ziel dieser Arbeit war es, die neue Technologie der RNA-Interferenz zu nutzen, um einzelne Zielgene in humanen PDCs auszuschalten. Als „proof of concept“ Target sollte der Rezeptor TLR9 in seiner Expression und somit seiner Funktion als CpG-Rezeptor ausgeschaltet werden. Hierzu wurden vier unabhängige siRNA-Moleküle gegen die *coding region* der humanen TLR9 mRNA entwickelt.

Ergebnisse

Im Rahmen dieser Arbeit konnten wir zeigen, dass plasmazytoide dendritische Zellen entgegen der bisherigen Lehrmeinung in der Lage sind, siRNA-Sequenzen zu erkennen. Diese Erkennung ist unabhängig vom GU-Anteil der siRNA-Sequenz und führt zur Ausschüttung von Interferon-alpha in einem Ausmaß, wie sie bisher nur durch den potentesten bekannten Stimulus (CpG-ODN) erreicht wurde.

Die in einem zweiten Schritt erfolgte Lokalisierung des immunstimulatorischen Motivs auf dem Sense-Strang erlaubte eine Aufschlüsselung der immunstimulatorischen Kapazität der siRNA bei gleichzeitiger Untersuchung des *silencing*.

Die Injektion der mit kationischen Lipiden komplexierten immunstimulatorischen siRNA in Mäuse zeigte eine systemische Immunantwort in einer Höhe, die sonst nur durch die Behandlung mit dem TLR9-Liganden CpG erreicht wird. Dabei kam es zur Induktion von IFN-alpha im Serum sowie zur Aktivierung von T-Zellen und dendritischen Zellen in der Mausmilz. In TLR7-Knockout Mäusen fehlte diese Immunantwort.

Schlussfolgerung

Aufgrund dieser Untersuchung muss eine TLR7-spezifische Auslösung einer Immunantwort durch siRNA angenommen werden. Diese zusätzliche biologische Aktivität von siRNAs hat weitreichende Konsequenzen für den klinischen Einsatz im humanen System, sowohl im Bereich der Behandlung chronischer Viruserkrankungen wie HIV oder Hepatitis B und C, als auch im Bereich der Behandlung von Tumoren.

6. Literaturverzeichnis

Ahlquist P. RNA-dependent RNA polymerases, viruses, and RNA silencing. *Science* 2002;296:1270-3.

Akira S, Takeda K. Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol* 2004;4:499-511.

Alexopoulou L, Holt AC, Medzhitov R, Flavell RA. Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3. *Nature* 2001;413:732-8.

Almofti MR, Harashima H, Shinohara Y, Almofti A, Baba Y, Kiwada H. Cationic liposome-mediated gene delivery: biophysical study and mechanism of internalization. *Arch Biochem Biophys* 2003;410:246-53.

Anz D, Koelzer VH, Moder S, et al. Immunostimulatory RNA blocks suppression by regulatory T cells. *J Immunol*;184:939-46.

Arbuthnot P, Longshaw V, Naidoo T, Weinberg MS. Opportunities for treating chronic hepatitis B and C virus infection using RNA interference. *J Viral Hepat* 2007;14:447-59.

Asselin-Paturel C, Boonstra A, Dalod M, et al. Mouse type I IFN-producing cells are immature APCs with plasmacytoid morphology. *Nat Immunol* 2001;2:1144-50.

Auguste DT, Furman K, Wong A, et al. Triggered release of siRNA from poly(ethylene glycol)-protected, pH-dependent liposomes. *J Control Release* 2008;130:266-74.

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

Barrat FJ, Meeker T, Gregorio J, et al. Nucleic acids of mammalian origin can act as endogenous ligands for Toll-like receptors and may promote systemic lupus erythematosus. *J Exp Med* 2005;202:1131-9.

Bartlett DW, Su H, Hildebrandt IJ, Weber WA, Davis ME. Impact of tumor-specific targeting on the biodistribution and efficacy of siRNA nanoparticles measured by multimodality in vivo imaging. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007;104:15549-54.

Barton GM, Kagan JC, Medzhitov R. Intracellular localization of Toll-like receptor 9 prevents recognition of self DNA but facilitates access to viral DNA. *Nat Immunol* 2006;7:49-56.

Bauer S, Kirschning CJ, Hacker H, et al. Human TLR9 confers responsiveness to bacterial DNA via species-specific CpG motif recognition. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98:9237-42.

Berkhout B, ter Brake O. Towards a durable RNAi gene therapy for HIV-AIDS. *Expert Opin Biol Ther* 2009;9:161-70.

Bernstein E, Caudy AA, Hammond SM, Hannon GJ. Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature* 2001;409:363-6.

Bitko V, Barik S. Phenotypic silencing of cytoplasmic genes using sequence-specific double-stranded short interfering RNA and its application in the reverse genetics of wild type negative-strand RNA viruses. *BMC Microbiol* 2001;1:34.

Bitko V, Musiyenko A, Shulyayeva O, Barik S. Inhibition of respiratory viruses by nasally administered siRNA. *Nat Med* 2005;11:50-5.

Bondensgaard K, Petersen M, Singh SK, et al. Structural studies of LNA:RNA duplexes by NMR: conformations and implications for RNase H activity. *Chemistry* 2000;6:2687-95.

Bourquin C, Schmidt L, Lanz AL, et al. Immunostimulatory RNA oligonucleotides induce an effective antitumoral NK cell response through the TLR7. *J Immunol* 2009;183:6078-86.

Boussif O, Lezoualc'h F, Zanta MA, et al. A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo: polyethylenimine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995;92:7297-301.

Bowie AG, Fitzgerald KA. RIG-I: tri-ning to discriminate between self and non-self RNA. *Trends Immunol* 2007;28:147-50.

Bowie AG, Unterholzner L. Viral evasion and subversion of pattern-recognition receptor signalling. *Nat Rev Immunol* 2008;8:911-22.

Braasch DA, Jensen S, Liu Y, et al. RNA interference in mammalian cells by chemically-modified RNA. *Biochemistry* 2003;42:7967-75.

Brandenburg B, Zhuang X. Virus trafficking - learning from single-virus tracking. *Nat Rev Microbiol* 2007;5:197-208.

Brummelkamp TR, Bernards R, Agami R. Stable suppression of tumorigenicity by virus-mediated RNA interference. *Cancer Cell* 2002;2:243-7.

Bui JD, Schreiber RD. Cancer immunosurveillance, immunoediting and inflammation: independent or interdependent processes? *Curr Opin Immunol* 2007;19:203-8.

Castanotto D, Rossi JJ. The promises and pitfalls of RNA-interference-based therapeutics. *Nature* 2009;457:426-33.

Caux C, Massacrier C, Vanbervliet B, et al. CD34+ hematopoietic progenitors from human cord blood differentiate along two independent dendritic cell pathways in response to granulocyte-macrophage colony-stimulating factor plus tumor necrosis factor alpha: II. Functional analysis. *Blood* 1997;90:1458-70.

Cella M, Jarrossay D, Facchetti F, et al. Plasmacytoid monocytes migrate to inflamed lymph nodes and produce large amounts of type I interferon. *Nat Med* 1999;5:919-23.

Cella M, Salio M, Sakakibara Y, Langen H, Julkunen I, Lanzavecchia A. Maturation, activation, and protection of dendritic cells induced by double-stranded RNA. *J Exp Med* 1999;189:821-9.

Chapman EJ, Carrington JC. Specialization and evolution of endogenous small RNA pathways. *Nat Rev Genet* 2007;8:884-96.

Chehimi J, Starr SE, Kawashima H, et al. Dendritic cells and IFN-alpha-producing cells are two functionally distinct non-B, non-monocytic HLA-DR+ cell subsets in human peripheral blood. *Immunology* 1989;68:486-90.

Chiu YL, Rana TM. siRNA function in RNAi: a chemical modification analysis. *RNA* 2003;9:1034-48.

Corcoran L, Ferrero I, Vremec D, et al. The lymphoid past of mouse plasmacytoid cells and thymic dendritic cells. *J Immunol* 2003;170:4926-32.

Crozat K, Beutler B. TLR7: A new sensor of viral infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101:6835-6.

Deng L, Wang C, Spencer E, et al. Activation of the I κ B kinase complex by TRAF6 requires a dimeric ubiquitin-conjugating enzyme complex and a unique polyubiquitin chain. *Cell* 2000;103:351-61.

DeVincenzo JP. RNA interference strategies as therapy for respiratory viral infections. *Pediatr Infect Dis J* 2008;27:S118-22.

Diebold SS. Recognition of viral single-stranded RNA by Toll-like receptors. *Adv Drug Deliv Rev* 2008;60:813-23.

Diebold SS, Kaisho T, Hemmi H, Akira S, Reis e Sousa C. Innate antiviral responses by means of TLR7-mediated recognition of single-stranded RNA. *Science* 2004;303:1529-31.

Dowler T, Bergeron D, Tedeschi AL, Paquet L, Ferrari N, Damha MJ. Improvements in siRNA properties mediated by 2'-deoxy-2'-fluoro-beta-D-arabinonucleic acid (FANA). *Nucleic Acids Res* 2006;34:1669-75.

Dykhhoorn DM, Lieberman J. Running interference: prospects and obstacles to using small interfering RNAs as small molecule drugs. *Annu Rev Biomed Eng* 2006;8:377-402.

Dzionic A, Fuchs A, Schmidt P, et al. BDCA-2, BDCA-3, and BDCA-4: three markers for distinct subsets of dendritic cells in human peripheral blood. *J Immunol* 2000;165:6037-46.

Dzionic A, Inagaki Y, Okawa K, et al. Plasmacytoid dendritic cells: from specific surface markers to specific cellular functions. *Hum Immunol* 2002;63:1133-48.

Dzionic A, Sohma Y, Nagafune J, et al. BDCA-2, a novel plasmacytoid dendritic cell-specific type II C-type lectin, mediates antigen capture and is a potent inhibitor of interferon alpha/beta induction. *J Exp Med* 2001;194:1823-34.

Eckstein F. Developments in RNA chemistry, a personal view. *Biochimie* 2002;84:841-8.

Elbashir SM, Harborth J, Lendeckel W, Yalcin A, Weber K, Tuschl T. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* 2001;411:494-8.

Elbashir SM, Lendeckel W, Tuschl T. RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs. *Genes Dev* 2001;15:188-200.

Elbashir SM, Martinez J, Patkaniowska A, Lendeckel W, Tuschl T. Functional anatomy of siRNAs for mediating efficient RNAi in *Drosophila melanogaster* embryo lysate. *EMBO J* 2001;20:6877-88.

Elmen J, Thonberg H, Ljungberg K, et al. Locked nucleic acid (LNA) mediated improvements in siRNA stability and functionality. *Nucleic Acids Res* 2005;33:439-47.

Facchetti F, de Wolf-Peeters C, Mason DY, Pulford K, van den Oord JJ, Desmet VJ. Plasmacytoid T cells. Immunohistochemical evidence for their monocyte/macrophage origin. *Am J Pathol* 1988;133:15-21.

Fanning SL, George TC, Feng D, et al. Receptor cross-linking on human plasmacytoid dendritic cells leads to the regulation of IFN-alpha production. *J Immunol* 2006;177:5829-39.

Feldman SB, Ferraro M, Zheng HM, Patel N, Gould-Fogerite S, Fitzgerald-Bocarsly P. Viral induction of low frequency interferon-alpha producing cells. *Virology* 1994;204:1-7.

Fire A, Albertson D, Harrison SW, Moerman DG. Production of antisense RNA leads to effective and specific inhibition of gene expression in *C. elegans* muscle. *Development* 1991;113:503-14.

Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 1998;391:806-11.

Fitzgerald KA, Rowe DC, Barnes BJ, et al. LPS-TLR4 signaling to IRF-3/7 and NF- κ B involves the toll adapters TRAM and TRIF. *J Exp Med* 2003;198:1043-55.

Fitzgerald-Bocarsly P, Dai J, Singh S. Plasmacytoid dendritic cells and type I IFN: 50 years of convergent history. *Cytokine Growth Factor Rev* 2008;19:3-19.

Fitzgerald-Bocarsly P, Feldman M, Curl S, Schnell J, Denny T. Positively selected Leu-11a (CD16+) cells require the presence of accessory cells or factors for the lysis of herpes simplex virus-infected fibroblasts but not herpes simplex virus-infected Raji. *J Immunol* 1989;143:1318-26.

Geijtenbeek TB, van Vliet SJ, Engering A, t Hart BA, van Kooyk Y. Self- and nonself-recognition by C-type lectins on dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 2004;22:33-54.

Grouard G, Rissoan MC, Filgueira L, Durand I, Banchereau J, Liu YJ. The enigmatic plasmacytoid T cells develop into dendritic cells with interleukin (IL)-3 and CD40-ligand. *J Exp Med* 1997;185:1101-11.

Guo S, Kemphues KJ. *par-1*, a gene required for establishing polarity in *C. elegans* embryos, encodes a putative Ser/Thr kinase that is asymmetrically distributed. *Cell* 1995;81:611-20.

Hall AH, Wan J, Spesock A, Sergueeva Z, Shaw BR, Alexander KA. High potency silencing by single-stranded boranophosphate siRNA. *Nucleic Acids Res* 2006;34:2773-81.

Hammond SM, Bernstein E, Beach D, Hannon GJ. An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells. *Nature* 2000;404:293-6.

Harborth J, Elbashir SM, Vandeburgh K, et al. Sequence, chemical, and structural variation of small interfering RNAs and short hairpin RNAs and the effect on mammalian gene silencing. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev* 2003;13:83-105.

Harland R, Weintraub H. Translation of mRNA injected into *Xenopus* oocytes is specifically inhibited by antisense RNA. *J Cell Biol* 1985;101:1094-9.

Hartmann G, Krieg AM. Mechanism and function of a newly identified CpG DNA motif in human primary B cells. *J Immunol* 2000;164:944-53.

Hartmann G, Weeratna RD, Ballas ZK, et al. Delineation of a CpG phosphorothioate oligodeoxynucleotide for activating primate immune responses in vitro and in vivo. *J Immunol* 2000;164:1617-24.

Hartmann G, Weiner GJ, Krieg AM. CpG DNA: a potent signal for growth, activation, and maturation of human dendritic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96:9305-10.

Hashimoto C, Hudson KL, Anderson KV. The Toll gene of *Drosophila*, required for dorsal-ventral embryonic polarity, appears to encode a transmembrane protein. *Cell* 1988;52:269-79.

Heil F, Ahmad-Nejad P, Hemmi H, et al. The Toll-like receptor 7 (TLR7)-specific stimulus loxoribine uncovers a strong relationship within the TLR7, 8 and 9 subfamily. *Eur J Immunol* 2003;33:2987-97.

Heil F, Hemmi H, Hochrein H, et al. Species-specific recognition of single-stranded RNA via toll-like receptor 7 and 8. *Science* 2004;303:1526-9.

Hemmi H, Takeuchi O, Kawai T, et al. A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature* 2000;408:740-5.

Hochrein H, Schlatter B, O'Keeffe M, et al. Herpes simplex virus type-1 induces IFN- α production via Toll-like receptor 9-dependent and -independent pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101:11416-21.

Hoebe K, Du X, Georgel P, et al. Identification of Lps2 as a key transducer of MyD88-independent TIR signalling. *Nature* 2003;424:743-8.

Honda K, Yanai H, Mizutani T, et al. Role of a transductional-transcriptional processor complex involving MyD88 and IRF-7 in Toll-like receptor signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101:15416-21.

Honda K, Yanai H, Negishi H, et al. IRF-7 is the master regulator of type-I interferon-dependent immune responses. *Nature* 2005;434:772-7.

Hornung V, Rothenfusser S, Britsch S, et al. Quantitative expression of toll-like receptor 1-10 mRNA in cellular subsets of human peripheral blood mononuclear cells and sensitivity to CpG oligodeoxynucleotides. *J Immunol* 2002;168:4531-7.

Hutvagner G, Simard MJ. Argonaute proteins: key players in RNA silencing. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2008;9:22-32.

Hutvagner G, Zamore PD. RNAi: nature abhors a double-strand. *Curr Opin Genet Dev* 2002;12:225-32.

Isaacs A, Lindenmann J. Virus interference. I. The interferon. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 1957;147:258-67.

Ito T, Kanzler H, Duramad O, Cao W, Liu YJ. Specialization, kinetics, and repertoire of type 1 interferon responses by human plasmacytoid dendritic cells. *Blood* 2006;107:2423-31.

Izaguirre A, Barnes BJ, Amrute S, et al. Comparative analysis of IRF and IFN- α expression in human plasmacytoid and monocyte-derived dendritic cells. *J Leukoc Biol* 2003;74:1125-38.

Izant JG, Weintraub H. Inhibition of thymidine kinase gene expression by anti-sense RNA: a molecular approach to genetic analysis. *Cell* 1984;36:1007-15.

Jackson AL, Linsley PS. Recognizing and avoiding siRNA off-target effects for target identification and therapeutic application. *Nat Rev Drug Discov*;9:57-67.

Janeway CA, Jr. The immune system evolved to discriminate infectious nonself from noninfectious self. *Immunol Today* 1992;13:11-6.

Jego G, Palucka AK, Blanck JP, Chalouni C, Pascual V, Banchereau J. Plasmacytoid dendritic cells induce plasma cell differentiation through type I interferon and interleukin 6. *Immunity* 2003;19:225-34.

Jinek M, Doudna JA. A three-dimensional view of the molecular machinery of RNA interference. *Nature* 2009;457:405-12.

Jonuleit H, Schmitt E, Schuler G, Knop J, Enk AH. Induction of interleukin 10-producing, nonproliferating CD4(+) T cells with regulatory properties by repetitive stimulation with allogeneic immature human dendritic cells. *J Exp Med* 2000;192:1213-22.

Judge A, MacLachlan I. Overcoming the innate immune response to small interfering RNA. *Hum Gene Ther* 2008;19:111-24.

Judge AD, Bola G, Lee AC, MacLachlan I. Design of noninflammatory synthetic siRNA mediating potent gene silencing in vivo. *Mol Ther* 2006;13:494-505.

Judge AD, Sood V, Shaw JR, Fang D, McClintock K, MacLachlan I. Sequence-dependent stimulation of the mammalian innate immune response by synthetic siRNA. *Nat Biotechnol* 2005;23:457-62.

- Kariko K, Bhuyan P, Capodici J, Weissman D. Small interfering RNAs mediate sequence-independent gene suppression and induce immune activation by signaling through toll-like receptor 3. *J Immunol* 2004;172:6545-9.
- Kato H, Sato S, Yoneyama M, et al. Cell type-specific involvement of RIG-I in antiviral response. *Immunity* 2005;23:19-28.
- Kato H, Takeuchi O, Mikamo-Satoh E, et al. Length-dependent recognition of double-stranded ribonucleic acids by retinoic acid-inducible gene-I and melanoma differentiation-associated gene 5. *J Exp Med* 2008;205:1601-10.
- Kaur H, Arora A, Wengel J, Maiti S. Thermodynamic, counterion, and hydration effects for the incorporation of locked nucleic acid nucleotides into DNA duplexes. *Biochemistry* 2006;45:7347-55.
- Kaur H, Wengel J, Maiti S. LNA-modified oligonucleotides effectively drive intramolecular-stable hairpin to intermolecular-duplex state. *Biochem Biophys Res Commun* 2007;352:118-22.
- Kawai T, Takeuchi O, Fujita T, et al. Lipopolysaccharide stimulates the MyD88-independent pathway and results in activation of IFN-regulatory factor 3 and the expression of a subset of lipopolysaccharide-inducible genes. *J Immunol* 2001;167:5887-94.
- Kim DH, Villeneuve LM, Morris KV, Rossi JJ. Argonaute-1 directs siRNA-mediated transcriptional gene silencing in human cells. *Nat Struct Mol Biol* 2006;13:793-7.
- Kleinman ME, Yamada K, Takeda A, et al. Sequence- and target-independent angiogenesis suppression by siRNA via TLR3. *Nature* 2008;452:591-7.
- Kopp EB, Medzhitov R. The Toll-receptor family and control of innate immunity. *Curr Opin Immunol* 1999;11:13-8.
- Kraynack BA, Baker BF. Small interfering RNAs containing full 2'-O-methylribonucleotide-modified sense strands display Argonaute2/eIF2C2-dependent activity. *RNA* 2006;12:163-76.
- Krieg AM. CpG motifs in bacterial DNA and their immune effects. *Annu Rev Immunol* 2002;20:709-60.
- Krieg AM, Yi AK, Matson S, et al. CpG motifs in bacterial DNA trigger direct B-cell activation. *Nature* 1995;374:546-9.
- Krug A, Luker GD, Barchet W, Leib DA, Akira S, Colonna M. Herpes simplex virus type 1 activates murine natural interferon-producing cells through toll-like receptor 9. *Blood* 2004;103:1433-7.

Krug A, Rothenfusser S, Hornung V, et al. Identification of CpG oligonucleotide sequences with high induction of IFN-alpha/beta in plasmacytoid dendritic cells. *Eur J Immunol* 2001;31:2154-63.

Krug A, Towarowski A, Britsch S, et al. Toll-like receptor expression reveals CpG DNA as a unique microbial stimulus for plasmacytoid dendritic cells which synergizes with CD40 ligand to induce high amounts of IL-12. *Eur J Immunol* 2001;31:3026-37.

Kumar H, Kawai T, Akira S. Toll-like receptors and innate immunity. *Biochem Biophys Res Commun* 2009;388:621-5.

Kurt-Jones EA, Popova L, Kwinn L, et al. Pattern recognition receptors TLR4 and CD14 mediate response to respiratory syncytial virus. *Nat Immunol* 2000;1:398-401.

Latz E, Schoenemeyer A, Visintin A, et al. TLR9 signals after translocating from the ER to CpG DNA in the lysosome. *Nat Immunol* 2004;5:190-8.

Lee HK, Iwasaki A. Autophagy and antiviral immunity. *Curr Opin Immunol* 2008;20:23-9.

Lee HK, Lund JM, Ramanathan B, Mizushima N, Iwasaki A. Autophagy-dependent viral recognition by plasmacytoid dendritic cells. *Science* 2007;315:1398-401.

Lee J, Chuang TH, Redecke V, et al. Molecular basis for the immunostimulatory activity of guanine nucleoside analogs: activation of Toll-like receptor 7. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100:6646-51.

Lemaitre B, Nicolas E, Michaut L, Reichhart JM, Hoffmann JA. The dorsoventral regulatory gene cassette *spatzle/Toll/cactus* controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell* 1996;86:973-83.

Lennert K, Remmele W. [Karyometric research on lymph node cells in man. I. Germinoblasts, lymphoblasts & lymphocytes.]. *Acta Haematol* 1958;19:99-113.

Li P, Sergueeva ZA, Dobrikov M, Shaw BR. Nucleoside and oligonucleoside boranophosphates: chemistry and properties. *Chem Rev* 2007;107:4746-96.

Lima WF, Wu H, Nichols JG, Sun H, Murray HM, Crooke ST. Binding and cleavage specificities of human Argonaute2. *J Biol Chem* 2009;284:26017-28.

Lorenz C, Hadwiger P, John M, Vornlocher HP, Unverzagt C. Steroid and lipid conjugates of siRNAs to enhance cellular uptake and gene silencing in liver cells. *Bioorg Med Chem Lett* 2004;14:4975-7.

- Lund J, Sato A, Akira S, Medzhitov R, Iwasaki A. Toll-like receptor 9-mediated recognition of Herpes simplex virus-2 by plasmacytoid dendritic cells. *J Exp Med* 2003;198:513-20.
- Marsh M, Pelchen-Matthews A. Endocytosis in viral replication. *Traffic* 2000;1:525-32.
- Martin MU, Wesche H. Summary and comparison of the signaling mechanisms of the Toll/interleukin-1 receptor family. *Biochim Biophys Acta* 2002;1592:265-80.
- Matzke MA, Birchler JA. RNAi-mediated pathways in the nucleus. *Nat Rev Genet* 2005;6:24-35.
- McCaffrey AP, Meuse L, Pham TT, Conklin DS, Hannon GJ, Kay MA. RNA interference in adult mice. *Nature* 2002;418:38-9.
- Medzhitov R, Janeway CA, Jr. Innate immunity: the virtues of a nonclonal system of recognition. *Cell* 1997;91:295-8.
- Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Janeway CA, Jr. A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* 1997;388:394-7.
- Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Kopp E, et al. MyD88 is an adaptor protein in the hToll/IL-1 receptor family signaling pathways. *Mol Cell* 1998;2:253-8.
- Melchjorsen J, Jensen SB, Malmgaard L, et al. Activation of innate defense against a paramyxovirus is mediated by RIG-I and TLR7 and TLR8 in a cell-type-specific manner. *J Virol* 2005;79:12944-51.
- Melton DA. Injected anti-sense RNAs specifically block messenger RNA translation in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1985;82:144-8.
- Minks MA, West DK, Benveniste S, Baglioni C. Structural requirements of double-stranded RNA for the activation of 2',5'-oligo(A) polymerase and protein kinase of interferon-treated HeLa cells. *J Biol Chem* 1979;254:10180-3.
- Moazed D. Small RNAs in transcriptional gene silencing and genome defence. *Nature* 2009;457:413-20.
- Morris KV, Chan SW, Jacobsen SE, Looney DJ. Small interfering RNA-induced transcriptional gene silencing in human cells. *Science* 2004;305:1289-92.
- Morrissey DV, Blanchard K, Shaw L, et al. Activity of stabilized short interfering RNA in a mouse model of hepatitis B virus replication. *Hepatology* 2005;41:1349-56.
- Morrissey DV, Lockridge JA, Shaw L, et al. Potent and persistent in vivo anti-HBV activity of chemically modified siRNAs. *Nat Biotechnol* 2005;23:1002-7.

Nguyen DN, Chen SC, Lu J, et al. Drug delivery-mediated control of RNA immunostimulation. *Mol Ther* 2009;17:1555-62.

Nielsen PE, Egholm M, Berg RH, Buchardt O. Sequence-selective recognition of DNA by strand displacement with a thymine-substituted polyamide. *Science* 1991;254:1497-500.

Ninomiya-Tsuji J, Kishimoto K, Hiyama A, Inoue J, Cao Z, Matsumoto K. The kinase TAK1 can activate the NIK-I kappaB as well as the MAP kinase cascade in the IL-1 signalling pathway. *Nature* 1999;398:252-6.

Oates AC, Bruce AE, Ho RK. Too much interference: injection of double-stranded RNA has nonspecific effects in the zebrafish embryo. *Dev Biol* 2000;224:20-8.

Olweus J, BitMansour A, Warnke R, et al. Dendritic cell ontogeny: a human dendritic cell lineage of myeloid origin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997;94:12551-6.

Omidi Y, Hollins AJ, Benboubetra M, Drayton R, Benter IF, Akhtar S. Toxicogenomics of non-viral vectors for gene therapy: a microarray study of lipofectin- and oligofectamine-induced gene expression changes in human epithelial cells. *J Drug Target* 2003;11:311-23.

Oshiumi H, Matsumoto M, Funami K, Akazawa T, Seya T. TICAM-1, an adaptor molecule that participates in Toll-like receptor 3-mediated interferon-beta induction. *Nat Immunol* 2003;4:161-7.

Palmer P, Charley B, Rombaut B, Daeron M, Lebon P. Antibody-dependent induction of type I interferons by poliovirus in human mononuclear blood cells requires the type II fcgamma receptor (CD32). *Virology* 2000;278:86-94.

Pasare C, Medzhitov R. Toll-like receptors: linking innate and adaptive immunity. *Adv Exp Med Biol* 2005;560:11-8.

Perussia B, Fanning V, Trinchieri G. A leukocyte subset bearing HLA-DR antigens is responsible for in vitro alpha interferon production in response to viruses. *Nat Immun Cell Growth Regul* 1985;4:120-37.

Pichlmair A, Reis e Sousa C. Innate recognition of viruses. *Immunity* 2007;27:370-83.

Plasterk RH. RNA silencing: the genome's immune system. *Science* 2002;296:1263-5.

Poock H, Besch R, Maihoefer C, et al. 5'-Triphosphate-siRNA: turning gene silencing and Rig-I activation against melanoma. *Nat Med* 2008;14:1256-63.

Potenza N, Moggio L, Milano G, et al. RNA Interference in Mammalia Cells by RNA-3'-PNA Chimeras. *Int J Mol Sci* 2008;9:299-315.

Reynolds A, Anderson EM, Vermeulen A, et al. Induction of the interferon response by siRNA is cell type- and duplex length-dependent. *RNA* 2006;12:988-93.

Rissoan MC, Soumelis V, Kadowaki N, et al. Reciprocal control of T helper cell and dendritic cell differentiation. *Science* 1999;283:1183-6.

Robbins M, Judge A, Ambegia E, et al. Misinterpreting the therapeutic effects of small interfering RNA caused by immune stimulation. *Hum Gene Ther* 2008;19:991-9.

Rocheleau CE, Downs WD, Lin R, et al. Wnt signaling and an APC-related gene specify endoderm in early *C. elegans* embryos. *Cell* 1997;90:707-16.

Romani N, Reider D, Heuer M, et al. Generation of mature dendritic cells from human blood. An improved method with special regard to clinical applicability. *J Immunol Methods* 1996;196:137-51.

Rothenfusser S, Hornung V, Krug A, et al. Distinct CpG oligonucleotide sequences activate human gamma delta T cells via interferon-alpha/beta. *Eur J Immunol* 2001;31:3525-34.

Rothenfusser S, Tuma E, Endres S, Hartmann G. Plasmacytoid dendritic cells: the key to CpG. *Hum Immunol* 2002;63:1111-9.

Sadler AJ, Williams BR. Interferon-inducible antiviral effectors. *Nat Rev Immunol* 2008;8:559-68.

Sato M, Suemori H, Hata N, et al. Distinct and essential roles of transcription factors IRF-3 and IRF-7 in response to viruses for IFN-alpha/beta gene induction. *Immunity* 2000;13:539-48.

Sato S, Sugiyama M, Yamamoto M, et al. Toll/IL-1 receptor domain-containing adaptor inducing IFN-beta (TRIF) associates with TNF receptor-associated factor 6 and TANK-binding kinase 1, and activates two distinct transcription factors, NF-kappa B and IFN-regulatory factor-3, in the Toll-like receptor signaling. *J Immunol* 2003;171:4304-10.

Schlender J, Bossert B, Buchholz U, Conzelmann KK. Bovine respiratory syncytial virus nonstructural proteins NS1 and NS2 cooperatively antagonize alpha/beta interferon-induced antiviral response. *J Virol* 2000;74:8234-42.

Schlender J, Walliser G, Fricke J, Conzelmann KK. Respiratory syncytial virus fusion protein mediates inhibition of mitogen-induced T-cell proliferation by contact. *J Virol* 2002;76:1163-70.

Schroder M, Baran M, Bowie AG. Viral targeting of DEAD box protein 3 reveals its role in TBK1/IKKepsilon-mediated IRF activation. *EMBO J* 2008;27:2147-57.

Schroder M, Bowie AG. TLR3 in antiviral immunity: key player or bystander? *Trends Immunol* 2005;26:462-8.

Schroder M, Bowie AG. An arms race: innate antiviral responses and counteracting viral strategies. *Biochem Soc Trans* 2007;35:1512-4.

Shen J, Samul R, Silva RL, et al. Suppression of ocular neovascularization with siRNA targeting VEGF receptor 1. *Gene Ther* 2006;13:225-34.

Siegal FP, Fitzgerald-Bocarsly P, Holland BK, Shodell M. Interferon-alpha generation and immune reconstitution during antiretroviral therapy for human immunodeficiency virus infection. *AIDS* 2001;15:1603-12.

Siegal FP, Kadowaki N, Shodell M, et al. The nature of the principal type 1 interferon-producing cells in human blood. *Science* 1999;284:1835-7.

Singh SK, Hajeri PB. siRNAs: their potential as therapeutic agents--Part II. Methods of delivery. *Drug Discov Today* 2009;14:859-65.

Siomi H, Siomi MC. On the road to reading the RNA-interference code. *Nature* 2009;457:396-404.

Sioud M. Single-stranded small interfering RNA are more immunostimulatory than their double-stranded counterparts: a central role for 2'-hydroxyl uridines in immune responses. *Eur J Immunol* 2006;36:1222-30.

Sioud M. Innate sensing of self and non-self RNAs by Toll-like receptors. *Trends Mol Med* 2006;12:167-76.

Sledz CA, Holko M, de Veer MJ, Silverman RH, Williams BR. Activation of the interferon system by short-interfering RNAs. *Nat Cell Biol* 2003;5:834-9.

Spagnou S, Miller AD, Keller M. Lipidic carriers of siRNA: differences in the formulation, cellular uptake, and delivery with plasmid DNA. *Biochemistry* 2004;43:13348-56.

Stacey KJ, Young GR, Clark F, et al. The molecular basis for the lack of immunostimulatory activity of vertebrate DNA. *J Immunol* 2003;170:3614-20.

Takeda K, Akira S. TLR signaling pathways. *Semin Immunol* 2004;16:3-9.

Thompson AJ, Locarnini SA. Toll-like receptors, RIG-I-like RNA helicases and the antiviral innate immune response. *Immunol Cell Biol* 2007;85:435-45.

Thompson JM, Iwasaki A. Toll-like receptors regulation of viral infection and disease. *Adv Drug Deliv Rev* 2008;60:786-94.

Tiemann K. ESBES meeting report: Get-together -international bioengineers meet in Faro. *Biotechnol J* 2009;4:575-6.

Ting AH, Schuebel KE, Herman JG, Baylin SB. Short double-stranded RNA induces transcriptional gene silencing in human cancer cells in the absence of DNA methylation. *Nat Genet* 2005;37:906-10.

Tokunaga T, Yamamoto H, Shimada S, et al. Antitumor activity of deoxyribonucleic acid fraction from *Mycobacterium bovis* BCG. I. Isolation, physicochemical characterization, and antitumor activity. *J Natl Cancer Inst* 1984;72:955-62.

Unterholzner L, Bowie AG. The interplay between viruses and innate immune signaling: recent insights and therapeutic opportunities. *Biochem Pharmacol* 2008;75:589-602.

Verdel A, Jia S, Gerber S, et al. RNAi-mediated targeting of heterochromatin by the RITS complex. *Science* 2004;303:672-6.

Wang JP, Asher DR, Chan M, Kurt-Jones EA, Finberg RW. Cutting Edge: Antibody-mediated TLR7-dependent recognition of viral RNA. *J Immunol* 2007;178:3363-7.

Wang Y, Sheng G, Juranek S, Tuschl T, Patel DJ. Structure of the guide-strand-containing argonaute silencing complex. *Nature* 2008;456:209-13.

Wassenegger M, Heimes S, Riedel L, Sanger HL. RNA-directed de novo methylation of genomic sequences in plants. *Cell* 1994;76:567-76.

Watanabe T, Umehara T, Kohara M. Therapeutic application of RNA interference for hepatitis C virus. *Adv Drug Deliv Rev* 2007;59:1263-76.

Watts JK, Choubdar N, Sadalapure K, et al. 2'-fluoro-4'-thioarabino-modified oligonucleotides: conformational switches linked to siRNA activity. *Nucleic Acids Res* 2007;35:1441-51.

Weber F, Wagner V, Kessler N, Haller O. Induction of interferon synthesis by the PKR-inhibitory VA RNAs of adenoviruses. *J Interferon Cytokine Res* 2006;26:1-7.

Weber F, Wagner V, Rasmussen SB, Hartmann R, Paludan SR. Double-stranded RNA is produced by positive-strand RNA viruses and DNA viruses but not in detectable amounts by negative-strand RNA viruses. *J Virol* 2006;80:5059-64.

Webster DP, Klenerman P, Collier J, Jeffery KJ. Development of novel treatments for hepatitis C. *Lancet Infect Dis* 2009;9:108-17.

Whitehead KA, Langer R, Anderson DG. Knocking down barriers: advances in siRNA delivery. *Nat Rev Drug Discov* 2009;8:129-38.

Wianny F, Zernicka-Goetz M. Specific interference with gene function by double-stranded RNA in early mouse development. *Nat Cell Biol* 2000;2:70-5.

Williams BR. Signal integration via PKR. *Sci STKE* 2001;2001:re2.

Xia H, Mao Q, Eliason SL, et al. RNAi suppresses polyglutamine-induced neurodegeneration in a model of spinocerebellar ataxia. *Nat Med* 2004;10:816-20.

Yamamoto M, Sato S, Hemmi H, et al. Role of adaptor TRIF in the MyD88-independent toll-like receptor signaling pathway. *Science* 2003;301:640-3.

Yamamoto M, Sato S, Mori K, et al. 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* 2002;169:6668-72.

Yasutomo K, Horiuchi T, Kagami S, et al. Mutation of DNASE1 in people with systemic lupus erythematosus. *Nat Genet* 2001;28:313-4.

Yoneyama M, Kikuchi M, Natsukawa T, et al. The RNA helicase RIG-I has an essential function in double-stranded RNA-induced innate antiviral responses. *Nat Immunol* 2004;5:730-7.

Zamore PD, Tuschl T, Sharp PA, Bartel DP. RNAi: double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals. *Cell* 2000;101:25-33.

7. Verzeichnis der Abkürzungen und Akronyme

| | |
|---------------------------|--|
| ADCC | Antikörper-vermittelte zellgebundene Zytotoxizität |
| APC | Allophycocyanin |
| APC | Antigen-präsentierende Zelle |
| ATCC | American Type Culture Collection |
| BCG | Bacille Calmette Guérin |
| BSA | Bovines Serum-Albumin |
| cDNA | <i>copy</i> -Desoxyribonukleinsäure |
| CG | Cytosin-Guanin |
| CpG | Cytosin-(phosphat)-Guanin-Dinukleotid |
| cpm | Counts per minute |
| DC | Dendritische Zelle |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure |
| EDTA | Ethylen-Diamin-Tetraessigsäure |
| ELISA | Enzyme-linked immunosorbent assay |
| ERK 1/ 2 | Extracellular signal-regulated kinase 1/ 2 |
| FACS | Fluorescence-activated cell sorter |
| FANA | 2'-fluro- β -D-Arabinonukleotides |
| FCS | Fetales Kälberserum |
| Fc ϵ R1 α | High-affinity Fc receptor für IgE |
| FITC | Fluorescein-Isocyanat |
| GMCSF | Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor |
| HSA | Humanes Serum Albumin |
| I κ B α | Inhibitor of NF- κ B α |
| IFN | Interferon |
| Ig | Immunglobulin |
| IL | Interleukin |
| IL-1R | Interleukin-1-Rezeptor |
| IMDM | Iscove's modified Dulbecco's medium |
| IPC | Interferon-produzierende Zelle |
| IPP | Isopentenyl-Pyrophosphat |
| IRAK 1/ 4 | IL-1R-assozierte Kinase 1/ 4 |
| IRF3 | IFN regulatory factor 3 |
| ITAM | Immunoreceptor-based tyrosine activation motif |
| ILT7 | Immunoglobulin-like transcript 7 |
| JNK | c-Jun-N-terminale Kinase |
| KIR | Killer inhibitory receptor |
| LAM | Lipoarabinomannan |
| LNA | Locked nucleic acid |
| LPS | Lipopolysaccharid |
| MACS | Magnetic-activated cell sorting |
| MALP-2 | Macrophage-activating lipopeptide 2 |
| MEF | Mouse embryonic fibroblasts |
| MDC | Macrophage-derived chemokine |
| MDC | Myeloide dendritische Zelle |
| MFI | Mittlere Fluoreszenzintensität |
| MHC | Major histocompatibility complex |
| Min | Minute(n) |
| Mio | Million(en) |
| MIP-1 β | Macrophage inflammatory protein 1 β |
| MIP-1 α | Macrophage inflammatory protein 1 α |
| mRNA | Messenger RNA |

| | |
|----------------|---|
| MyD88 | Myeloid differentiation factor 88 |
| NF- κ B | Nuclear factor kappa B |
| NK-Zellen | Natürliche Killerzelle |
| OAS1 | 2'5'oligoadenylate synthetase |
| ODN | Oligodesoxynukleotid |
| PAMP | Pathogen-associated molecular pattern |
| PBMC | Mononukleäre Zellen der peripheren Blutes |
| PBS | Phosphate-buffered saline |
| PCR | Polymerase-Kettenreaktion |
| PDC | Plasmazytoide dendritische Zelle |
| PE | Phycoerithrin |
| PerCP | Peridinin-Chlorophyll-A-Protein |
| PHA | Phytohämagglutinin |
| PI | Propidiumiodid |
| PMA | Phorbol-12-Myristat-13-Acetat |
| PNA | Peptid nucleic acids |
| PKR | Protein kinase R |
| PRR | Pattern-recognition-Rezeptor |
| PTZ | Plasmazytoide T-Zelle |
| RIG-I | Retinoic acid-induced gene I |
| RITS | RNA-induced transcriptional silencing complex |
| RISC | RNA-induced silencing complex |
| RNA | Ribonukleinsäure |
| RNAi | RNA interference |
| RPMI | Roswell Park Memorial Institute |
| RT | Raumtemperatur |
| SEM | Standard error of mean |
| SLAM | Signaling lymphocytic activation molecule |
| SNALP | Stable nucleic acid lipid particle |
| SR-A | Scavenger-Rezeptor des Typs A |
| TARC | Thymus- and activation-regulated chemokine |
| TBE | Tris-Borat-EDTA |
| TGS | Transcriptional gene silencing |
| TH | T-Helfer |
| TIR | Toll/ IL-1R-Domäne |
| TIRAP | TIR domain containing adapter protein |
| TLR | Toll-like-Rezeptor |
| TNF- α | Tumor-Nekrose-Faktor- α |
| TRAF 6 | TNFR-assoziiertes Faktor 6 |
| TRIF | TIR domain-containing adapter inducing IFN- β |
| TZR | T-Zellrezeptor |

8. Danksagung

Für die herausragende Betreuung und nicht nachlassende Motivation, verbunden mit einem Enthusiasmus, der die vielen gemeinsam verbrachten Stunden und auch so manche Durststrecke wie im Flug vergehen ließ, möchte ich mich von ganzem Herzen bei meinem Betreuer, Herrn Professor Veit Hornung und meinem Arbeitsgruppenleiter Herrn Professor Gunther Hartmann, bedanken.

Ganz besonderer Dank gilt jedoch dem Menschen, der diese einzigartige Abteilung und damit die sehr kompetitive, aber gleichzeitig gemeinschaftliche Art des Arbeitens erst möglich machte – meinem Doktorvater, Herrn Professor Stefan Endres.

Weiterhin möchte ich mich bedanken bei Frau Rosemarie Kiefl, Julia Battiany, Daniela Sauter, Anja Marschner und besonders auch bei Herrn PD Simon Rothenfußer.

Ihnen allen gilt mein großer Dank

9. Veröffentlichungen

Die Ergebnisse dieser Arbeit wurden in folgender internationaler Fachzeitschrift als Originalarbeit veröffentlicht:

Hornung V, **Guenther-Biller M**, Bourquin C, Ablasser A, Schlee M, Uematsu S, Noronha A, Manoharan M, Akira S, de Fougères A, Endres S, Hartmann G.

Sequence-specific potent induction of IFN- α by short interfering RNA in plasmacytoid dendritic cells through TLR7.

Nat Med 2005, 11:263-7

