Aus dem Zentrum für Innere Medizin, Schwerpunkt Pneumologie
der Philipps-Universität Marburg

Leiter: Prof. Dr. Vogelmeier

Modifikation der Genexpression respiratorischen Epithels mittels Oligonukleotiden zur Entwicklung innovativer Behandlungsstrategien von entzündlichen Erkrankungen der Atemwege

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. physiol.) dem
Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von
Juliane Platz
aus Hannover
Marburg, 2004

Bibliografische Information Der Deutschen Bibliothek
Die Deutsche Bibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über **http://dnb.ddb.de** abrufbar.

ISBN 3-89963-124-2

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universitat Marburg am 21.12.04

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs

Dekan:	Prof. Dr. Maisch
Referent:	Priv. Doz. Dr. Dr. Bals
Koreferent:	Prof. Dr. med. Lohoff

© Verlag Dr. Hut, München 2005.
Sternstr. 18, 80538 München
Tel.: 089/21568805
www.dr.hut-verlag.de

Die Informationen in diesem Buch wurden mit großer Sorgfalt erarbeitet. Dennoch können Fehler, insbesondere bei der Beschreibung des Gefahrenpotentials von Versuchen, nicht vollständig ausgeschlossen werden. Verlag, Autoren und ggf. Übersetzer übernehmen keine juristische Verantwortung oder irgendeine Haftung für eventuell verbliebene fehlerhafte Angaben und deren Folgen.

Alle Rechte, auch die des auszugsweisen Nachdrucks, der Vervielfältigung und Verbreitung in besonderen Verfahren wie fotomechanischer Nachdruck, Fotokopie, Mikrokopie, elektronische Datenaufzeichnung einschließlich Speicherung und Übertragung auf weitere Datenträger sowie Übersetzung in andere Sprachen, behält sich der Verlag vor.

1. Auflage 2005

Druck und Bindung: fm-kopierbar, München (www.fm-kopierbar.de)

Gliederung

1 Einleitung 4
1.1 Die Rolle des Atemwegsepithels in der Abwehr von Infektionen 6
1.2 NF-κB spielt bei entzündlichen Lungenerkrankungen eine zentrale Rolle 8
1.3 AS ON als neuer therapeutischer Ansatz 10
1.3.1 AS ON wirken über komplementäre Basenpaarung mit der Ziel mRNA 10
1.3.2 Zielstruktur und Struktur und Stabilität des AS ON bestimmen die Wirksamkeit des AS ON 11
1.3.3 Zelluläre Aufnahme von AS ON wird durch Transfektionsreagenzien verbessert 12
1.4 RNAi als Mechanismus der Genregulation 13
1.4.1 siRNA wirkt über komplementäre Basenpaarung mit der Ziel mRNA 13
1.4.2 Unspezifische Verringerung der Genexpression durch RNAi 15
1.4.3 Schema für das Design von siRNAs 15
1.4.4 Synthese der siRNA 15
1.5 TLR sind Rezeptoren des angeborenen Immunsystems 16
1.5.1 Die Struktur der TLR ist streng konserviert 16
1.5.2 TLR erkennen Pathogen assoziierte molekulare Muster (pathogen associated molecular patterns, PAMPs) 17
1.5.3 TLR sind in Zellen des Immunsystems exprimiert 18
1.5.4 TLR spielen eine Rolle in der angeborenen und der adaptiven Immunität 19
1.5.5 TLR besitzen gemeinsame Signalwege 21
1.5.5.1 MyD88-abhängiger Signalweg 21
1.5.5.2 MyD88-unabhängiger Signalweg 22
1.5.6 TLR9 23
1.5.6.1 TLR9 erkennt CpG Motive in bakterieller DNA 23
1.5.6.2 TLR9 ist intrazellulär lokalisiert und bindet direkt an CpG DNA 24
1.5.7 TLR3 25
1.5.7.1 TLR3 erkennt dsRNA 25

1.5.8 TLR als mögliche Zielmoleküle für die Therapie verschiedener Krankheiten ... 26
2 Fragestellung ... 27
3 Material und Methoden ... 28
3.1 Medien und Reagenzien 28
3.2 Primärkulturen von humanem Atemwegsepithel 28
3.3 Modell für die Zigarettenrauchexposition 30
3.4 Reagenzien 31
3.5 AS ON und siRNA Duplexe gegen die p65 Untereinheit von NF-κB 31
3.6 Messung der Zytokin –Konzentration 32
3.7 Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) 32
3.8 FACS (Fluorescent Activated Cell Sorting)-Analyse 33
3.9 Luciferase Reporter Plasmid Assay 33
3.10 Transfektionsprotokoll für AS ON und siRNAs 34
3.11 Western Blot Analyse 34
3.12 Markierung der siRNA 35
3.13 Statistische Analyse 36
4 Ergebnisse ... 37
4.1 AS ON und siRNA modifizieren die epitheliale Entzündungsreaktion 37
4.1.1 as.p65 verringert die Sekretion von Zytokinen in Reaktion auf eine Stimulation mit TNF-α und Zigarettenrauch im Atemwegsepithel ... 37
4.1.2 AS ON werden je nach Applikationsform unterschiedlich in die Zellen des Atemwegsepithels aufgenommen ... 40
4.1.3 siRNA.p65 vermindert die Sekretion pro-inflammatorischer Zytokine im Atemwegsepithel ... 42
4.1.4 siRNA.p65 verringert die Expression von p65 im Atemwegsepithel ... 45
4.1.5 siRNA ist im Zytoplasma von Atemwegsepithelzellen lokalisiert ... 46
4.1.6 Die Applikation von siRNA.p65 vermindert die Sekretion von Entzündungsmediatoren stärker als as.p65 ... 50
4.2 TLR 51
4.2.1 Expression und Funktion von TLR9 in humanem Atemwegsepithel ... 51
4.2.1.1 TLR9 wird von humanen respiratorischen Epithelzellen exprimiert ... 51

4.2.1.2 Stimulation von humanen respiratorischen Epithelzellen mit bakterieller DNA oder CpG ODN resultiert in der gesteigerten Sekretion von Zytokinen und hBD-2 54
4.2.1.3 Der stimulierende Effekt von CpG DNA wird durch die Expression von dominant negativen Form von MyD88 und IRAK inhibiert 58
4.2.2 Expression und Funktion von TLR3 in humanem Atemwegsepithel 59
4.2.2.1 TLR3 wird von humanen respiratorischen Epithelzellen exprimiert 59
4.2.2.2 Stimulation von humanen respiratorischen Epithelzellen mit dsRNA resultiert in der gesteigerten Sekretion von Zytokinen 61
4.2.2.3 Der stimulierende Effekt von poly (I:C) wird durch die Expression einer dominant negativen Form von MyD88 inhibiert 63
5 Diskussion 64
5.1 Kleine Nukleinsäuren als antientzündliche Therapienansätze 64
5.2 Atemwegsepithel erkennt Nukleinsäuren 68
6 Zusammenfassung 73
7 Literaturverzeichnis 74

1 Einleitung

Die Bedeutung von obstruktiven Erkrankungen der Atemwege hat in den letzten Jahren stark zugenommen. Die Chronisch-obstruktive Lungenerkrankung (chronic obstructive pulmonary disease, COPD) wird in 10 Jahren die dritthäufigste Todesursache sein. Weltweit leiden etwa 300 Millionen Menschen an Asthma. Teilweise fehlende Möglichkeiten einer kausalen Therapie, die Einschränkungen der Lebensqualität für die Patienten und die immensen Kosten für die Gesundheitssysteme verdeutlichen den dringenden Bedarf an neuen Therapieansätzen.

Ein gemeinsames Kennzeichen vieler Erkrankungen des Respirationstraktes wie COPD, Asthma, zystischer Fibrose usw. ist eine zugrunde liegende Entzündungsreaktion. Schrieb man dem Atemwegsepithel früher lediglich eine strukturelle Funktion zu, hat man in den letzten Jahren seine Bedeutung in der angeborenen Immunität, der Infektabwehr und dem Entzündungsgeschehen erkannt. Das Atemwegsepithel bildet die äußere Barriere zur Umwelt und ist ständig einer Vielzahl von Keimen aus der Luft und dem Verdauungstrakt ausgesetzt. Auf Mikroorganismen reagiert das Atemwegspithel mit der Sekretion von Zytokinen, Chemokinen und antimikrobiellen Peptiden (AMPs). Aufgrund dieser wichtigen Funktion und seiner Exposition an einer Körperoberfläche stellt das Atemwegsepithel eine gute Zielstruktur für antientzündliche Therapienansätze dar.

Die vorliegende Arbeit hat die Interaktion von Nukleinsäuren und Atemwegsepithel zum Thema. Ziel der Studie war es, Entzündungsvorgänge im Atemwegsepithel durch die Applikation von Nukleinsäuren zu modifizieren. Hierzu wurden Antisense Oligonukleotide (AS ON) und small interfering RNA (siRNA) angewendet. AS ON sind kurze, einzelsträngige RNA oder DNA Fragmente, die an ihre Zielstruktur mit hoher Spezifität und Affinität binden. Eine beträchtliche Zahl an AS ON mit verschiedenen Indikationen befindet sich in der klinischen Prüfung. RNA Interferenz (RNA interference, RNAi) ist ein Mechanismus, welcher erst kürzlich entdeckt wurde und in Pflanzen-, Pilz und Säugerzellen dem Schutz des Genoms der Zelle vor Eindringlingen wie Viren und Transposons dient. Es hat den Anschein, dass RNAi eine außergewöhnlich effektive Methode der Genregulation ist, deren Potenz die

herkömmlicher AS-oder Ribozymstrategien bei weitem übersteigt. Große Hoffnungen sind an den Einsatz von siRNA zu therapeutischen Zwecken geknüpft. Erste in vitro Erfolge gegen human immunodeficiency virus (HIV) und weitere Erkrankungen sind bereits beschrieben worden (Kitabwalla und Ruprecht, 2002; Novina *et al.*, 2002).
Allerdings ergaben eigene Studien, dass Nukleotide im Atemwegsepithel entzündliche Reaktionen auslösen können. Die Untersuchung der zugrunde liegenden Mechanismen zeigte, dass das System der Toll like Rezeptoren (TLR), insbesondere TLR9 und TLR3 für diese Reaktionen verantwortlich sind. Die Familie der TLR hat eine große Bedeutung in der Erkennung konservierter mikrobieller Strukturen und stellt damit einen essentiellen Bestandteil des angeborenen Immunsystems dar. Von TLR9 ist bekannt, dass er CpG Motive in bakterieller DNA erkennt und bei Aktivierung eine Immunabwehrreaktion induziert. Als Ligand für TLR3 hat man virale doppelsträngige RNA (dsRNA) identifiziert.

Die vorliegenden Untersuchungen verdeutlichen, dass Atemwegsepithel eine gute Zielstruktur für therapeutische Ansätze ist und zugleich auch in der angeborenen Immunität eine wichtige Rolle spielt. Aus letzterer Funktion ergeben sich für das Design von Nukleinsäuren zur therapeutischen Anwendung im Atemwegsepithel Limitationen.

Im Folgenden wird zunächst die Rolle des Atemwegsepithels in der Abwehr von Infektionen beschrieben. Als Zielstruktur der antientzündlichen Therapieansätze wurde der Transkriptionsfaktor Nuclear factor-κB (NF-κB) gewählt. Die Bedeutung von NF-κB im Entzündungsgeschehen und seine Beteiligung an Erkrankungen des Respirationstraktes wird erläutert. Anschließend werden die zur Inhibition von Entzündung verwendeten Strategien der AS ON und der siRNA im Hinblick auf das Design, die Wirkungsmechanismen und die Aufnahme der Nukleinsäuren in Atemwegsepithel beleuchtet. Da in der vorliegenden Arbeit gezeigt wird, dass kleine Nukleinsäuren mit bestimmten Sequenzen über das System der TLR im Atemwegsepithel Entzündung auslösen können, wird im Folgenden die Funktion der TLR in der angeborenen Immunität beschrieben. Der Fokus liegt hierbei auf den TLR3 und 9, von welchen bekannt ist, dass sie in die Erkennung von Nukleinsäuren eingebunden sind.

1.1 Die Rolle des Atemwegsepithels in der Abwehr von Infektionen

Das Atemwegsepithel stellt sowohl eine physikalische als auch eine immunologische Barriere für Pathogene aus der Luft dar. Bakterien, welche in das Atemwegslumen gelangen aktivieren neben den klassischen Immunzellen in der Atemwegsmukosa auch das Atemwegsepithel. Adhärente Bakterien und bakterielle Produkte wie z.B. Flagellin, Lipopolysaccharid (LPS) und Peptidoglykan aktivieren verschiedene Signalwege, verursachen NF-κB Translokation und eine gesteigerte Expression von Muzinen und proinflammatorischen Zytokinen und Chemokinen im Atemwegsepithel (Rastogi *et al.*, 2001) (Abb. 1). Die Sekretion von Interleukin (IL)-8 und Adhäsionsmolekülen durch die Zellen des Atemwegsepithels rekrutiert Neutrophile zum Infektionsort, welche in der Folge Bakterien erkennen, phagozytieren und zerstören. Eine lokale Abwehrfunktion übt das Atemwegsepithel durch die Ausschüttung von AMPs aus, welche durch die Interaktionen mit Membranen direkt Bakterien, Pilze und manche Viren inaktivieren (Bals, 1997; Bals *et al.*, 1998). Neben ihrer direkten antimikrobiellen Funktion haben AMPs verschiedene Funktionen als Entzündungsmediatoren mit Effekten auf Epithel- und Entzündungszellen und beeiflussen verschiedendste Prozesse wie Aktivierung des Immunsystems, Zytokin-Sekretion und Chemotaxis (Bals, 2000; Koczulla *et al.*, 2003).

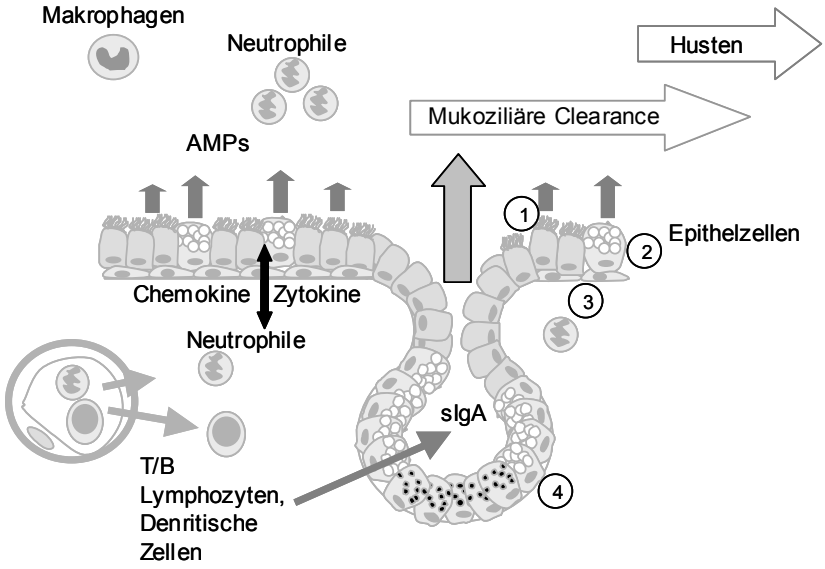


Abb. 1 Abwehrmechanismen des Atemwegsepithels. Husten und Zilien entfernen mechanisch inhalierte Fremdkörper und Mikroorganismen, welche im Mukus eingeschlossen sind (mukoziliäre Clearance). Viele Stoffe mit proinflammatorischen, antiinflammatorischen und antimikrobiellen Eigenschaften werden von Epithel- und Entzündungszellen ausgeschüttet und fungieren als Effektormoleküle des angeborenen Immunsystems. Natürliche Killerzellen (NK Zellen), Dendritsche Zellen, Neutrophile und Makrophagen stellen die zelluläre Komponente der angeborenen Immunität dar. Atemwegsepithelzellen (1 = Zilien tragende Zelle, 2 = Becherzelle, 3 = Basalzelle, 4 = Mukus- und seröse Drüsenzelle) sind keine passiven Beiwerke des Entzündungsprozesses, sondern sezernieren Effektormoleküle welche auch AMPs umfassen. Die adaptive Immunantwort mit T- und B-Zellen (sIgA = sekretorisches Immunoglobulin A) wird durch angeborene Mechansimen ausgelöst.

1.2 NF-κB spielt bei entzündlichen Lungenerkrankungen eine zentrale Rolle

Die Familie der NF-κB Proteine ist eine Gruppe von eng miteinander verwandten Transkriptionsfaktoren, welche in Säugern aus fünf Proteinen besteht: Rel (c-Rel), Rel A (p65, NF-κB3), Rel B, NF-κB1 (p50) und NF-κB2 (p52). Im unstimulierten Zustand befinden sich diese Proteine im Zytoplasma, wo inhibitorische Proteine (I κB Proteine) ihre Kernlokalisationssequenz maskieren. Stress, mikrobielle Infektion, und Zytokine wie Tumor Nekrose Faktor (TNF)-α führen zu einer durch Phosphorylierung induzierten Ubiquitinierung der I κB Proteine und in der Folge zu einer Translokation von NF-κB in den Zellkern. Bindung an die passende DNA Sequenz initiiert die Transkription von verschiedensten Genen u.a. von Zytokinen und Chemokinen (z.B. IL-6 und IL-8), Adhäsionsmolekülen, usw (Zhou *et al.*, 2003) (Abb. 2).

NF-κB spielt eine zentrale Rolle in den verschiedensten Prozessen wie Entzündung, Immunantwort, Kontrolle der Zellteilung und Apoptose (Tak und Firestein, 2001). NF-κB ist in akute und chronische entzündliche Atemwegserkrankungen wie Asthma oder COPD (Gagliardo *et al.*, 2003; Wright und Christman, 2003) involviert. So sind NF-κB Signalwege in schwerem persistierendem Asthma ständig aktiviert (Gagliardo *et al.*, 2003). Die Expression von NF-κB ist in bronchialen Biopsien von Rauchern und COPD Patienten gesteigert (Di Stefano *et al.*, 2002). Zigarettenrauch induziert Entzündung im Atemwegsepithel durch die Aktivierung von NF-κB (Anto *et al.*, 2002). Eine fehlerhafte Regulation von NF- κB liegt vermutlich auch Autoimmunerkrankungen und verschiedenen Tumorarten zugrunde (Hilliard *et al.*, 2002; Bell *et al.*, 2003; Hayashi und Faustman, 2003). Deshalb sind NF-κB und seine Signalwege ein Fokus intensiver Forschung für die Arzneimittelentwicklung geworden (Karin *et al.*, 2004).

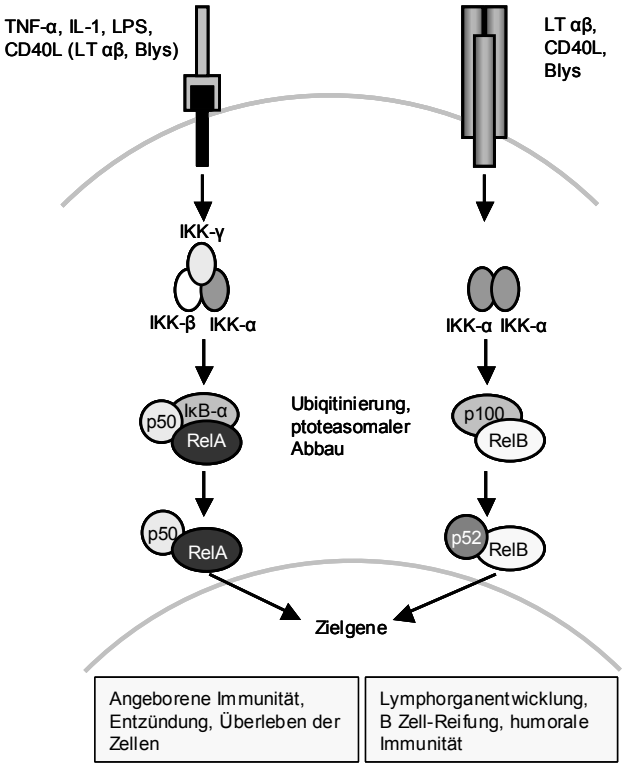


Abb. 2 Schematische Repräsentation der NF-κB Signalwege. Der klassische Signalweg ist auf der linken Seite dargestellt. Er wird von TNF-α, IL-1, LPS, CD40Ligand (CD40L) und in geringerem Ausmaß durch Lymphotoxin α/β (LT α/β) und Blys/BAFF aktiviert. Die Aktivierung dieses Signalwegs hängt vom IKK Holokomplex ab, welcher drei Untereinheiten umfasst und IκB phosphoryliert, um deren Abbau zu induzieren. Dieser Signalweg ist für die Aktivierung der angeborenen Immunantwort und des Entzündungsgeschehens und für die Inhibition der Apoptose (und damit für eine erhöhte Zellüberlebensrate) wichtig. Der alternative Signalweg ist auf der rechten Seite dargestellt. Er wird durch LT α/β, CD40L und Blys/BAFF, aber nicht von TNF-α, IL-1 und LPS aktiviert. Die Aktivierung dieses Signalwegs hängt von den IKK-α Homodimeren ab, welche die Prozessierung von p100 und die Translokation des RelB-52 Dimers in den Zellkern induzieren. Dieser Signalweg ist für die Entwicklung der sekundären lymphoiden Organe, die B Zell Reifung und die adaptive humorale Immunantwort (d.h. die Produktion von hochaffinen Antikörpern) wichtig. IκB, Inhibitor von NF-κB; IKK, IκB Kinase.

1.3 AS ON als neuer therapeutischer Ansatz

1.3.1 AS ON wirken über komplementäre Basenpaarung mit der Ziel mRNA

Das therapeutische Potential von AS ON, die in Zellkultur Virusreplikation verhinderten, entdeckten Zamecnik et al. 1978 (Zamecnik und Stephenson, 1978). AS ON sind kurze, einzelsträngige RNA oder DNA Fragmente, die an ihre Ziel mRNA mit hoher Spezifität und Affinität mittels komplementärer Basenpaarung binden. Verschiedene Wirkungsmechanismen werden für AS ON beschrieben (Varga *et al.*, 1999):

1. Komplementäre ON hybridisieren an ihre Ziel mRNA in einer strikt Sequenz-spezifischen Weise (Watson-Crick base pairing), wodurch in der Folge die Translation verhindert wird (*Antisense-Therapie*) (Abb. 3)
2. AS ON binden an genomische DNA im Zellkern, bilden eine Tripelhelix und verhindern dadurch die Transkription (*"Antigen"-Therapie*)
3. Im Gegensatz zu diesen spezifischen Wirkungsweisen steht die unspezifische Bindung der AS ON an Proteine (Aptamer Bindung)

Der Mechanismus der AS-Inhibition schließt vermutlich mehrere Modalitäten, u.a. die Induktion der RNase H Aktivität durch die Bildung eines DNA:RNA Hybrids, sterische Hinderung des Ribosoms und damit der Translation, und Verhinderung der RNA Prozessierung und des Transports aus dem Zellkern ein (Sharma und Narayanan, 1995).

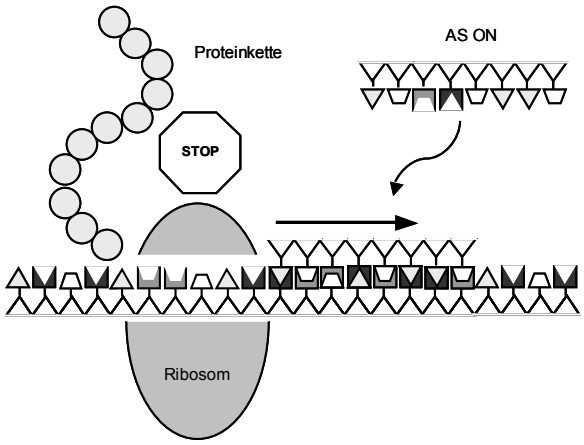


Abb. 3 Mechanismus der AS Therapie. Das AS ON bindet durch komplementäre Basenpaarung spezifisch an die Ziel mRNA. Durch Abbau der Ziel mRNA und sterische Hinderung des Ribosoms wird die Translation verhindert.

1.3.2 Zielstruktur und Struktur und Stabilität des AS ON bestimmen die Wirksamkeit des AS ON

Da lange RNA Moleküle komplexe Sekundär- und Tertiärstrukturen bilden, liegt die erste Schwierigkeit beim Design eines AS ON darin, auf der Ziel mRNA zugängliche Strukturen zu finden. Im Durchschnitt bindet nur eines von acht AS ON effektiv und spezifisch (Stein, 2001), wobei die Anzahl aktiver AS ON von Zielgen zu Zielgen variiert. Zur Identifikation der zugänglichen Zielstrukturen werden verschiedene Methoden benutzt u.a. die Herstellung von spezifischen AS ON durch Verdau der DNA Matritze, das Screening einer großen Anzahl AS ON gegen das Transkript und die Bestimmung des Ausmaßes der Zerschneidung durch das einzelne AS ON in Gegenwart von RNAse H und ein DNA Array zur Entschlüsselung der ON Hybridisierungsstellen (Ho *et al.*, 1996; Matveeva *et al.*, 1997; Milner *et al.*, 1997; Ho *et al.*, 1998; Kurreck *et al.*, 2002). Weiterhin ist es wichtig, dass einige strukturelle Fehler beim AS ON Design vermieden werden, wie z.B. signifikante Homologie zu anderen mRNAs, CpG Motive (immunstimulierender Effekt) und vier Guanidin-Reste in Folge (Formation von G-Quartetts, welche die verfügbare AS ON Konzentration senken und in unerwünschten Nebeneffekten resultieren).

Die Effektivität eines AS ON ist in hohem Maße von seiner Stabilität abhängig. Eine gesteigerte Resistenz gegenüber RNasen und Nukleasen wird durch verschiedene Modifikationen erreicht, welche in unnatürliche Basen, modifizierte Zucker (z.B. 2'-O-propylribose und 2' methoxyethoxyribose) und veränderte Phosphatbrücken (Phosphorothioat (PTO)-Bindung, N3'-P5'Phosphoramidat Bindung, Peptid-Nukleinsäure-Bindung) eingeteilt werden (Wagner, 1995; Herdewijn, 2000; Kurreck, 2003). In PTO-modifizierten AS ON ist eines der Nicht-Brücken-Sauerstoff-Atome in der Phosphodiester-Bindung durch Schwefel ersetzt. PTO ON haben eine erhöhte Halbwertszeit von neun bis zehn Stunden in humanem Serum, bilden reguläre Watson-Crick Basenpaare, aktivieren RNase H und besitzen attraktive pharmakokinetische Eigenschaften (Crooke, 2000). Limitierend für ihren therapeutischen Einsatz sind unspezifische Interaktionen mit Proteinen (Brown *et al.*, 1994) und ihre zelluläre Toxizität (Levin, 1999). In der zweiten und dritten Generation von AS ON sind diese Probleme teilweise gelöst worden (Kurreck, 2003).

1.3.3 Zelluläre Aufnahme von AS ON wird durch Transfektionsreagenzien verbessert

In Zellkultur ist die Aufnahme von nackter DNA gewöhnlich ineffizient, da die negativ geladenen ON eine hydrophobe Zellmembran passieren müssen, um an ihren Wirkungsort zu gelangen. Eine Vielzahl von Methoden wurde deshalb für die in vitro und vivo Applikation von ON entwickelt (Hughes *et al.*, 2001; Liang *et al.*, 2002). Am weitesten ist der Gebrauch von Liposomen und kationischen Lipiden verbreitet, welche Nukleinsäuren entweder in ihrem wässrigen Kern einschließen oder durch elektrostatische Anziehung entgegesetzter Ladungen Nukleinsäure-Lipid-Komplexe bilden. Diese Komplexe werden dann mittels Endozytose von der Zelle aufgenommen (Loke *et al.*, 1989; Chin *et al.*, 1990). Die Freisetzung der ON aus diesen Komplexen erfolgt durch einen Flip-Flop der Endosomen-Membran, welcher von der Wechselwirkung zwischen den kationischen Lipiden und den negativ geladenen Phospholipiden der Endosomen-Membran verursacht wird (Lebedeva *et al.*, 2000). Weitere Transfersysteme umfassen Makromoleküle wie Dendrimere, biodegradierbare Polymere und ON-bindende Nanopartikel. Die Nutzung der Rezeptor-vermittelten Endozytose durch die Applikation ON-konjugierter Antikörper oder für einen Rezeptor spezifischer Liganden ermöglicht einen gezielten Transport von AS ON zu bestimmten Organen oder Geweben (Shi *et al.*, 2000). In vivo gibt es Berichte über eine effiziente Aufnahme nackter DNA in Abwesenheit von Transfektionsreagenzien (Lai *et al.*, 2002).

Bisher haben wenige Studien eine erfolgreiche Transfektion von polarisiertem Epithel gezeigt (Uduehi *et al.*, 1999; Li und Mrsny, 2000; Snyder, 2000). Eine der neuesten Arbeiten befasst sich mit der Transfektion polarisierter einschichtiger Epithelzellen mit cystic fibrosis tranmembrane conductance regulator (CFTR) und Reportergenen mit Hilfe verschiedener kationischer Lipide (Tucker *et al.*, 2003). Hier wurde unter anderem gezeigt, dass effektiver Transport mittels kationischer Lipide nur durch Applikation von apikaler, nicht von basolateraler Seite stattfindet.

1.4 RNAi als Mechanismus der Genregulation

Die Existenz post-transkriptionaler Genblockade (post-transcriptional gene silencing, PTGS) wurden in Pflanzen („co-suppression"), Pilzen („quelling") und Tieren (RNAi) beschrieben. dsRNA wurde als der initiierende Faktor erkannt (Fire *et al.*, 1998). Da eine Zelle normalerweise dsRNA nur während der replikativen Phase einer viralen Infektion oder als Teil des Replikationsprozesses eines Transposons aufnimmt, liegt die Vermutung nahe, dass PTGS Mechanismen sich als Form eines genomischen Immunsystems entwickelt haben, um die Zelle gegen virale Infektion und das mutagene Potential von Transposons zu schützen. Die Fähigkeit von Viren, eine Genblockade zu verursachen, wurde zum ersten Mal in Tabakpflanzen beschrieben (Lindbo *et al.*, 1993; Angell und Baulcombe, 1997).
Weiterhin gibt es Hinweise darauf, dass PTGS, oder wenigstens einige ihrer Elemente an der Regulation der Genexpression während der Entwicklung Anteil haben könnten (Fagard *et al.*, 2000).

1.4.1 siRNA wirkt über komplementäre Basenpaarung mit der Ziel mRNA

Für alle PTGS Phänomene hat man ein gemeinsames Modell formuliert: Es wird ein zweistufiger Prozess angenommen, indem dsRNA, welche die Zelle als fremd erkennt, von der Klasse II RNase III „Dicer" in 21 Nukleotide (Nt) umfassende RNA Fragmente mit zwei 3`Nukleotid-Überhängen, die sog. siRNAs geschnitten wird. Diese werden in einen Multiprotein-Komplex (RNA-induced silencing complex, RISC) aufgenommen. Die siRNAs binden durch komplementäre Basenpaarung spezifisch an die Ziel mRNA, welche in der Folge von einer Nuklease in RISC degradiert wird (Bass, 2000; Tuschl, 2001; Cullen, 2002; Kitabwalla und Ruprecht, 2002) (Abb. 4).
RNAi ist eine außergewöhnlich effektive Methode der Genregulation, welche im Gegensatz zu herkömmlichen AS- oder Ribozym- Experimenten durch sehr geringe Mengen dsRNA ausgelöst wird (Fire *et al.*, 1998; Elbashir *et al.*, 2001a). Eine wahrscheinliche Erklärung dafür ist ein Amplifikationsschritt, in dem die siRNAs nicht nur als „guide" Sequenzen für den Abbau der komplementären mRNA, sondern

auch als Primer für die Amplifikation des blockierenden Signals fungieren (Lipardi *et al.*, 2001).

Die RNAi Maschinerie umfasst weiterhin transkriptionale Genblockade, also eine Regulation auf DNA- und Chromatinebene. siRNAs können mit DNA interagieren und somit Heterochromatin Formation und DNA Methylierung induzieren, ein Prozess, welcher als RNA-gesteuerte DNA Methylierung (RNA-directed DNA Methylation, RdDM) bezeichnet wird.

RNAi spielt also sowohl für den Schutz des Genoms als auch für die Regulation der Expression während der Entwicklung eine fundamentale Rolle.

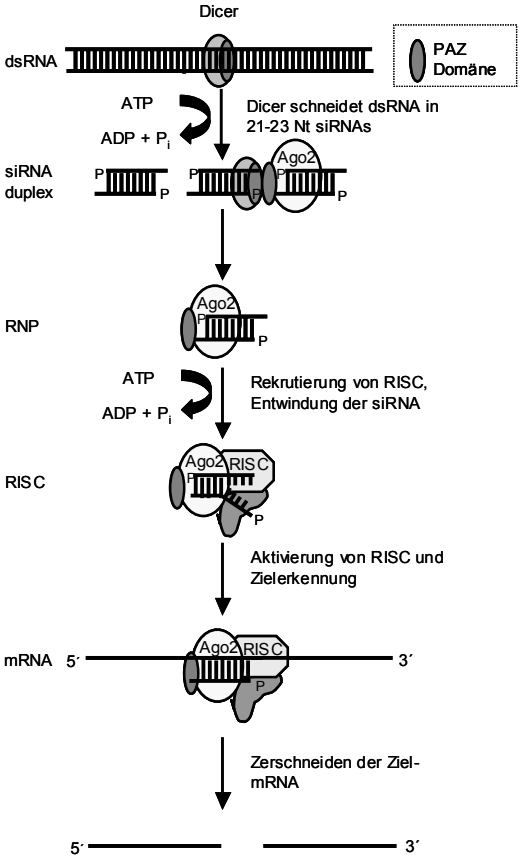


Abb. 4 Vorgeschlagener Mechanismus für die RNA Interferenz. Die ursprüngliche dsRNA wird durch eine Nuclease (Dicer), welche mit anderen Proteinen wie AGO-2 oder seinem Homologen Protein eIF2C über die PAZ Domäne interagiert, in siRNAs zerschnitten. Die neu gebildeten siRNA Duplexe werden von Proteinen rekrutiert, welche einen Ribonukleotid Protein Komplex (RNP) bilden und werden RISC übergeben. RISC wird durch die Entwindung der Duplex aktiviert und entfaltet Nuklease Aktivität gegenüber der mRNA. Sequenz-Spezifität und Zielerkennung werden durch den verbleibenden Antisense Strang der siRNA vermittelt.

1.4.2 Unspezifische Verringerung der Genexpression durch RNAi

Es ist bekannt, dass dsRNA im Zytoplasma von Säugerzellen physiologische Reaktionen auslösen kann, welche zur Induktion der Interferon (IFN)-Synthese führen (Stark *et al.*, 1998). In der IFN-Antwort bindet und aktiviert dsRNA, die mehr als 30 Basenpaare umfasst Proteinkinase R (PKR) (Manche *et al.*, 1992) und 2',5'-Oligoadenylat Sythetase (2',5'-OAS) (Minks *et al.*, 1979). Aktivierte PKR verzögert die Translation durch Phosphorylierung des Translations-Initiationsfaktors eIF2α, und aktivierte 2',5'-OAS verursacht den Abbau der mRNA durch Aktivierung von Ribonuklease L. Diese Antwort ist unabhängig von der Sequenz der eingeführten dsRNA.
Eine weitere Limitation der RNAi besteht darin, dass siRNAs Auswirkungen auf die Expression strukturell und funktional nicht verwandter Gene haben (Scacheri *et al.*, 2004). Es wird vermutet, dass partielle komplementäre Basenpaarung zu einer Inhibition der Translation führt (Pickford und Cogoni, 2003).

1.4.3 Schema für das Design von siRNAs

Regeln für das Design einer optimalen siRNA wurden von Tuschl und Mitarbeitern beschrieben. Die codierende Region der Ziel mRNA wird nach dem 23Nt Sequenz-Motif AAG(N17)(C/A/G)TT durchsucht, wobei N ein beliebiges Nukleotid markiert. Ein Fehlen von inverted repeats und ein geringer G / C Gehalt sind optimal (Reynolds *et al.*, 2004). Die Sequenz des Antisense-Stranges der siRNA wird analog nach der Regel AA(T/C)N17(C)TT bestimmt. Es muss sichergestellt werden, dass die verwendete siRNA keine Homologien zu anderen Genen aufweist.

1.4.4 Synthese der siRNA

Die schnellste und einfachste Methode für die Herstellung einer siRNA ist die chemische Synthese der Duplex. Diese wird mit einem Thymidin-Überhang synthetisiert, welcher die natürlicherweise durch Dicer produzierte siRNA nachahmt.
Weiterhin gibt es die Möglichkeit der in vitro oder in vivo Transkription. Sowohl Plasmid- als auch PCR basierte Systeme zeigen effiziente Gensuppression. Es wurde ein duales Promoter-siRNA-Expressionssystem entwickelt, welches die einfache

Konstruktion von siRNA Expressionsbibliotheken für genomweite Screenings erlaubt (Zheng *et al.*, 2004).

1.5 TLR sind Rezeptoren des angeborenen Immunsystems

Über die Rolle der Toll Rezeptoren in der angeborenen Immunität wurde zum ersten Mal in *Drosophila* berichtet. Dort schrieb man ihnen ursprünglich eine Funktion bei der embryonalen Entwicklung zu. Eine genauere Untersuchung der Signalwege ergab weitgehende funktionelle und strukturelle Übereinstimmungen mit dem Zytokin-induzierten IL-1-Signalweg bei Säugern (Toll/IL-1, Cactus/I-κB, und dorsal/NF-κB) (Lemaitre *et al.*, 1996). Man beobachtete, dass die intrazellulären Komponenten des dorsoventralen Signalweges (außer Dorsal) und der extrazelluläre Toll Ligand Spätzle die Expression des Peptids Drosomycin kontrollieren, welches eine Rolle in der fungiziden Immunantwort spielt. Versuche mit mutierten ausgewachsenen Fliegen, denen wichtige Komponenten des Toll Signalweges fehlten, gingen mit einer stark verminderten Überlebensrate nach einer Pilzinfektion einher. Ein Jahr nach der Entdeckung der Bedeutung von *Drosophila* Toll in der Abwehrreaktion gegen Pilzinfektionen wurde das homologe Protein in Säugern identifiziert und mit Toll-like Rezeptor (TLR) bezeichnet.

1.5.1 Die Struktur der TLR ist streng konserviert

Bis heute wurden zehn humane Subtypen der TLR (TLR1-10) identifiziert, während man in Mäusen 12 verschiedene TLR Proteine gefunden hat. Strukturell sind sie stark konservierte Transmembran-Proteine, die charakterisiert sind durch eine extrazelluläre Domäne mit einem Signalpeptid, Leucin-reichen Wiederholungen (Leucine-rich repeats; LRR) und einer Cystein reichen Domäne, die von einer Transmembran-Region und einer zytoplasmatischen Toll/IL-1 receptor (TIR) Domäne gefolgt ist. TLR3 wird durch die Exons 2 bis 5 codiert. Dies steht im Gegensatz zu allen anderen TLR, die nur durch 1 oder 2 Exone codiert werden.

1.5.2 TLR erkennen Pathogen assoziierte molekulare Muster (pathogen associated molecular patterns, PAMPs)

Jeder der TLRs erkennt und bindet einen anderen Liganden (Takeda *et al.*, 2003) (Abb. 5). TLR können außerdem multimere Komplexe formen (Homo- oder Heterodimere), um das Spektrum der Moleküle zu erweitern, die sie erkennen können (Medzhitov, 2001). Bei den Liganden der TLR handelt es sich um evulotionär stark konservierte molekulare Strukturen, sog. PAMPs. PAMPs sind innerhalb einer gegebenen Klasse von Mikroorganismen nicht variabel (z.B. konservierte Lipid A Stuktur in LPS) und sind essentiell für das Überleben dieser Mikroorganismen. Ihre konstitutive Expression und die stark konservierte Struktur machen sie zu idealen Zielmolekülen für die angeborene Immunabwehr. TLR, welche in die Erkennung der PAMPs involviert sind, gehören zur Gruppe der pattern recognition receptors (PRRs). Die Erkennung der PAMPs erfolgt sehr spezifisch. TLR2 erkennt LPS von *Porphyromonas ginigivitis* und *Leptospira interrogans*, während TLR4 durch das strukturell andersartige LPS aus Enterobakterien wie *Escherichia coli* und *Salmonella* aktiviert wird (Hirschfeld *et al.*, 2001; Werts *et al.*, 2001).

PAMPs werden sowohl von pathogenen als auch von nicht-pathogenen Mikroorganismen exprimiert, folglich können PRRs auch nicht zwischen diesen unterscheiden. Wie eine Toleranz gegenüber nicht-pathogenen Mikroorganismen erreicht wird, ist noch unklar. Verschiedene TLR besitzen unterschiedliche Expressions- und Lokalisationsmuster. TLR4 wird in humanen myeloiden Dendritischen Zellen (DC) und Monozyten auf der Zelloberfäche exprimiert, in respiratorischem Epithel hingegen, welches ständig einer Vielzahl von Pathogenen aus der Luft ausgesetzt ist, wurde eine intrazelluläre Expression beschrieben (Guillot *et al.*, 2004). Eine entzündliche Antwort auf Flagellin findet im Dünndarm nur auf eine Stimulation von basolateral, nicht von apikal hin statt (Gewirtz *et al.*, 2001), was darauf hindeutet, dass die Expression der TLR in differenzierten Darmepithelien polarisiert und möglicherweise nur auf die basolaterale Seite beschränkt ist.

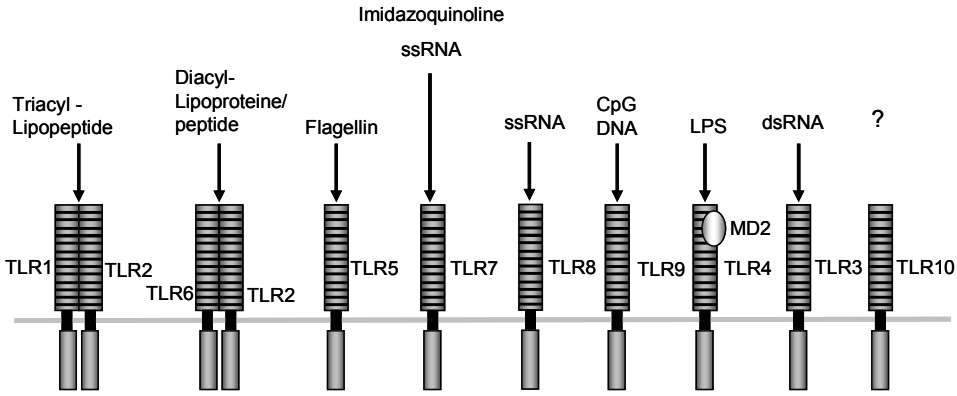


Abb. 5 TLR und ihre Liganden. TLR1-9 erkennen mikrobielle Komponenten. TLR2 ist essentiell für die Erkennung von mikrobiellen Lipopeptiden. TLR1 und TLR6 assoziieren mit TLR2, und erkennen feine Unterschiede zwischen Triacyl- bzw. Diacyl-Lipopeptiden. TLR4 erkennt LPS. TLR9 ist der Rezeptor für CpG DNA, wohingegen TLR3 in die Erkennung viraler dsRNA eingebunden ist. TLR5 ist ein Rezeptor für Flagellin. TLR7 wird durch Imidazoquinoline und virale einzelsträngige RNA (ssRNA) (Heil *et al.*, 2004) stimuliert. TLR8 erkennt ebenfalls virale ssRNA (Heil *et al.*, 2004), für TLR10 ist noch kein Ligand bekannt. Auf diese Weise unterscheidet die TLR Familie zwischen spezifischen Mustern mikrobieller Komponenten.

1.5.3 TLR sind in Zellen des Immunsystems exprimiert

TLR sind hauptsächlich in Immunzellen wie DC, Makrophagen und Neutrophilen exprimiert. Ausserdem sind sie in Epithelzellen der Schleimhaut und der Haut (Imler und Hoffmann, 2001) zu finden. Die Expression von TLR in DC unterscheidet sich je nach Subtyp (Kadowaki *et al.*, 2001; Krug *et al.*, 2001) und Reifestadium. Plasmacytoide DC (PDC) exprimieren TLR9, während dieser auf myeloiden DC nicht zu finden ist. Dafür besitzen letztere andere TLR wie TLR4, weshalb sie durch andere PAMPs z.B. LPS aktiviert werden (Akira *et al.*, 2001). Mastzellen exprimieren TLR2, 4, 6 und 8, aber nicht TLR5 (McCurdy *et al.*, 2001; Supajatura *et al.*, 2001). Die Unterschiede in der Zell-spezifischen und kompartimentalisierten Expression der TLR zusammen mit unterschiedlichen Signaltransduktionswegen ermöglichen es dem Immunsystem verschiedene Immunantworten gegen extrazelluläre Gram-negative und -positive Bakterien und intrazelluläre DNA Viren und Retroviren auszulösen.

1.5.4 TLR spielen eine Rolle in der angeborenen und der adaptiven Immunität

Die vorwiegende Expression der TLR in klassischen Immunzellen gibt einen Hinweis auf ihre Funktion. Neben der Erkennung von Pathogenen sind TLR für die unmittelbare Auslösung und Kontrolle einer akuten antimikrobiellen Abwehrreaktion verantwortlich (Thoma-Uszynski *et al.*, 2001; Takeda *et al.*, 2003). Eine Aktivierung der TLR führt in Immunzellen wie Neutrophilen und Makrophagen zu einer Induktion vieler pro-inflammatorischer Gene, die für Zytokine, Chemokine, Proteine des Komplementsystems, Enzyme wie Cyclooxygenase-2 (COX-2), Adhäsionsmoleküle und Immunrezeptoren codieren. Weiterhin werden eine Reihe von Effektormolekülen, wie induzierbare Nitric Oxide Synthase (iNOS) und AMPs induziert (Thoma-Uszynski *et al.*, 2001; Hayashi *et al.*, 2003). Viele TLR (TLR3, 4, 7 und 9) sind involviert in die Erkennung von Viren und die Produktion von Typ I IFN (Kurt-Jones *et al.*, 2000; Alexopoulou *et al.*, 2001; Lund *et al.*, 2003).

Auch für die adaptive Immunantwort haben die TLR Bedeutung (Abb. 6). DC als Schlüsselzellen der Verbindung zwischen angeborener und adaptiver Immunität (Banchereau und Steinman, 1998), exprimieren viele TLR (Visintin *et al.*, 2001). LPS, CpG DNA, Peptidoglykan, Lipoprotein und das Zellwandskelett von Mykobakterien induzieren TLR abhängig die Reifung von DC (Hemmi *et al.*, 2000; Tsuji *et al.*, 2000; Hertz *et al.*, 2001; Kaisho und Akira, 2001; Michelsen *et al.*, 2001). Weiterhin induziert TLR vermittelte Antigen- Erkennung in DC die Produktion von IL-12, welches eine Differenzierung von T Helfer (T_H) Zellen in T_H1 Effektorzellen (Akira *et al.*, 2001) und damit eine Antigen-spezifische adaptive Immunantwort auslöst (Banchereau und Steinman, 1998; Reis e Sousa, 2001).

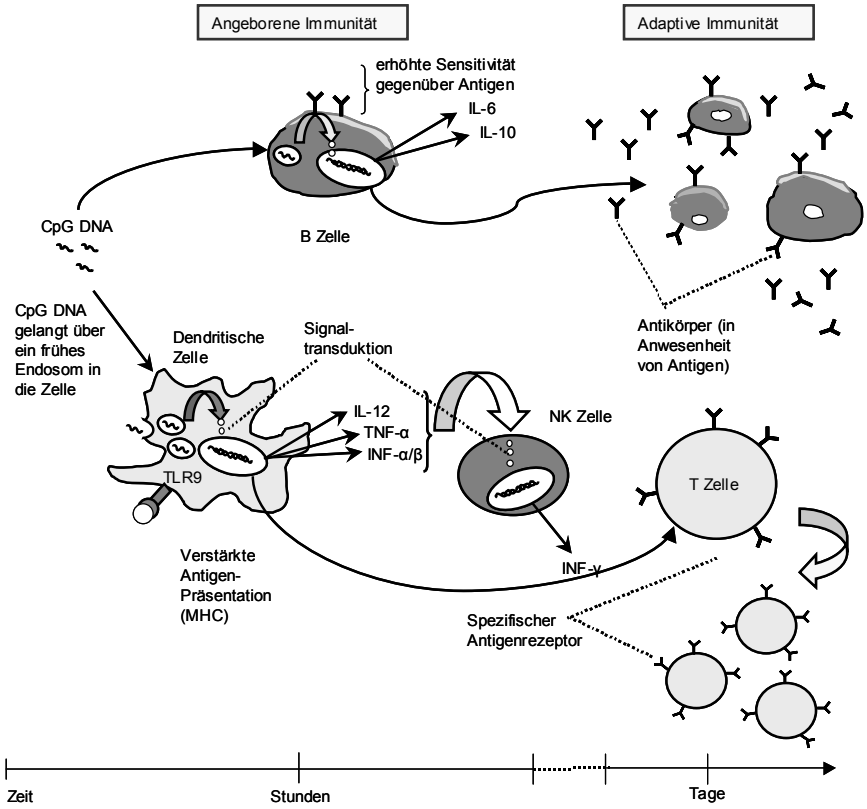


Abb. 6 Zellulärer Wirkmechanismus von CpG. DNA, welche ein oder mehr CpG Motive enthält wird in die meisten Zelltypen durch Endozytose aufgenommen, aktiviert aber nur Zellen, welche TLR9 exprimieren (humane B Zellen und PDC). Diese Zellen erzeugen dann ein T_H1 Zytokin Milieu, indem sie IFN-α, IFN-β, IL-12, IP-10 und andere T_H1 fördernde Zytokine und Chemokine sezernieren. NK Zellen werden sekundär aktiviert, sezernieren IFN-γ und bekommen lytische Aktivität. Weiterhin werden B Zellen gegenüber der Aktivierung durch ihren Antigen-Rezeptor sensibler, und sowohl B Zellen als auch PDC besitzen eine erhöhte Expression von kostimulatorischen Molekülen, wodurch ihre Fähigkeit, T Zell-Antworten zu aktivieren, verbessert wird. MHC, Major Histocompatibility Komplex.

All diese Vorgänge finden unter Beteiligung klassischer Immunzellen statt. Es ergibt sich die Frage, ob Epithelzellen, welche an der Körperoberfläche die erste Barriere gegen mikrobielle Eindringlinge bilden, auch an einer TLR vermittelten Abwehrreaktion teilnehmen. Eine Expression in Epithelzellen der Schleimhaut und der Haut ist bereits bekannt (Imler und Hoffmann, 2001). In Atemwegsepithelzellen induziert LPS TLR4-abhängig humanes β-Defensin-2 (hBD-2), IL-8 und IL-6 und aktiviert NF-κB (Becker *et al.*, 2000; Guillot *et al.*, 2004)

1.5.5 TLR besitzen gemeinsame Signalwege

1.5.5.1 MyD88-abhängiger Signalweg

TLR Signalwege werden von intrazytoplasmatischen TIR Domänen aus initiiert. Die Signaltransduktionswege der TLR Familie sind in hohem Maß homolog zu den Signaltransduktionswegen der IL-1R Familie. Beide interagieren mit dem Adapter-Protein myeloid differentiation marker 88 (MyD88), welches eine TIR Domäne in der C-terminalen Region und eine Death Domäne in der N-terminalen Region aufweist. MyD88 und TLR verbinden sich durch ihre jeweiligen TIR Domänen. Erfolgt eine Stimulation mit einem TLR Liganden, rekrutiert MyD88 eine Death Domäne enthaltende Serin/Threonin Kinase, die IL-1R-assoziierte Kinase (IL-1R-associated kinase; IRAK). IRAK wird durch Phosphorylierung aktiviert und verbindet sich daraufhin mit Tumor Nekrose Faktor Rezeptor (TNFR) - assoziiertem Faktor 6 (-Associated Factor 6; TRAF6), wodurch zwei unterschiedliche Signalwege, der c-Jun amino terminal kinase (JNK) / mitogen-activated protein (MAP) kinase - und der NF-κB Signalweg initiiert werden.

Abbildung 7 zeigt, dass MyD88 entscheidend für die Aktivierung des NF-κB Signalweges und somit Voraussetzung für die von allen TLR Liganden ausgelöste Entzündungsantwort ist. Ein Fehlen von MyD88 hat in vielen Fällen zur Folge, dass eine Reaktion auf TLR Liganden unterbleibt (Hacker *et al.*, 2000; Kawai *et al.*, 1999; Takeuchi *et al.*, 2000a; Takeuchi *et al.*, 2000b; Hayashi *et al.*, 2001; Hemmi *et al.*, 2002).

IRAK hat ebenfalls eine zentrale Rolle im TLR Signalweg. IRAK-4 Knockout Mäuse zeigten eine fast vollständige Beeinträchtigung in der Antwort auf TLR Stimuli (Suzuki *et al.*, 2002). Im Gegensatz dazu beobachtete man bei IRAK-1 Knockout Mäusen eine nur teilweise defekte LPS-Antwort (Swantek *et al.*, 2000). Man fand, dass IRAK-4 upstream von IRAK-1 agiert und IRAK-1 nach Stimulation phosphoryliert (Li *et al.*, 2002).

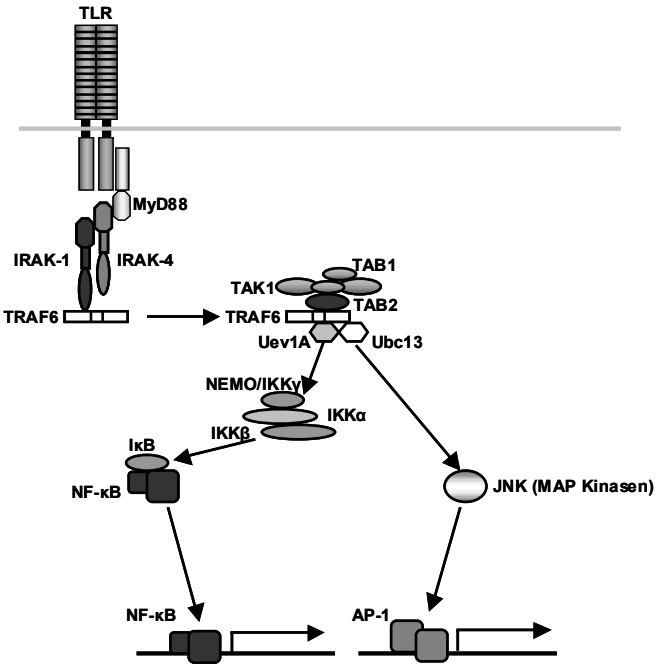


Abb. 7 TLR-vermittelter MyD88 abhängiger Signalweg. MyD88 bindet durch Wechselwirkung der jeweiligen TIR Domänen an das zytoplasmatische Ende der TLR. Nach Stimulation werden IRAK-4, IRAK-1 und TRAF6 zum Rezeptor rekrutiert, wodurch IRAK-1 und MyD88 über ihre Death Domänen verbunden werden. IRAK-4 phosphoryliert dann IRAK-1. Zusammen mit TRAF6 dissoziiert die phosphorylierte IRAK-1 vom Rezeptor. Dann tritt TRAF6 mit TAK1, TAB1 und TAB2 in Wechselwirkung. Der Komplex, welcher TRAF6, TAK1, TAB1 und TAB2 enthält bildet einen größeren Komplex mit Ubc13 und Uev1A, was die Aktivierung von TAK1 induziert. Aktivierte TAK1 phosphoryliert den IKK Komplex, welcher aus IKKα, IKKβ und NEMO/IKKγ und MAP Kinasen wie z.B. JNK besteht und induziert dadurch die Aktivierung der Transkriptionsfaktoren NF-κB bzw. AP-1.

1.5.5.2 MyD88-unabhängiger Signalweg

Für LPS und dsRNA fand man MyD88 unabhängige Signalwege. Der TLR3 Ligand dsRNA zeigt eine Aktivierung von NF-κB in MyD88 Knockout Zellen (Alexopoulou *et al.*, 2001). dsRNA aktiviert den MyD88-unabhängigen Signalweg, in dem die Aktivierung des Transkriptionsfaktors IRF-3 zur Induktion von IFN-induzierbaren Genen führt (Abb. 8).

TIR domain-containing adaptor inducing IFN-β (TRIF), ein weiteres Adapterprotein, scheint essentiell für diesen TLR3- und TLR4-vermittelten Signalweg zu sein (Horng

et al., 2002; Yamamoto *et al.*, 2002). Auch beim TLR9-vermittelten Signalweg mag TRIF eine Rolle spielen (Takeshita *et al.*, 2004).

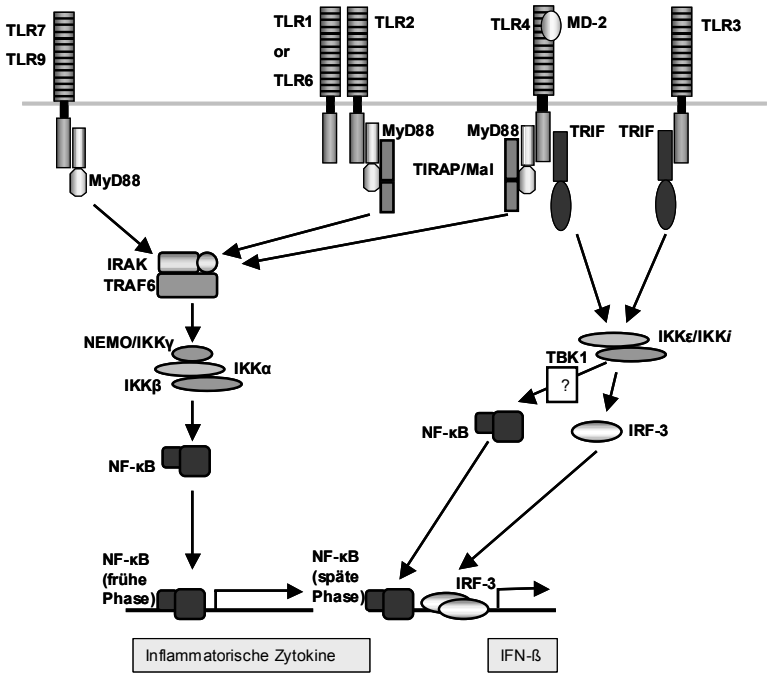


Abb. 8 TIR Domäne- enthaltende Adapter und TLR-Signaltransduktion. MyD88 ist ein essentieller TIR Domäne- enthaltender Adapter für die Induktion inflammatorischer Zytokine über alle TLR. TIRAP/Mal ist ein zweiter TIR Domäne- enthaltender Adapter der spezifisch den MyD88-abhängigen Signalweg über TLR2 und TLR4 vermittelt. In den TLR4- und TLR3-vermittelten Signalwegen existiert ein MyD88-unabhängiger Signalweg, der zur Aktivierung von IRF-3 über TBK1 und IKKε / IKKi führt. Der TIR Domäne- enthaltende Adapter TRIF vermittelt den ein MyD88-unabhängigen Signalweg.

Die eigenen Untersuchungen beschränken sich auf die TLR 9 und 3, weshalb auf diese im Folgenden näher eingegangen wird.

1.5.6 TLR9

1.5.6.1 TLR9 erkennt CpG Motive in bakterieller DNA

Den definitiven Beweis dafür, dass TLR9 in die Erkennung von mikrobieller DNA involviert ist lieferten Studien mit TLR9 Knockout Mäusen (Hemmi *et al.*, 2000). In

Menschen wird die Erkennung bakterieller DNA ebenfalls durch TLR9 vermittelt (Takeshita *et al.*, 2001). Die Expression von TLR9 in humanen Immunzellen wurde mit der Fähigkeit korreliert, auf bakterielle DNA mit einer gesteigerten IL-8 Sekretion und der Aktivierung von NF-κB zu reagieren (Bauer *et al.*, 2001). Transfektion von TLR9 in Zellen, die nicht auf bakterielle DNA reagieren, führte zu einer Immunantwort auf bakterielle DNA (Takeshita *et al.*, 2001). Für die immunstimulierende Aktivität der bakteriellen DNA sind unmethylierte CG Dinukleotide in einem bestimmten Basenkontext verantwortlich (sog. CpG Motive) (Krieg *et al.*, 1995). CpG Motive enthaltende DNA aktiviert Immunzellen wie z.B. Makrophagen, Lymphozyten, Natürliche Killer (NK) Zellen und DC, die daraufhin eine Vielfalt an Zytokinen sezernieren, wie z.B. IL-6, IL-12, IL-18, TNF-α und IFN-γ (Krieg, 1996; Lipford *et al.*, 1998; Yamamoto *et al.*, 2000; Ashkar und Rosenthal, 2002). Die Unterscheidung zwischen Eigen und Fremd ist auf eine gesteigerte Häufigkeit und die fehlende Methylierung von CpG Motiven in bakterieller DNA im Gegensatz zur humanen DNA zurückzuführen. Neben der Sequenz- existiert zusätzlich die Spezies-Spezifität. So ist für die Stimulation von Maus- oder Kaninchen- Immunzellen das Motiv GACGTT (Krieg *et al.*, 1995; Yi *et al.*, 1998; Rankin *et al.*, 2001) und für menschliche Immunzellen das Motiv GTCGTT (Hartmann und Krieg, 2000) optimal. Unterschiedliche Cluster von immunstimulierenden CpG ODN haben unterschiedliche Effekte: „D“ ODN stimulieren vorzugsweise die INF-γ Produktion bei NK Zellen, „K“ ODN steigern dagegen die Zellproliferation und die Produktion von IL-6 und IgM in Monozyten und B Zellen (Verthelyi *et al.*, 2001). Eine weitere Klasse vereinigt die Eigenschaften der beiden vorangegangenen (Hartmann *et al.*, 2003).

1.5.6.2 TLR9 ist intrazellulär lokalisiert und bindet direkt an CpG DNA

Obwohl die Information über die Sequenz von TLR9 darauf hindeutet, dass TLR9 ein membranständiger Rezeptor ist, gab es lange Zeit keine Daten zur Lokalisation in der Zelle. Zunächst wurde durch FACS-Analyse nachgewiesen, dass HEK293 Zellen nach Transfektion mit murinem TLR9 denselben auf der Zelloberfläche exprimieren (Chuang *et al.*, 2002). Neuere Studien zeigen, dass für die Aktivierung von TLR9 in murinen Makrophagen die Internalisierung und endosomale Reifung der CpG DNA Voraussetzung ist. Auch die FACS- Analyse ergab Hinweise auf eine intrazelluläre

Lokalisation des TLR9 (Ahmad-Nejad *et al.*, 2002). Untersuchungen in DC und Makrophagen bestätigen diese These und zeigen eine Expression von TLR9 im endoplasmatischen Retikulum (ER) (Latz *et al.*, 2004). Von der Aufnahme der CpG DNA in die Zelle und der Initiation der Signaltransduktion hat man folgende Vorstellung: die CpG DNA wird über einen Clathrin-abhängigen Endozytose-Mechanismus aufgenommen und gelangt in ein tubuläres lysosomales Kompartiment. TLR9 und MyD88 werden sofort zur CpG DNA transportiert. Dort bindet die CpG DNA direkt an TLR9 und initiiert Signaltransduktion (Latz *et al.*, 2004).

1.5.7 TLR3

1.5.7.1 TLR3 erkennt dsRNA

dsRNA ist eine Struktur, welche mit viraler Infektion assoziiert ist. Sie wird von den meisten Viren während der Replikation produziert (Jacobs und Langland, 1996), induziert Typ I Interferone (IFN-α und –β) (Stark *et al.*, 1998; Guidotti und Chisari, 2001) und fördert die Reifung von DC. Einige synthetische dsRNAs wie polyinosinic-polycytidylic acid [poly(I:C)] sind in ihrer Aktivität vergleichbar mit viraler dsRNA (Alexopoulou *et al.*, 2001). Die Anwesenheit von viraler dsRNA inhibiert die virale Proteinsynthese durch Aktivierung der PKR und des 2',5'-OAS / RNase L Systems. Fibroblasten von PKR Knockout Mäusen zeigten unvollständige Immunantworten auf dsRNA und poly(I:C), wobei einige Reaktionen erhalten blieben (Yang *et al.*, 1995; Chu *et al.*, 1999). Hinweise auf eine Beteiligung des TLR3 und MyD88 bei der Erkennung und Signaltransduktion von dsRNA lieferten die Untersuchungen von Alexopoulou et al. (Alexopoulou *et al.*, 2001). Die Expression von humanem TLR3 in der Zelllinie 293, die keine Reaktion auf dsRNA zeigt, bewirkte eine gesteigerte Aktivierung von NF-κB nach Zugabe von viraler dsRNA und poly(I:C). TLR3 Knockout Mäuse weisen eine verminderte Immunantwort auf poly(I:C) und Resistenz gegenüber dem tödlichen Effekt von poly(I:C) bei Sensitisierung mit D-Galactosamin auf. In der Antwort auf poly(I:C) scheint TLR3 in die Zytokinproduktion über den MyD88-abhängigen Signalweg involviert zu sein, wobei die Reifung von DC und die Aktivierung von NF-κB und MAP Kinasen über den MyD88 unabhängigen Signalweg erfolgt. Die Tatsache, dass TLR3 nicht auf PDC exprimiert ist (Kadowaki *et al.*, 2001), dem Zelltyp, der

hauptsächlich für die Produktion von TypI IFN bei einer Virusinfektion verantwortlich ist, lässt vermuten, dass neben TLR3 noch andere Rezeptoren an der Erkennung von dsRNA beteiligt sind. Wie oben erwähnt, ist die Struktur und die genomische Organisation des TLR3 im Vergleich zu anderen TLR anders, was eventuell ein Hinweis auf weitere Funktionen neben der Erkennung von dsRNA ist.

1.5.8 TLR als mögliche Zielmoleküle für die Therapie verschiedener Krankheiten

TLR sind aufgrund ihrer zentralen Bedeutung für das Immungeschehen mögliche Zielmoleküle für die Therapie verschiedenster Erkrankungen (Zuany-Amorim *et al.*, 2002a). Viel versprechende Ansätze sind die Applikation von bakteriellen Vakzinen oder die Verwendung selektiver TLR Liganden wie CpG ODN (Krieg, 2002). Eine Verschiebung von T_H2- hin zu T_H1- Immunantworten und damit eine positive Beeinflussung von Asthma konnte durch die Applikation von Bakterien und bakteriellen Extrakten erreicht werden (Shirakawa *et al.*, 1997; Ray und Cohn, 1999; Sano *et al.*, 1999; Zuany-Amorim *et al.*, 2002b).

Es wurde in einem Maus-Asthma-Modell gezeigt, dass eine Kombination von CpG DNA und Allergen effektiv eine etablierte atopische eosinophile Atemwegsentzündung rückgängig machen kann (Kline *et al.*, 2002). CpG DNA vermittelte Aktivierung von TLR9 stellt damit eine effektive Methode zur Induktion prophylaktischen und therapeutischen Schutzes gegen atopische Krankheiten dar.

CpG DNA zeigte in mehreren experimentellen Modellen Wirksamkeit bei der Verhinderung oder der Behandlung von Tumorentwicklung oder –metastasierung (Krieg, 2002). CpG ODN induzieren Antikörper- abhängige zelluläre Toxizität (Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity; ADCC). In Maus-Modellen haben sich CpG ODN in der Verstärkung der Wirkung von Antitumor-Antikörpern als extrem effektiv erwiesen. Studien am Menschen werden im Moment durchgeführt (Krieg, 2002).

TLR9 Antagonisten könnten einen Platz in der Therapie von Autoimmunkrankheiten erlangen, indem sie die Proliferation und Auto-Antikörper-Produktion autoreaktiver B Zellen blockieren (Shlomchik *et al.*, 1987; Tan, 1989; Rifkin *et al.*, 2000; Leadbetter *et al.*, 2002).

2 Fragestellung

Ziel der Studie war es, Entzündungsvorgänge im Atemwegsepithel durch die Applikation von Nukleinsäuren zu modifizieren.

Entzündung ist ein Kennzeichen vieler Lungenerkrankungen wie Asthma und COPD. In den letzten Jahren hat es große Fortschritte im Verständnis der molekularen Prozesse gegeben, die der Entwicklung von Entzündung in Asthma und COPD zugrunde liegen. Daraus haben sich neue Therapieansätze wie auch die Applikation kleiner Nukleinsäuren entwickelt. In der vorliegenden Studie wird untersucht, ob die Applikation von AS ON und siRNA die Genexpression im entzündeten Atemwegsepithel modifizieren kann. Als Zielmolekül diente die p65 Untereinheit von NF-κB. Dieses Molekül ist in die Regulation vieler inflammatorischer Gene involviert.

Im Verlauf der Studie wurde festgestellt, dass kleine Nukleinsäuren Entzündung in Atemwegsepithel verursachen können. Daraus ergab sich das Ziel, die Rolle des humanen Atemwegsepithels bei der Erkennung von Pathogenen und seine Bedeutung in der angeborenen Immunität zu untersuchen.

3 Material und Methoden

3.1 Medien und Reagenzien

Zelllinien. 1HAEo- und 16HBE14o- Zellen wurden in Dulbecco`s modified Eagle Medium (DMEM) mit 10 % FCS (fötales Kälberserum, foetal calf serum) kultiviert. Das Kulturmedium für die Zelllinie MM-39 bestand aus einer 1 : 1 Mischung von DMEM und HAM F-12 mit 10 % BAS (adultes Rinderserum, bovine adult serum), 2 % Ultroser G (Biosepra, Fremont, USA). Calu-3 wurden in HAM-F12 : DMEM = 1 : 1 mit 10 % FCS und BEAS-2B in RPMI mit 10 % FCS kultiviert. Alle Kulturmedien enthielten Penicillin G (100 IU / ml) und Streptomycin Sulfat (100 IU / ml).

3.2 Primärkulturen von humanem Atemwegsepithel

Primärkulturen von humanem Atemwegsepithel wurden von der Trachea und den Bronchien durch enzymatischen Verdau mittels Protease (Sigma, Taufkirchen, Deutschland) gewonnen wie schon beschrieben (Kondo *et al.*, 1991; Yamaya *et al.*, 1992; Zabner *et al.*, 1996). Anschließend wurden sie bis zu einer Konfluenz von 70-80% auf Petrischalen in airway epithelial cell growth Medium (PromoCell, Heidelberg, Deutschland) kultiviert. Die Epithelzellen wurden vereinzelt und auf mit Collagen vorbeschichtete, semipermeable Membranen mit einer Porengröße von 0,4-µm (Millicell-HA; Durchmesser 12 bzw. 30 mm; Millipore Corp., Bedford, Massachusetts) aufgebracht. Nachdem sie konfluent gewachsen waren, wurde das Medium von apikaler Seite entfernt und die Zellen konnten an der Grenzfläche zwischen Luft und Flüssigkeit (als sog. air liquid interface Kultur) wachsen wie schon beschrieben (Yamaya *et al.*, 1992) (Abb. 9). Das Kulturmedium bestand aus einer 1 : 1 Mischung von DMEM und HAM F-12 mit 2 % Ultroser G (Biosepra, Fremont, USA), Penicillin G (100 IU / ml) und Streptomycin Sulfat (100 IU / ml). Die Ausbildung von tight junctions wurde durch Messung des transepithelialen Widerstands (Widerstand > 1,000 $\Omega \cdot cm^2$) überprüft. Alle in diesen Experimenten verwendeten Kulturen waren über zwei Wochen alt und vollständig ausdifferenziert. Frühere Studien zeigten, dass differenziertes Epithel in diesem Modell mehrreihig ist und Zilien tragende Zellen (Cytokeratin 18 positiv), sekretorische Zellen mit Granula und Basalzellen (Cytokeratin 14 positiv) umfasst (Yamaya *et al.*, 1992; Zabner *et al.*,

1996). Das Protokoll wurde von der Ethikkommission der Universitäten München und Marburg genehmigt und die Zustimmung der aufgeklärten Patienten wurde eingeholt.

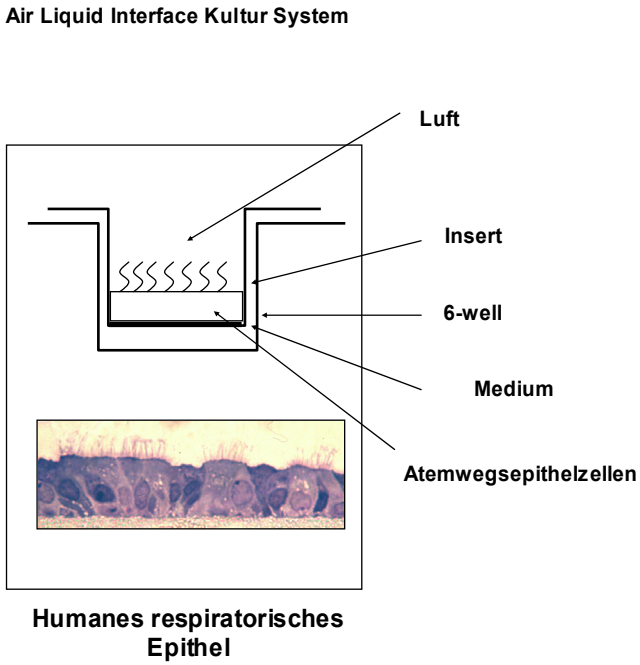


Abb. 9 *Air liquid interface Kultursystem*. Primärkulturen von humanem Atemwegsepithel werden auf mit Collagen vorbeschichtete, semipermeable Membranen aufgebracht. Die Zellen sind von apikaler Seite der Luft ausgesetzt und werden von basolateral mit Medium versorgt. Die Ausdifferenzierung erfolgt innerhalb von 2-3 Wochen

.

3.3 Modell für die Zigarettenrauchexposition

Die air liquid interface Kulturen wurden in die Expositionskammer gestellt. Eine Pumpe erzeugte von außen an der Expositionskammer ein Vakuum, was einen kontinuierlichen Einstrom von Zigarettenrauch gewährleistete. Ein kleiner Ventilator innerhalb der Kammer verteilte den Zigarettenrauch dabei gleichmäßig. Feuchte, 37°C warme Luft wurde aus einem Zellkulturinkubator eingeleitet. Die Expositionskammer befand sich ebenfalls in einem Zellkulturinkubator (Abb. 10).

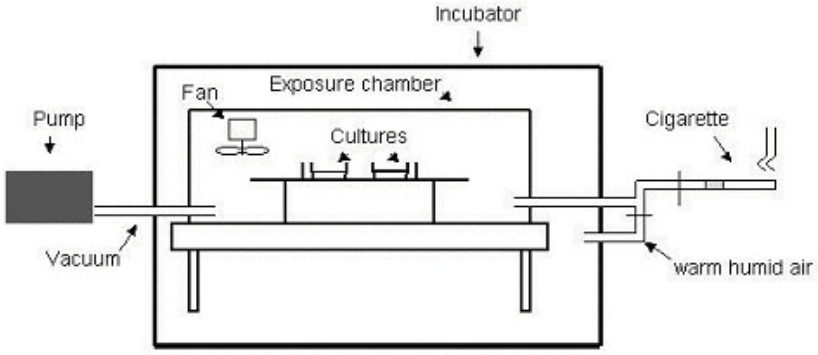


Abb. 10 Schematische Zeichnung des Modells für die Zigarettenrauchexposition.
(aus: C. Beisswenger et al. Exposure of Differentiated Airway Epithelial Cells to Volatile Smoke in vitro. *Respiration*, 2004, in press)

3.4 Reagenzien

DNA aus *Escherichia coli* und humane DNA wurden von Sigma (Taufkirchen, Deutschland; Endotoxin Gehalt in 100 µg / ml weniger als 20 ng / ml, Acila AG, Moerfelden, Deutschland) bezogen. Bakterielle DNA aus *Porphyromonas ginigivalis* wurde freundlicherweise von K. Heeg (Mikrobiologie, Philipps-Universität Marburg, Deutschland) zur Verfügung gestellt. Diese DNA wurde intensiv auf die Abwesenheit von kontaminierendem LPS getestet. PTO-modifizierte ODN wurden von MWG Biotech (München, Deutschland) synthetisiert. Die folgenden Sequenzen wurden verwendet (die fett gedruckten Buchstaben kennzeichnen die CpG Motive oder die GpC Motive der Kontroll-ODN): 2006, T**CG** T**CG** TTT TGT **CG**T TTT GT**C** **G**TT; 2006GC, T**GC** T**GC** TTT TGT **GC**T TTT GT**G** **C**TT. IFNγ wurde von Roche (Mannheim, Deutschland) bezogen. Polyinosin-cytidyl-Säure (polyinosinic-cytidylic acid; poly(I:C)), Polycytidyl-Säure (polycytidylic acid; poly(C)), Polyadenyl-uridyl-Säure (polyadenylic-uridylic acid; poly (A:U)) und Polydeoxyinosin-deoxycytidyl-Säure (polydeoxyinosin-deoxycytidyl acid; poly (dI:dC)) wurden von Sigma (Taufkirchen, Deutschland) bezogen.

3.5 AS ON und siRNA Duplexe gegen die p65 Untereinheit von NF-κB

Vollständig PTO-modifizierte AS ON und siRNA Duplexe wurden von MWG Biotech (München, Deutschland) synthetisiert. Die folgenden Sequenzen wurden verwendet: AS (as.p65), 5'-GCC ATG GAC GAA CTG TTC CCC-3'; Sense (s.p65), 5'-GGG AAC AGT TCG TCC ATG GC -3' (Faure *et al.*, 2001); siRNA.p651, sense: 5'- CAA CAA CCC CUU CCA AGU UdTdT, antisense: dTdT GUU GUU GGG GAA GGU UCA A-5'; siRNA.p652, sense: 5'- CCC CUU CCA AGU UCC UAU AdTdT, antisense: dTdT GGG GAA GGU UCA AGG AUA U-5'; siRNA.scr, sense: 5'- GCG CGC UUU GUA GGA UUC G dT dT, antisense: dTdT CGC GCG AAA CAU CCU AAG C-5'. Die siRNA Duplexe wurden in der 2'entschützten und entsalzten Form synthetisiert.

3.6 Messung der Zytokin –Konzentration

Zytokin-Konzentrationen in Zellkulturüberständen wurden mittels eines kommerziell erhältlichen ELISA Kits für IL-6 und IL-8 nach Anleitung des Herstellers (R&D Systems, Wiesbaden-Nordenstadt, Deutschland) bestimmt.

3.7 Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)

Die total-RNA der Zellen wurde mittels des RNeasy Mini Kits (Qiagen, Hilden, Deutschland) isoliert. Die RNA Isolation umfasste einen DNase Verdau mittels des RNase free DNase Sets (Qiagen, Hilden, Deutschland). Eine Gesamtmenge von 1,5 µg Gesamt-RNA wurde unter Verwendung des cDNA Synthese Kits (MBI Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland) mittels oligo(dT)18 umgeschrieben. Die cDNA wurde 1 / 5 vedünnt und 5 µl wurden als template in einem 25 µl TaqMan-PCR Mix (PE Biosystems, Weiterstadt, Deutschland) bzw. einem 25 µl SyBR Green PCR Mix (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) nach Anleitung des Herstellers verwendet. GAPDH Primer (sense, GAA GGT GAA GGT CGG AGT C; antisense, GAA GAT GGT GAT GGG ATT TC), TLR9 Primer (sense, ACT TCA CCT TGG ATC TGT CAC G; antisense, GCT TAT TGC GGG ACA GGT CTA), TLR3 Primer (sense, CCT GCA GCT GAC TAG GAA CT; antisense, TGC TGC AAA TCG AGA ATT T), hBD-2 Primer (sense TCA GCT CCT GGT GAA GCT C; antisense, GGG CAA AAG ACT GGA TGA CA) und p65 Primer (sense, 5'-CGA CCT GAA TGC TGT GCG GC-3'; antisense, 5'-GAT CTC ATC CCC ACC GAG GC-3') wurden von TIB Molbiol (Berlin, Deutschland) bezogen. Die fluoreszierenden Sonden (6-Carboxyflourescein, FAM) waren (X kennzeichnet TAMRA): GAPDH, 6FAM-CAA GCT TCC CGT TCT CAG CC X; TLR9, 6FAM-TGT TTG CCC AGC TCT CGC ACC X; hBD-2 6FAM-CCA TCA GCC ATG AGG GTC TTG TAT CTC C X. Die Spezifität der RT-PCR wurde durch das Weglassen der template cDNA oder der RT Reaktion sichergestellt. Quantitative PCR Resultate wurden mittels der ΔΔCT Methode erhalten. Da die PCR Effizienz für alle Reaktionen vergleichbar war, wurden die Schwellenwerte auf GAPDH normalisiert und in Relation zu unstimulierten Kontrollzellen gesetzt.

3.8 FACS (Fluorescent Activated Cell Sorting)-Analyse

Ein Phycoerythrin (PE) markierter Antikörper gegen TLR9 und die entsprechende Isotypkontrolle wurden von ebioscience (San Diego, USA) bezogen. Die Zellen wurden vereinzelt, in PBS / 2 % FCS gewaschen und in PBS / 2 % Paraformaldehyd fixiert. Für eine intrazelluläre Färbung wurden die Zellen mit PBS / 0.5 % Saponin / 2 % FCS permeabilisiert. Die Permeabilisierung entfiel bei der Oberflächenfärbung. Eine Mio Zellen wurden mittels eines Partec PAS Flow Cytometers (DAKO, Hamburg, Deutschland) analysiert, die Auswertung der Daten erfolgte mittels der WinMDI Software.

3.9 Luciferase Reporter Plasmid Assay

Um den Effekt von CpG DNA auf die Expression von NF-κB zu bestimmen, wurden 1HAEo- Zellen transient mit verschiedenen Plasmiden transfziert. "5xNF-κB-luc"exprimiert Firefly Luciferase unter der Kontrolle eines Promoters welcher fünf NF-κB-Bindungsstellen aufweist. "ß-Actin Renilla" enthält eine Renilla Luciferase mit einem ß-Actin Promoter (Miyazaki *et al.*, 1989). "ΔMyD88" ist eine dominant negative Form von MyD88, einem Adapterprotein welches in der Signaltransduktion der TLR eine entscheidende Rolle spielt (Muzio *et al.*, 1997). IRAK-DD ist eine dominat negative Form von IRAK-1, welches ebenfalls ein zentrales Element im TLR Signaltransduktionsweg ist. "ΔMyD88" und der Leervektor "pcDNA3" wurden freundlicherweise von Catherine MGreene (Royal College of Surgeons in Ireland, Dublin, Irland), "5xNF-κB-luc" und "IRAK-DD" von Christian Kupatt (Universität München, Deutschland) zur Verfügung gestellt. Zellen wurden mittels Effectene (Qiagen, Hilden, Deutschland) nach Anleitung des Herstellers transfiziert. 24 h vor der Transfektion wurden 2,5 x 10^4 Zellen pro well in einer 24-well Platte ausgesät. Für die Transfektion wurde eine absolute Menge von 0,2 µg Plasmid DNA pro well verwendet. Verschiedene Verhältnisse von 5xNF-κB-luc und ΔMyD88 oder pcDNA3 wurden getestet. Das Verhältnis (Masse / Volumen) von Plasmid DNA zu Effectene war 1 / 10. Die Transfektionskomplexe verblieben für 6 h auf den Zellen, dann wurden sie entfernt und das Medium wurde gegen normales Wachstumsmedium ausgetauscht. 24 h nach der Transfektion, wurden die Zellen für 24 h mit bakterieller oder humaner DNA (100 µg / ml) stimuliert. Die Bereitung des Zelllysats und der

Luciferase Assay wurden nach den Anleitungen des Herstellers (Dual-Luciferase Reporter Assay System, Promega, Mannheim, Deutschland) unter Verwendung eines Luminometers FB12 (Berthold Detection Systems, Pforzheim, Deutschland) durchgeführt.

3.10 Transfektionsprotokoll für AS ON und siRNAs

Zellkulturen wurden mit nackten Nukleinsäuren oder mit Nukleinsäuren, welche mit Oligofectamine (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) oder jetSI (Qbiogene, Heidelberg, Deutschland) komplexiert wurden, transfiziert. 24 h vor der Transfektion wurden die Zellen vereinzelt und auf 96- oder 24 well Platten mit 7,0 x 10^3 bzw. 25 x 10^3 Zellen pro well ausgesät. Die Konzentration der Nukleinsäuren betrug 2 bzw. 7 µg / ml wenn nicht anders angegeben. Im Falle der Transfektion mit jetSI blieben die Komplexe für 4 h auf den Zellen, dann wurden sie entfernt und das Medium wurde gegen normales Wachstumsmedium ausgetauscht. Im Falle der Transfektion mit Oligofectamine und den nackten Nukleinsäuren blieben die Komplexe für 24 h (bzw. 72 h) auf den Zellen. 24 h nach der Transfektion wurden die Zellen für 1 h mit TNF-α (10 ng / ml) stimuliert. Das Medium wurde gegen normales Wachstumsmedium ausgetauscht und die Überstände wurden für die Messung der Zytokine IL-6 und IL-8 nach 6 h gesammelt. Ausdifferenzierte Primärzellen des Atemwegsepithels als air liquid interface Kulturen wurden mit 2,8 µg siRNA Duplex (bzw. 5 µM AS ON) pro well von apikaler Seite nackt oder mit Oligofectamine bzw. jetSI komplexiert transfiziert. Undifferenzierte Primärzellen wurden sofort nach dem Aussäen transfiziert.

3.11 Western Blot Analyse

Die Zellen wurden für 10 min in Laemmli Probenpuffer (Zusammensetzung: 25 ml 4xTris HCl / SDS, pH 6,8 (0,1 M), 20 ml Glycerol [20 % (w / v)], 4 g SDS [4 % (w / v)], 2 ml ß-Mercaptoethanol, 1 mg Bromphenolblau [0.001 % (w / v)] gekocht. Proteinkonzentrationen wurden mit der Amidoschwarz-Methode bestimmt. 10 µl Probe wurden mit 190 µl destilliertem Wasser und 800 µl Amidoschwarz-Lösung (90 % Methanol, 10 % Essigsäure, Amidoschwarz) versetzt. Es wurde 10 min

zentrifugiert und der Rückstand mit 1 ml Waschlösung (90 % Methanol, 10 % Essigsäure) gewaschen. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt wurde der Rückstand in 1 ml 0,2 M NaOH gelöst und die Absorption bei 615 nm gemessen (OD 1 = 30 µg Protein). Die Lysatkonzentrationen wurden angepasst um gleiche Proteinlademengen zu gewährleisten. Protein Aliquots wurden auf einem 10 % Polyacrylamid Gel (Biorad, München, Deutschland) getrennt, auf eine Nitrozellulosemembran übertragen, mit Puffer, (PBS, 10 % fettarmes Milchpulver) geblockt und mit 1 µg / ml Anti-p65 Antikörper (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, Kalifornien) inkubiert. Nach mehreren Waschschritten wurde ein Anti-Kaninchen Sekundärantikörper (4,0 ng / ml), welcher mit Rettichperoxidase (Pierce, Bonn, Deutschland) markiert war, zugegeben. Die Membran wurde mit einem Chemilumineszenz Kit (Pierce, Bonn, Deutschland) inkubiert. Zur Detektion wurde ein Röntgenfilm aufgelegt.

3.12 Markierung der siRNA

Die siRNA wurde mittels des Silencer siRNA Labeling Kits (Ambion, Huntingdon, Cambridgeshire, Großbritannien) nach den Anweisungen des Herstellers markiert. Die siRNA wurde mit Nuklease-freiem Wasser verdünnt und mit Labeling Puffer und FAM- Labeling Reagenz gemischt. Nach 1 h wurde die markierte siRNA mit Ethanol gefällt, gewaschen und in Nuklease-freiem Wasser resuspendiert. Das Verhältnis Base : Farbstoff wurde durch Messung der Absorption der markierten siRNA bei 260 nm und bei der Wellenlänge der maximalen Absorption für FAM (492 nm) gemessen. Die Konzentration der markierten Duplex war 17,45 µM, das Verhältnis Base : Farbstoff betrug 73,3. 1HAEo- Zellen wurden auf Glasobjektträger (Lab-Tek-Chamber Slide System, NUNC, Wiesbaden, Deutschland, 2,5 x 10^4 Zellen pro Kammer) ausgesät. Nach 24 h wurden sie mit siRNA.p65 wie oben beschrieben transfiziert. 1HAEo- Zellen wurden mit PBS / 2 % Paraformaldehyd fixiert. Nach drei Waschschritten wurden die Zellen mit Antifade Reagenz (Molecular Probes, Leiden, Niederlande) eingedeckelt bevor sie mit einem konfokalen Laser Mikroskop (LSM 510 Meta, Zeiss, Jena, Deutschland) untersucht wurden. Die Bilder wurden in die Zeiss Image Examiner Version 5.0 importiert und entweder direkt analysiert oder in ein TIF Format für die Analyse mittels des Scion Imagers (Scion Corporation, Frederick, MD, USA) exportiert. Alexa Fluor 546 markiertes Transferrin (Molecular

Probes, Leiden, Niederlande) wurde gleichzeitig mit der markierten siRNA zu den Zellen gegeben.

3.13 Statistische Analyse

Die Werte sind als Mittelwerte ± SEM dargestellt. Vergleiche zwischen Gruppen wurden mittels des T Tests (zweiseitig) oder mittels ANOVA bei Experimenten mit mehr als zwei Untergruppen analysiert. Post hoc Tests wurden mittels T Test (zweisitig) mit Bon-ferroni Anpassung durchgeführt. Ergebnisse für $P < 0,05$ wurden als statistisch signifikant betrachtet.

4 Ergebnisse

4.1 AS ON und siRNA modifizieren die epitheliale Entzündungsreaktion

4.1.1 as.p65 verringert die Sekretion von Zytokinen in Reaktion auf eine Stimulation mit TNF-α und Zigarettenrauch im Atemwegsepithel

Der Einfluss des AS ON gegen p65 auf die Sekretion von pro-inflammatorischen Mediatoren in Antwort auf eine Stimulation mit TNF-α wurde durch Messung der pro-inflammatorischen Zytokine IL-6 und IL-8 bestimmt. Eine Stimulation mit TNF-α wurde gewählt, da Signalkaskaden abwärts von TNF-α die Aktivierung von NF-κB einschließen. Experimente mit 1HAEo- Zellen in konventioneller Kultur ergaben, dass die Applikation des nackten as.p65 keine signifikante Verringerung der IL-8 Sekretion zur Folge hatte (Abb. 11 A). Die Applikation von as.p65 im Komplex mit Oligofectamine dagegen senkte die IL-8 Sekretion wenig, aber signifikant im Vergleich zum Sense ON (s.p65) (Abb. 11 A).

Anschließend wurde der Einfluss von as.p65 auf die Sekretion von IL-8 und IL-6 im air liquid interface Kultursystem untersucht. Vollständig ausdifferenzierte Primärzellen wurden mit as.p65 und s.p65 behandelt bevor eine Stimulation mit TNF-α erfolgte. Die IL-8 und IL-6 Sekretion der Zellen, welche mit as.p65 behandelt wurden, war signifikant geringer als die der mit s.p65 behandelten Zellen (Abb. 11 B). An der Zelllinie MM-39 wurde der Unterschied zwischen apikaler und basolateraler Applikation der ON untersucht. Eine Behandlung mit den ON von basolateral hatte einen geringfügig stärkeren Effekt bezüglich der Absenkung der IL-6 Sekretion als von apikal (Abb. 11 C).

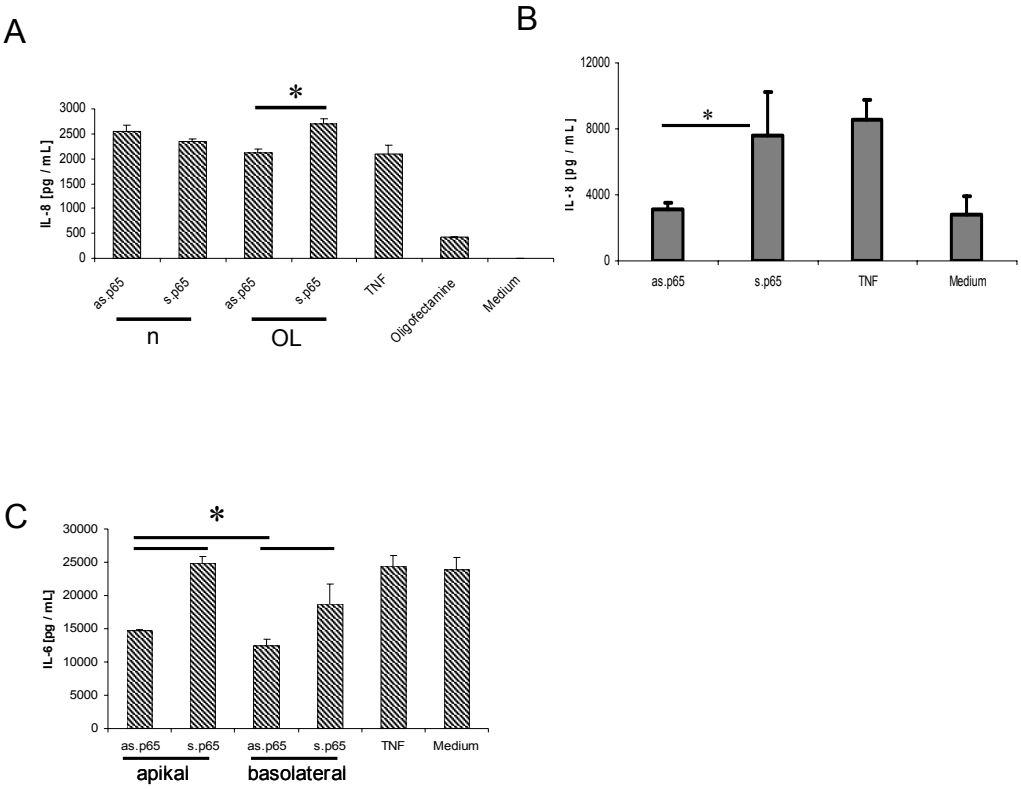


Abb. 11 Inhibition der Sekretion von Entzündungsmediatoren durch as.p65. *A. Konventionelle Kultur*. 1HAEo- Zellen in konventioneller Kultur wurden mit nackten (n) as.p65 bzw. s.p65 (0,2 µM) oder im Komplex mit Oligofectamine (OL) transfiziert. Anschließend wurde mit TNF-α (10 ng / ml) für 1 h stimuliert und in den Überständen IL-8 gemessen. *B, C*. Vollständig ausdifferenzierte Primärzellen (*B*) und MM-39 Zellen (*C*) wurden mit nackten as.p65 bzw. s.p65 (5 µM) transfiziert (Primärzellen von apikal, MM-39 Zellen von apikal und basolateral). Anschließend wurde mit TNF-α (10 ng / ml) für 1 h stimuliert und IL-8 bzw. IL-6 nach 6 h in den Überständen gemessen. Signifikante Unterschiede von $P < 0,05$ sind mit * ($n = 4$) markiert.

Zigarettenrauch induziert in Atemwegsepithel Entzündung, welche durch eine Aktivierung von NF-κB und eine gesteigerte Sekretion pro-inflammatorischer Zytokine charakterisiert ist (Anto *et al.*, 2002). Um zu untersuchen, ob as.p65 auch hier eine Verringerung der Sekretion von IL-8 und IL-6 bewirkt, wurden vollständig ausdifferenzierte Primärzellen mit as.p65 bzw. s.p65 vorbehandelt und anschließend mit Zigarettenrauch (CS) inkubiert (Abb. 10). Kulturen, welche mit as.p65 vorbehandelt waren gaben im Vergleich zu den mit s.p65 behandelten Zellen signifikant weniger IL-6 in das Medium ab (Abb. 12).

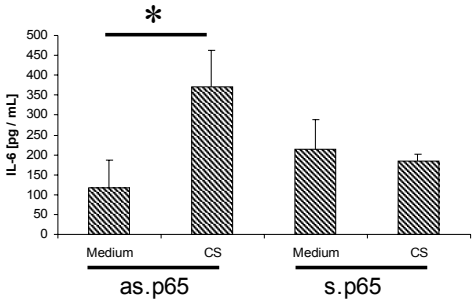


Abb. 12 Inhibition der Sekretion von Entzündungsmediatoren durch as.p65. Vollständig ausdifferenzierte Primärzellen wurden mit nackten as.p65 oder s.p65 (5 µM) vorbehandelt und anschließend mit Zigarettenrauch (CS) inkubiert. IL-6 wurde nach 8 h in den Überständen gemessen. Signifikante Unterschiede von $P < 0,05$ sind mit * ($n = 4$) markiert.

4.1.2 AS ON werden je nach Applikationsform unterschiedlich in die Zellen des Atemwegsepithels aufgenommen

Zunächst wurden die Aufnahme und der Verbleib der AS und Sense ON in der Zelle untersucht. Hierzu wurden 1HAEo- Zellen auf Objektträgern mit Fluorescein Isothiocyanat (FITC) markierten AS bzw. Sense ON nackt oder im Komplex mit Oligofectamine transfiziert. Die Zellen wurden fixiert und mittels konfokaler Mikroskopie untersucht. AS ON im Komplex mit Oligofectamine waren nach der Aufnahme in die Zellen fast ausschließlich im Zellkern lokalisiert, nur ein geringer Teil befand sich im Zytoplasma der Zellen (Abb. 13 A). Im Gegensatz dazu wurden nackte AS ON in wesentlich geringerem Maße aufgenommen und befanden sich fast ausschließlich im Zytoplasma der Zellen (Abb. 13 A). Zwischen der Aufnahme von as.p65 ON und s.p65 ON im Komplex mit Oligofectamine bestand kein Unterschied (Bilder nicht gezeigt).

Anschließend wurde die Aufnahme von as.p65 im air liquid interface Kultursystem untersucht. Hierzu wurden vollständig ausdifferenzierte Primärzellen aus Atemwegsepithel mit FITC markierten AS ON für 24 h behandelt. Die Zellen wurden dann fixiert und mittels konfokaler Mikroskopie untersucht. as.p65 fand sich nach 24 h hauptsächlich im Zellkern, wobei auch im Zytoplasma Fluoreszenz detektiert wurde (Abb. 13 B).

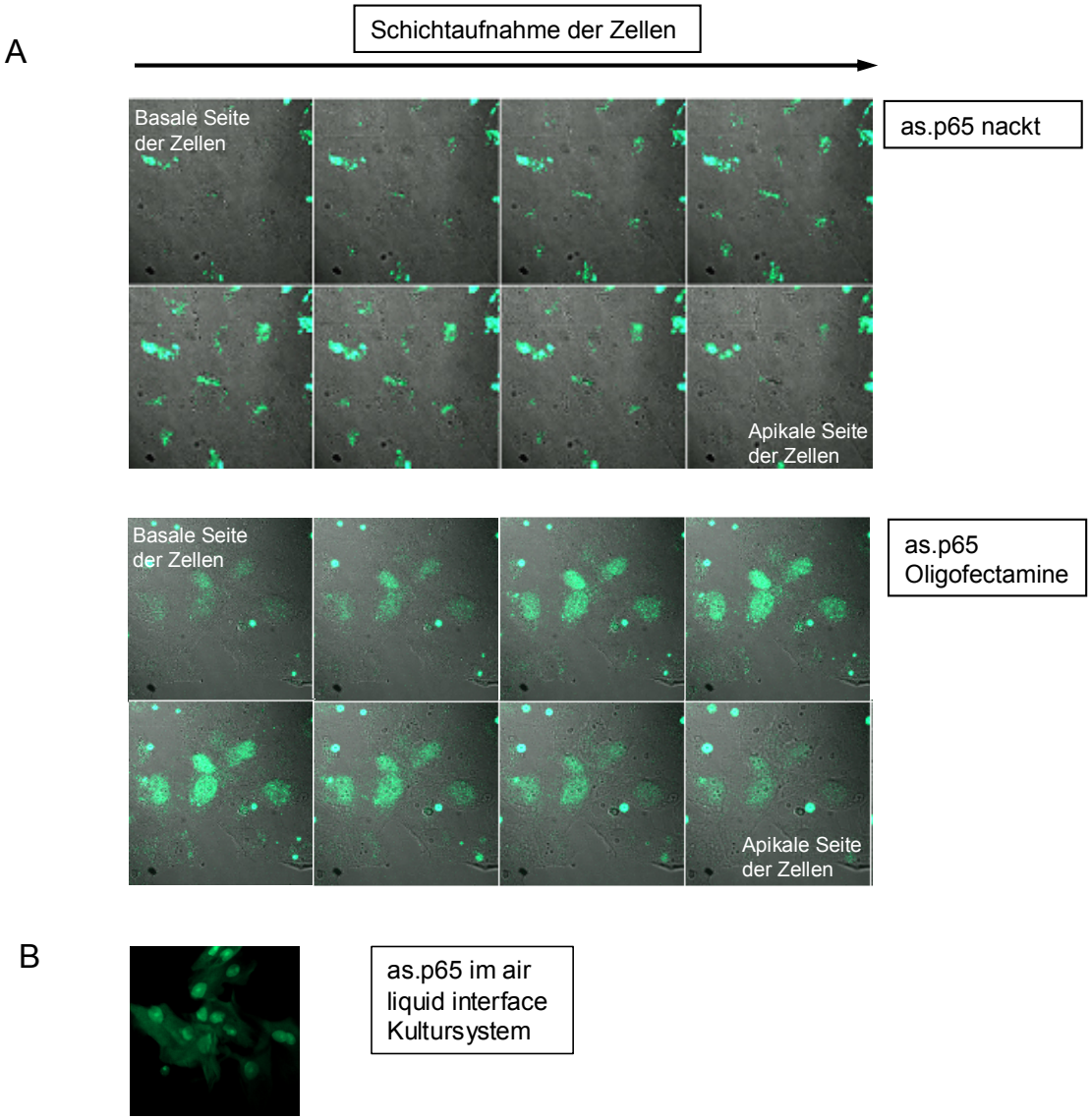


Abb. 13 Aufnahme der AS ON in Atemwegsepithel. *A. Die Aufnahme von as.p65 ist von der Applikationsform abhängig*. 1HAEo- Zellen auf Objektträgern wurden mit FITC markierten AS (0,2 µM) nackt oder im Komplex mit Oligofectamine für 24 h transfiziert. Die Zellen wurden mittels konfokaler Mikroskopie untersucht. Gezeigt ist eine Schichtaufnahme der Zellen. *B.* Ausdifferenzierte Primärzellen aus Atemwegsepithel wurden mit FITC markierten AS ON (5 µM) für 24 h behandelt und mittels konfokaler Mikroskopie untersucht.

4.1.3 siRNA.p65 vermindert die Sekretion pro-inflammatorischer Zytokine im Atemwegsepithel

Initial wurde getestet, ob eine Zelllinie aus dem Atemwegsepithel mit siRNA transfiziert werden kann. Zunächst wurden zwei verschiedene siRNA Sequenzen (siRNA.p65 1 und 2), welche gegen unterschiedliche Regionen des p65 Gens von NF-κB gerichtet sind, mittels des siRNA Target Finders der Firma Ambion (http://www.ambion.com/techlib/misc/siRNA_finder.html) erstellt. Die Duplexe wurden chemisch mit TT Überhängen synthetisiert. Um die inhibitorische Potenz der Sequenzen zu testen wurden beide mittels Oligofectamine in MM-39 Zellen transfiziert. Der Einfluß der siRNA.p65 auf die Sekretion von pro-inflammatorischen Mediatoren in Antwort auf eine Stimulation mit TNF-α wurde durch Messung der pro-inflammatorischen Zytokine IL-6 und IL-8 bestimmt. Als Kontrolle in allen folgenden Experimenten diente eine scrambled Duplex (siRNA.scr), welche keine Homologien zum menschlichen Genom aufwies. Nach 24 h erfolgte eine Stimulation mit TNF-α und nach weiteren 6 h wurde in den Überständen die Konzentration der NF-κB abhängigen Zytokine IL-6 und IL-8 bestimmt. Zudem wurden verschiedene Konzentrationen von TNF-α zur Stimulation verwendet. Die Zytokin-Messung ergab, dass siRNA.p65 2 die Sekretion von IL-6 und IL-8 signifikant senkte, während siRNA.p65 1 und siRNA.scr keinen Effekt zeigten (Abb. 14). Der Einsatz verschiedener TNF-α Konzentrationen hatte keinen Einfluss auf die Absenkung der IL-6- (nicht gezeigt) und IL-8- Sekretion durch siRNA.p65 (Abb. 14). Sie betrug unabhängig von der verwendeten TNF-α Konzentration in allen Experimenten zwischen 38 und 26 % im Vergleich zur siRNA.scr. Diese Ergebnisse wurden ebenfalls in der Zelllinie 1HAEo- erhalten (nicht gezeigt). Folglich wurde in allen weiteren Experimenten siRNA.p65 2 verwendet.

Die Verringerung der IL-8- und IL-6- Konzentration war abhängig von der eingesetzten Menge an siRNA.p65 (Abb. 15 A). Ein Vergleich verschiedener Transfektionsreagenzien ergab, dass die Transfektion mit Oligofectamine der Transfektion mit jetSI überlegen war (Abb. 15 A). Auch bei der Transfektion undifferenzierter Primärzellen in konventioneller Kultur war eine verminderte Sekretion p65 vermittelter Zytokine durch Applikation von siRNA.p65 zu beobachten (Abb. 15 B).

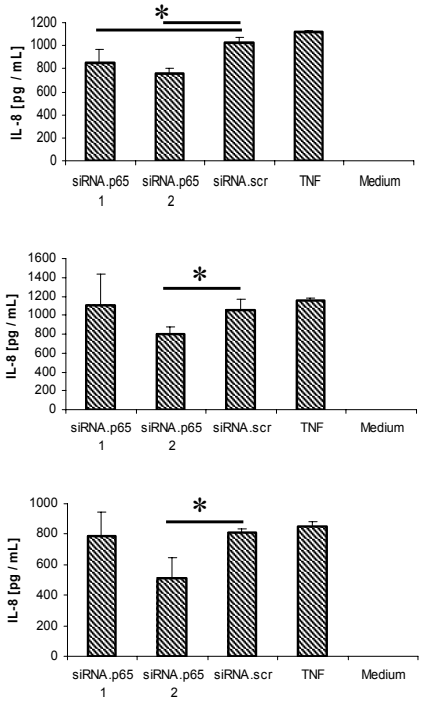
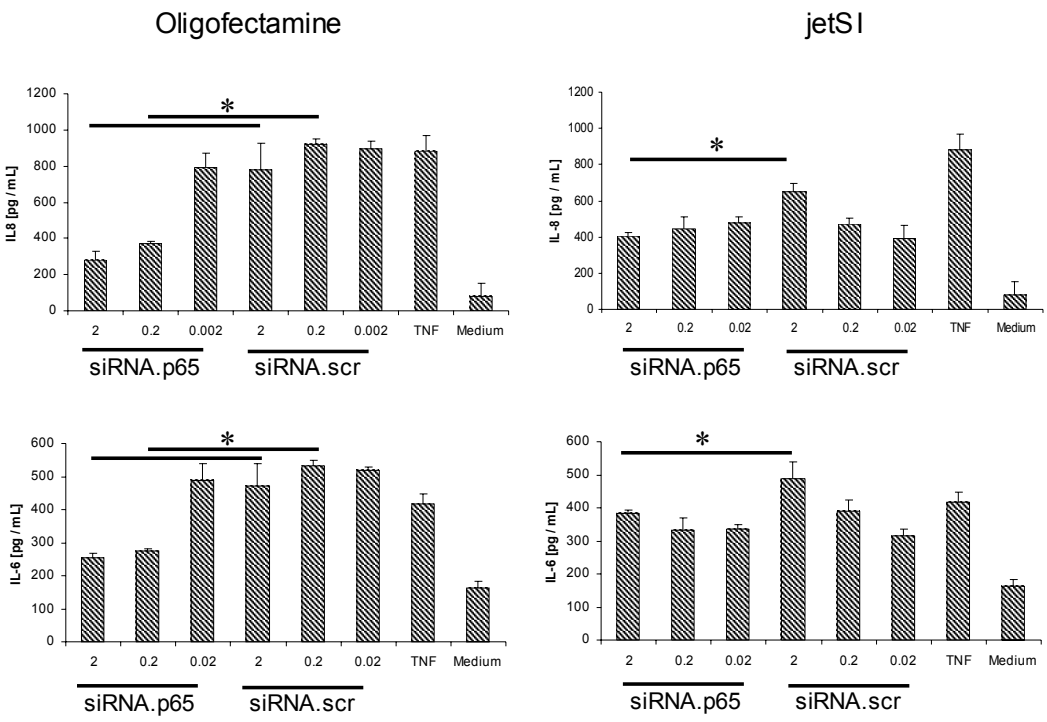


Abb. 14 Inhibition von zellulärer Entzündung durch siRNA.p65 in der Atemwegsepithelzelllinie MM-39. MM-39 Zellen wurden mit siRNA.p65 1, siRNA.p65 2 und siRNA.scr (je 0.2 µg / ml) im Komplex mit Oligofectamine transfiziert und anschließend mit verschiedenen Konzentrationen an TNF-α stimuliert. Signifikante Unterschiede von $P < 0,05$ sind mit * (n = 4) markiert.

A



B

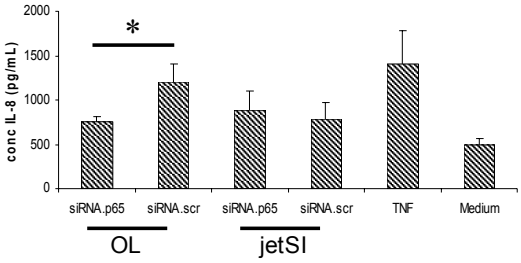
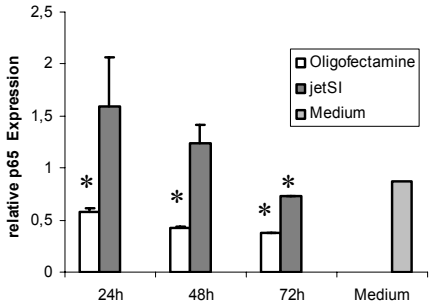


Abb. 15 Inhibition von zellulärer Entzündung durch siRNA.p65 in Zelllinien und Primärzellen des Atemwegsepithels. *A*. Vergleich verschiedener Transfektionsreagenzien. 1HAEo- Zellen wurden mit siRNA.p65 bzw siRNA.scr in den angezeigten Konzentrationen (in µg / ml) mittels Oligofectamine oder jetSI transfiziert und anschließend mit TNF-α (10 ng / ml) stimuliert. *B*. Undifferenzierte Primärzellen des Atemwegsepithels wurden mit siRNA.p65 und siRNA.scr mittels Oligofectamine transfiziert und anschließend mit TNF-α (10 ng / ml) stimuliert. Signifikante Unterschiede von $P < 0,05$ sind mit * (n = 4) markiert.

4.1.4 siRNA.p65 verringert die Expression von p65 im Atemwegsepithel

Anschließend wurde untersucht, ob die verminderte Sekretion von IL-6 und IL-8 auch tatsächlich auf einer verminderten Expression von p65 beruht. Eine verminderte p65 Expression nach Applikation von siRNA.p65 im Komplex mit Transfektionsreagenzien wurde sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene nachgewiesen. Im Gegensatz dazu veränderte das Kontrollmolekül siRNA.scr die p65 Expression nicht (Abb. 16 A, B). Verschiedene Transfektionsprotokolle wurden verglichen und im Ergebnis war eine Transfektion mit Oligofectamine einer Transfektion mit jetSI überlegen (Abb. 16 A, B).

A



B

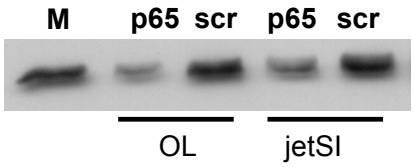


Abb. 16 siRNA inhibiert die Expression von p65 in der Atemwegsepithelzelllinie 1HAEo-. *A. RT-PCR*. Die p65 Expression auf mRNA Ebene wurde mittels RT-PCR in 1HAEo- Zellen 24, 48 und 72 h nach Transfektion mit siRNA.p65 oder siRNA.scr komplexiert mit Oligofectamine bzw. jetSI gemessen. Die siRNA.scr Werte wurden 1 gesetzt. *B. Western Blot Analyse*. Die p65 Expression auf Proteinebene wurde 72 h nach der Transfektion mit siRNA.p65 oder siRNA.scr im Komplex mit Oligofectamine (OL) oder jetSI bestimmt. Signifikante Unterschiede von $P < 0,05$ sind mit * (n = 4) markiert.

4.1.5 siRNA ist im Zytoplasma von Atemwegsepithelzellen lokalisiert

Es ist bislang ungeklärt wo die siRNA nach Eintritt in die Zielzelle lokalisiert ist. Diese Frage wurde durch die Bestimmung der subzellulären Lokalisation der siRNA mittels konfokaler Mikroskopie untersucht. 1HAEo- Zellen wurden mit markierter siRNA mittels Oligofectamine bzw. jetSI oder der nackten Duplex transfiziert. Die siRNA welche mit Oligofectamine bzw. jetSI transfiziert wurde war hauptsächlich im Zytoplasma lokalisiert. Die nackte Duplex war nicht in den Zellen detektierbar (Abb. 17 A). Das Verhältnis von siRNA im Zellkern zu siRNA im Zytoplasma betrug sowohl für Oligofectamine als auch für jetSI etwa 1:3. Kolokalisationsexperimente mit Zellen, welche mit markierter siRNA und Fluoreszenz-markiertem Transferrin ko-inkubiert wurden, ergaben, dass sich die siRNA kurz nach der Transfektion zuerst in vesikulären Strukturen – wobei es sich vermutlich um frühe Endosomen handelt- anreichert. Nach 24 h ist die Kolokalisation zum größten Teil aufgehoben. Die siRNA scheint aus den Vesikeln freigesetzt zu werden und findet sich in der Zielzelle über das gesamte Zytoplasma verteilt (Abb. 17 B)

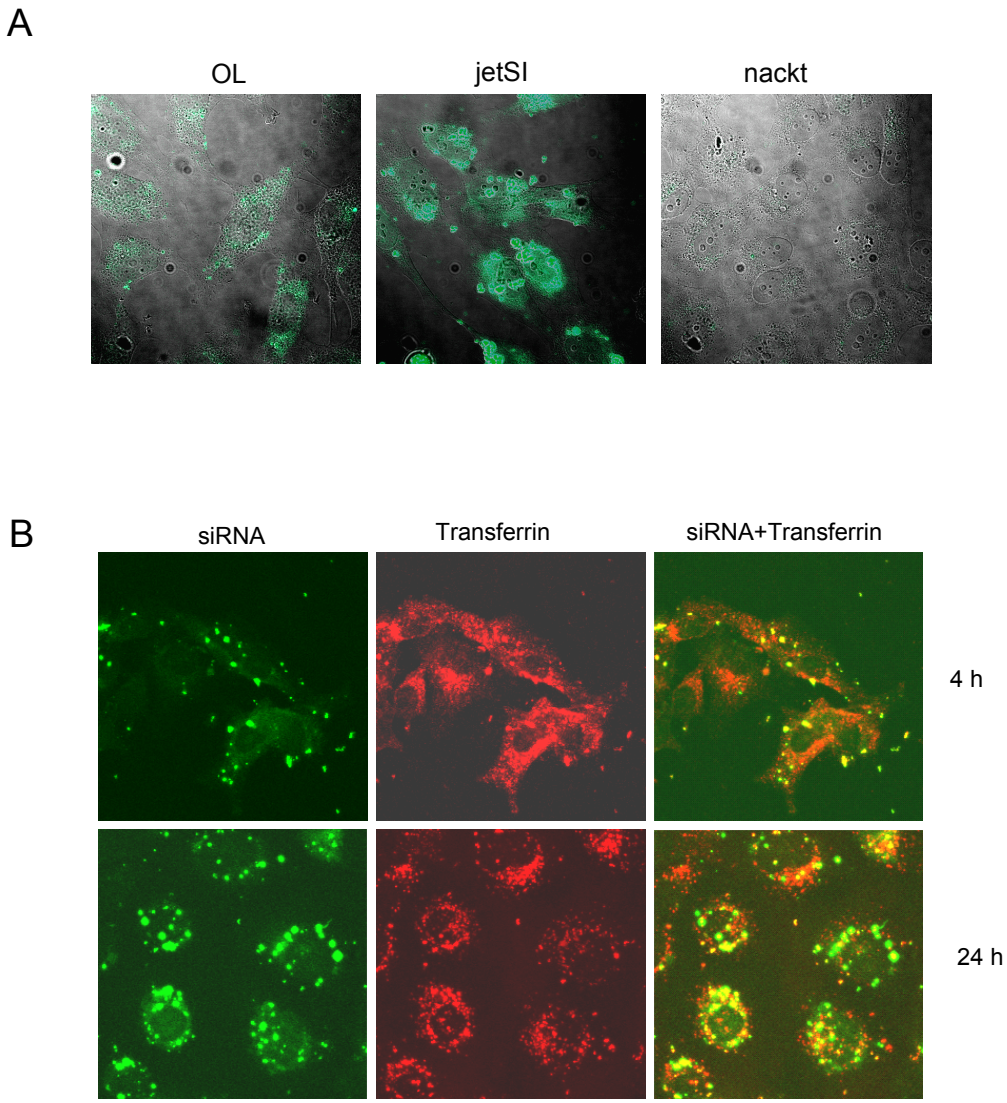
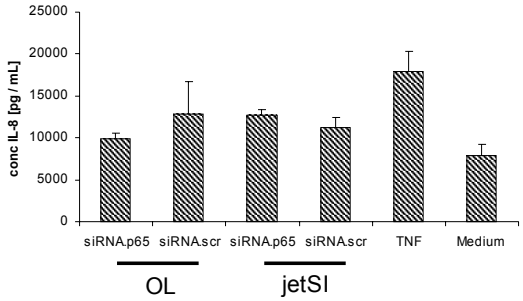


Abb. 17 Aufnahme und subzelluläre Lokalisation von siRNA. *A*. 1HAEo- Zellen wurden mit FAM markierter siRNA (20 nM) (grün) mittels Oligofectamine (OL) bzw. jetSI oder der nackten Duplex transfiziert. Gezeigt ist eine Kombination von Durchlicht- und Fluoreszenz-Kanal-Bild. *B*. 1HAEo- Zellen wurden mit FAM markierter siRNA (20 nM) (grün) im Komplex mit Oligofectamine und Alexa Fluor 546 markiertem Transferrin (20 µg / ml) (rot) für die angegebenen Zeiten inkubiert. Gegenden der Kolokalisation erscheinen gelb.

Anschließend wurde der Einfluss von siRNA.p65 auf die Sekretion von IL-8 und IL-6 im air liquid interface Kultursystem untersucht. Vollständig ausdifferenzierte Primärzellen wurden mit as.p65 und s.p65 behandelt bevor eine Stimulation mit TNF-α erfolgte. Die IL-8 und IL-6 Sekretion der Zellen, welche mit siRNA.p65 behandelt wurden unterschied sich nicht von der IL-8 und IL-6 Abgabe der mit siRNA.scr behandelten Zellen (Abb. 18 A). Undifferenzierte primäre Atemwegsepithelzellen konnten in konventioneller Kultur mit siRNA transfiziert werden (Abb. 15 B). Auf diesen Ergebnissen basierend erfolgte die Transfektion im nächsten Versuchsansatz kurz nach dem Aufbringen der Zellen auf die semipermeablen Membranen. Die Kulturen differenzierten im air liquid interface Kultursystem aus und nach zehn Tagen erfolgte die Stimulation mit TNF-α. Anschließend wurde IL-8 in den Überständen und der apikalen Spülflüssigkeit detektiert. Die mit siRNA.p65 vorbehandelten Zellen gaben im Vergleich zu den mit siRNA.scr. transfizierten Zellen signifikant weniger IL-8 ab (Abb. 18 B). Auch hier zeigte eine Transfektion mittels Oligofectamine einen stärkeren Effekt als die Transfektion mit jetSI (Abb. 18 B).

A



B

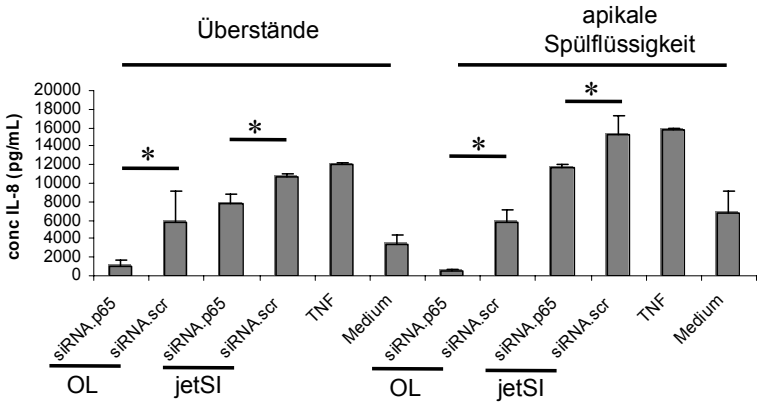


Abb. 18 Applikation der siRNA in ausdifferenziertem Atemwegsepithel. Air liquid interface Kulturen wurden mit siRNA.p65 und siRNA.scr unter Verwendung von Oligofectamine (OL) und jetSI transfiziert und anschließend mit TNF-α (20 ng / ml) stimuliert. IL-8 wurde nach 6 h gemessen *A.* Transfektion vollständig ausdifferenzierter Atemwegsepithelzellen. *B*. Transfektion der Atemwegsepithelzellen in undifferenziertem Zustand mit anschließender Ausdifferenzierung. Signifikante Unterschiede von $P < 0,05$ sind mit * (n = 4) markiert.

4.1.6 Die Applikation von siRNA.p65 vermindert die Sekretion von Entzündungsmediatoren stärker als as.p65

Um die Potenz von AS und siRNA Strategien zu vergleichen, wurde die inhibitorische Potenz im Bezug auf die NF-κB abhängige Zytokinsekretion in 1HAEo- Zellen untersucht. Die Stimulation mit TNF-α erfolgte wie im vorangegangenen Abschnitt beschrieben. Die Experimente ergaben, dass die Sekretion von IL-8 stärker durch siRNA als durch AS ON vermindert wurde (Abb. 19).

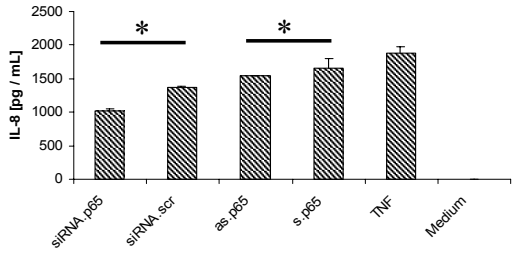


Abb. 19 Vergleich von siRNA.p65 und as.p65 bezüglich der Inhibition der Sekretion von Entzündungsmediatoren. 1HAEo- Zellen wurden mit siRNA.p65 und as.p65 mittels Oligofectamine transfiziert. Anschließend erfolgte eine Stimulation mit TNF-α und IL-8 wurde in den Überständen nach 6 h gemessen. Signifikante Unterschiede von $P < 0,05$ sind mit * ($n = 4$) markiert.

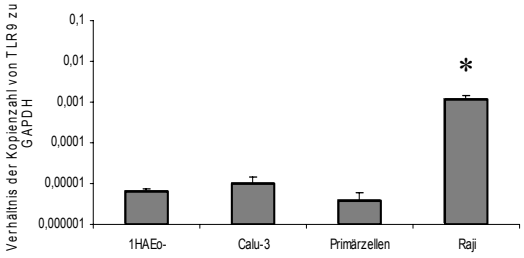
4.2 TLR

4.2.1 Expression und Funktion von TLR9 in humanem Atemwegsepithel

4.2.1.1 TLR9 wird von humanen respiratorischen Epithelzellen exprimiert

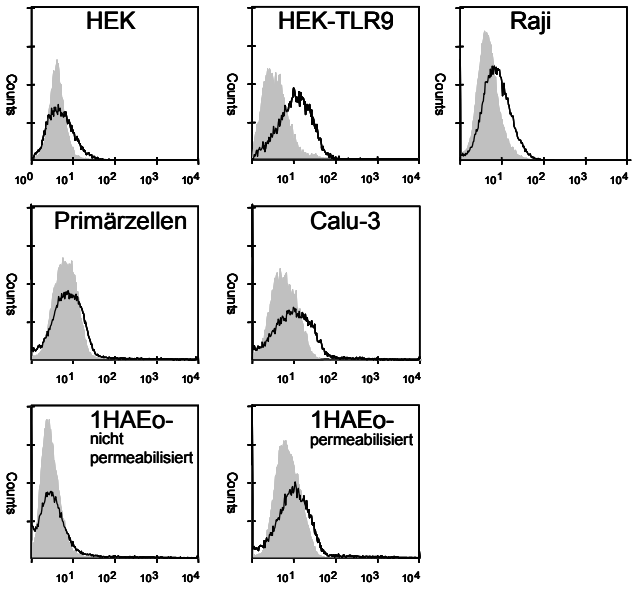
Zuerst wurde die Frage geklärt, ob Atemwegsepithelzellen TLR9 exprimieren. Dazu wurden verschiedene Zelllinien und Primärzellen aus dem Atemwegsepithel auf mRNA- und Proteinebene bezüglich der Expression von TLR9 untersucht.
Mittels quantitativer PCR wurde die Expression von TLR9 mRNA in den Zelllinien 1HAEo- und Calu-3 und in Primärzellen bestimmt. Im Vergleich zu der humanen B Zell Lymphom Zelllinie Raji, die hier als Positivkontrolle diente, ist die Expression in den Atemwegsepithelzellen um ein bis zwei Größenordnungen geringer (Abb. 20 A). Es wurden niedrige Mengen an TLR9 Protein in Zelllinien und Primärzellen des Atemwegsepithels mittels FACS Analyse detektiert (Abb. 20 B).

A



Δ cT	17,2±0,1	16,8±0,8	18,3±0,9	9,8±0,4

B



Schwarze Linie = anti-hTLR9 Antikörper;
Graue Fläche = Isotype Antikörper

Abb. 20 ***Expression von TLR im humanen Atemwegsepithel*** *A.* TLR9 wird von humanen respiratorischen Epithelzelllinien und Primärzellen exprimiert. Die TLR9 Expression auf mRNA Ebene wurde in den respiratorischen Epithelzelllinien 1HAEo- und Calu-3 und Primärzellen durch quantitative RT-PCR bestimmt. Das Verhältnis der Kopienzahlen von TLR9 und GAPDH wurde mittels der Δ cT Werte unter Verwendung der Formel 2 (–1) * ΔCt errechnet. Die TLR9 mRNA Expression war in Raji Zellen signifikant (*) erhöht (n = 4). *B.* TLR9 Protein ist in TLR9 transfizierten HEK293 Zellen, Raji, permeabilisierten 1HAEo-, Calu-3, und Primärzellen exprimiert. Nicht-permeabilisierte und nicht-transfizierte HEK293 Zellen zeigten im Vergleich zur Isotyp-Kontrolle keinen Fluoreszenz-Shift.

Weiterhin wurde untersucht, ob die Expression von TLR9 in Atemwegsepithelzellen reguliert ist. Nach Zugabe von IFNγ zu der Zelllinie 1HAEo- konnte ein kleiner aber signifikanter Anstieg in der TLR9 mRNA Expression beobachtet werden (Abb. 21). Eine Stimulation mit TNF-α, LPS, DNA E.coli, CpG ODN oder Kombinationen dieser Stimuli ergaben keine Veränderungen der Expression auf mRNA Ebene (Daten nicht gezeigt).

Diese Daten zeigen, dass TLR9 in Atemwegsepithelzellen exprimiert ist.

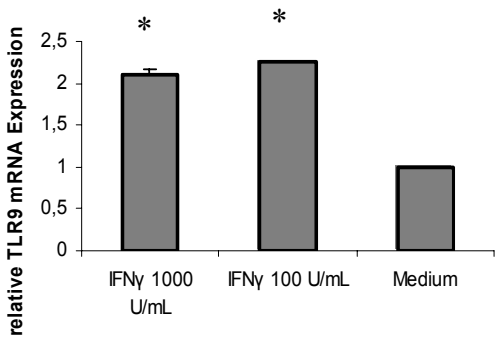
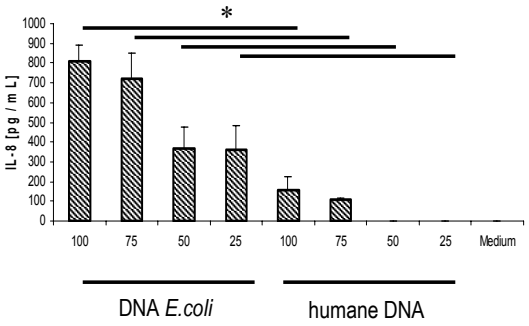


Abb. 21 Effekt von IFNγ auf die TLR9 mRNA Expression. 1HAEo- Zellen wurden mit den angegebenen Konzentrationen von IFNγ für 24 h stimuliert. Kleine aber signifikante Unterschiede im Vergleich zur Kontrollgruppe von $P < 0,05$ sind mit * (n = 4) markiert.

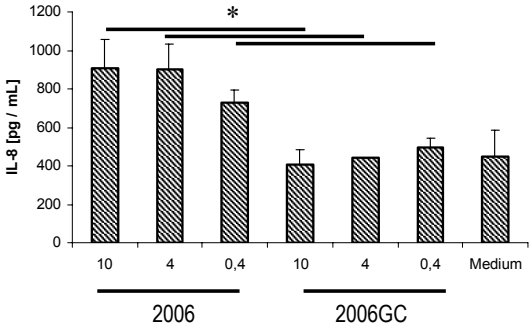
4.2.1.2 Stimulation von humanen respiratorischen Epithelzellen mit bakterieller DNA oder CpG ODN resultiert in der gesteigerten Sekretion von Zytokinen und hBD-2

Als nächstes wurde der Effekt von mikrobieller DNA auf humanen respiratiorischen Epithelzellen getestet. Zelllinien und ausdifferenzierte Primärzellen wurden mit genomischer DNA von verschiedenen Bakterien und synthetischen CpG ODN stimuliert. Als Negativkontrollen wurden humane DNA beziehungsweise ODN, die ein invertiertes CpG Motiv aufwiesen, verwendet. Als primäre Messparameter wurde die Expression von IL-8 und IL-6 mittels ELISA bestimmt. Bakterielle DNA und ODN 2006 verursachten eine gesteigerte Sekretion von IL-8 (Abb. 22 A, B) und IL-6 (Daten nicht gezeigt) in 1HAEo-, während die Negativkontrollen keinen Effekt zeigten. Des Weiteren wurden Primärzellen aus Atemwegsepithel als konventionelle Kulturen mit DNA von *Escherichia coli, Porphyromonas ginigivalis* und humaner DNA stimuliert (Abb. 22 C). In parallelen Experimenten wurde gezeigt, dass LPS in einer Konzentration von 50 ng / ml notwendig ist, um eine Antwort hervorzurufen, die der Stimulation mit bakterieller DNA vergleichbar ist (Daten nicht gezeigt).

A



B



C

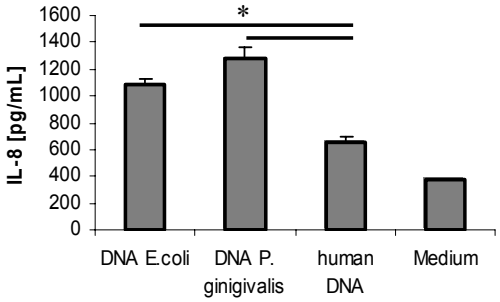


Abb. 22 Effekt von verschiedenen CpG Motiv enthaltenden DNA Präparationen auf respiratorische Epithelzellen. *A*. Effekt bakterieller DNA auf die IL-8 Sekretion von 1HAEo-. 1HAEo- Zellen wurden mit verschiedenen Konzentrationen (in µg / ml) von DNA E. coli für 24 h stimuliert. Humane DNA wurde als Kontrolle verwendet (n = 4). *B*. CpG ODN (Konzentrationen in µg / ml) stimulieren 1HAEo- Zellen Dosis-abhängig (n = 4). *C*. Effekt von verschiedenen DNA Präparationen auf die IL-8 Sekretion primären Atemwegsepithels. Primäre respiratorische Epithelzellen in einem konventionellen Kultursystem wurden mit DNA von Escherichia coli, von Porphyromonas ginigivalis und menschlicher DNA (100 µg / ml) stimuliert. Alle behandelten Gruppen unterschieden sich signifikant von der unstimulierten Kontrolle (n = 4). Signifikante Unterschiede von $P < 0,05$ sind mit * markiert.

Durch Vorbehandlung mit IFNγ für 24h und anschließende Stimulation mit bakterieller bzw. humaner DNA konnte keine gesteigerte Antwort, sondern lediglich ein additiver Effekt bzgl. der IL-8 Sekretion beobachtet werden (Abb. 23).

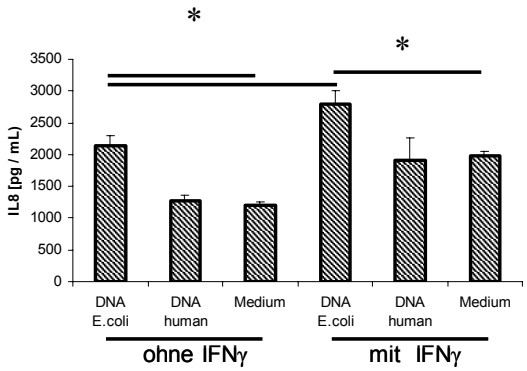


Abb. 23 Effekt von bakterieller DNA auf die Sekretion von IL-8 nach Vorbehandlung mit IFNγ. 1HAEo- Zellen wurden mit IFNγ (1000 U / ml) für 24 h vorbehandelt. Anschließend erfolgte eine Stimulation mit DNA E.coli (100 µg / ml). Humane DNA wurde als Kontrolle verwendet. Signifikante Unterschiede im Vergleich zur Kontrollgruppe von $P < 0,05$ sind mit * ($n = 4$) markiert.

Als nächstes wurden die Effekte von CpG DNA auf polarisierten Atemwegsepithelzellen in air liquid interface Kulturen untersucht. Es ist beschrieben, dass die Antwort von Atemwegsepithel mit dem Differenzierungsgrad korreliert (Hill *et al.*, 1996). Anfangs wurden polarisierte Calu-3 Zellen mit bakterieller DNA sowohl von der apikalen, als auch von der basolateralen Seite stimuliert. Daraufhin wurde eine gesteigerte Sekretion von IL-8 (Daten nicht gezeigt) und IL-6 (Abb. 24 A) gefunden. Die Stimulation von apikaler Seite zeigte einen größeren Effekt im Vergleich zur Stimulation von basolateral. Weiterhin wurden differenzierte Primärzellen als air liquid interface Kulturen mit ODN 2006 und ODN 2006GC von der apikalen und der basolateralen Seite stimuliert. Eine signifikante Steigerung der IL-8 Sekretion konnte mit ODN 2006 im Vergleich mit ODN 2006GC beobachtet werden (Abb. 24 B). Unterschiede zwischen apikaler und basolateraler Applikation der ODN waren nicht signifikant (Abb. 24 B).

Als nächstes wurde untersucht, ob mikrobielle DNA die Expression von Effektormolekülen wie die antmikrobieller Peptide induziert. Es wurde gefunden, dass die Stimulation mit DNA von *Escherichia coli* eine gesteigerte Expression von hBD-2 induziert (Abb. 24 C). Dieser Effekt war stärker bei der Applikation von apikal als von basolateral.

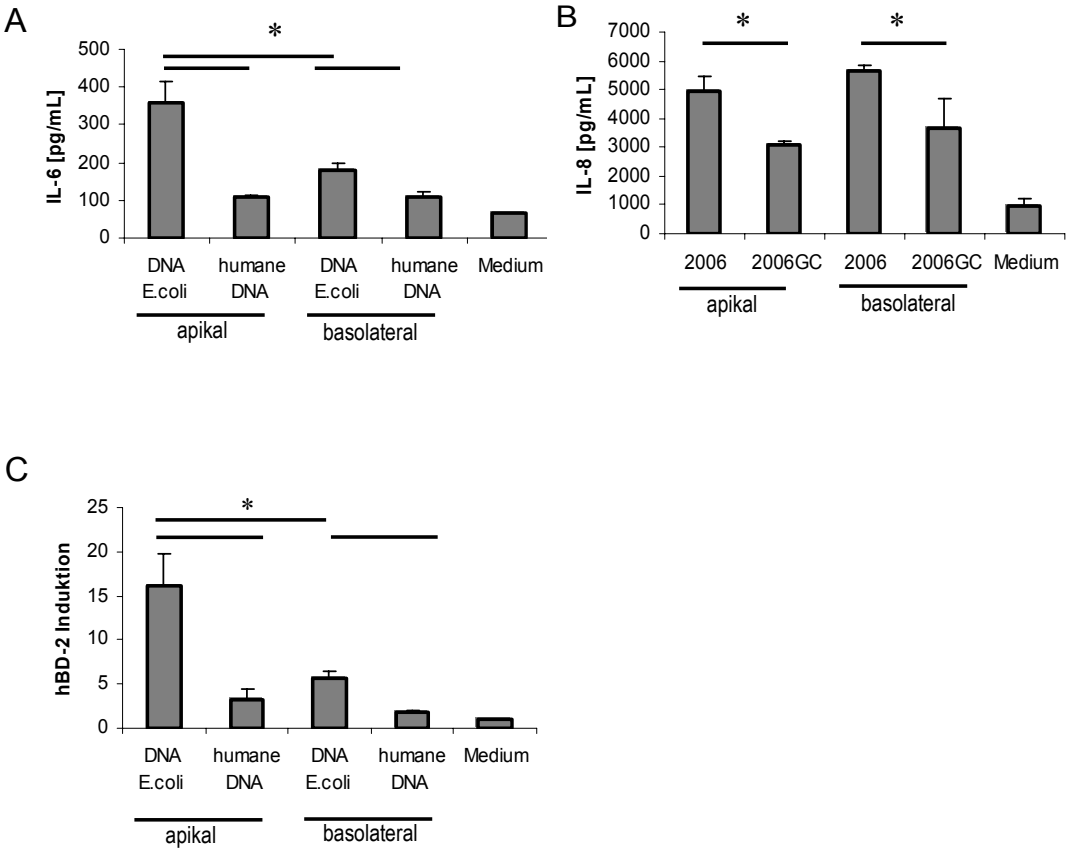


Abb. 24 Effekt von verschiedenen CpG Motiv enthaltenden DNA Präparationen auf ausdifferenzierte respiratorische Epithelzellen im air liquid interface Kultursystem. *A*. IL-6 Induktion nach Stimulation von apikal oder basolateral. Polarisierte Calu-3 Zellen als air liquid interface Kulturen wurden mit bakterieller DNA (100 µg / ml) für 24 h von apikal oder basolateral stimuliert. Humane DNA (100 µg / ml) wurde als Kontrolle verwendet. *B*. IL-8 Induktion nach Stimulation von apikal oder basolateral. Im air liquid interface Kultursystem ausdifferenzierte primäre respiratorische Epithelzellen wurden mit ODN 2006 und ODN 2006GC von apikal oder basolateral für 24 h stimuliert. *C*. hBD-2 mRNA Induktion nach Stimulation von apikal oder basolateral. Polarisierte Calu-3 Zellen wurden im air liquid interface Kultursystem mit bakterieller DNA (100 µg / ml) von apikal oder basolateral für 24 h stimuliert. Signifikante Unterschiede von $P < 0,05$ sind mit * ($n = 4$) markiert.

4.2.1.3 Der stimulierende Effekt von CpG DNA wird durch die Expression von dominant negativen Form von MyD88 und IRAK inhibiert

Wie oben bereits beschrieben, sind MyD88 und IRAK zentrale Elemente des TLR Signaltransduktionsweges. Um einen weiteren Beweis für die Bedeutung des TLR9 bei der Erkennung bakterieller DNA in Epithelzellen zu liefern, wurden dominant negative Formen von MyD88 (ΔMyD88) und IRAK (IRAK-DD) exprimiert und der immunstimulierende Effekt von CpG DNA untersucht.

Zunächst wurde die Transfektion bezüglich der DNA-Menge und des Verhältnisses von DNA zu Effectene optimiert. 1HAEo- Zellen wurden mit 5xNF-κB-luc transfiziert und nach 24 h wurde in den Zell-Lysaten die Luciferase-Aktivität bestimmt. Die Messungen ergaben, dass eine DNA-Menge von 0,2 µg / well und ein Verhältnis von DNA : Effectene = 1 : 10 die höchste Transfektionseffizienz ergaben (Daten nicht gezeigt).

Anschließend wurden 1HAEo- Zellen transient mit den Plasmiden 5xNF-κB-luc als Reporter für die NF-κB-Aktivität, dem leeren pcDNA3 und pcDNA, das die cDNA für ΔMyD88 bzw für IRAK-DD enthält, in verschiedenen Kombinationen ko-transfiziert. Die Renilla Luciferase Aktivität unter der Kontrolle eines ß-Actin Promoters blieb innerhalb einer experimentellen Reihe konstant (Daten nicht gezeigt). Zuerst wurden 1HAEo- Zellen mit 5x NF-κB-luc und pcDNA3 ko-transfiziert. Stimulation mit bakterieller DNA erhöhte signifikant die NF-κB abhängige Luciferase Aktivität (Abb. 25). Der stimulierende Effekt wurde signifikant erniedrigt, wenn anstatt der bakteriellen humane DNA zur Stimulation benutzt wurde (Abb. 25). Wenn 1HAEo- mit 5x NF-κB-luc und ΔMyD88 im Verhältnis 1 / 2 co-transfiziert wurden, war der stimulierende Effekt der bakteriellen DNA aufgehoben und es bestand kein signifikanter Unterschied mehr zur Stimulation mit humaner DNA (Abb. 25). Etwas weniger effektiv war die Kombination aus ΔMyD88 und IRAK-DD oder IRAK-DD (im Verhältnis 2 / 1 zu 5x NF-κB-luc) alleine. Keinen inhibitorischen Effekt zeigten ΔMyD88 und IRAK-DD wenn sie im Verhältnis 1 / 2 zu 5x NF-κB-luc transfiziert wurden (Abb. 25).

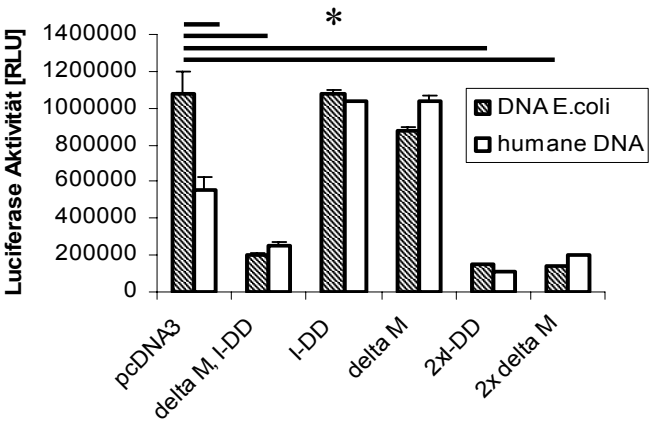


Abb. 25 Überexpression dominant negativer Mutanten von MyD88 und IRAK unterbinden Dosis-abhängig die Antwort des Epithels auf bakterielle DNA. 1HAEo- Zellen wurden mit 5 x NF-κB-luc, leerem pcDNA3 oder pcDNA3 welcher ΔMyD88 (delta M) oder IRAK-DD (I-DD) enthält, ko-transfiziert. Zellen wurden anschließend mit bakterieller und humaner DNA (100 µg / ml) stimuliert. Signifikante Unterschiede von $P < 0,05$ sind mit * ($n = 3$) markiert.

4.2.2 Expression und Funktion von TLR3 in humanem Atemwegsepithel

4.2.2.1 TLR3 wird von humanen respiratorischen Epithelzellen exprimiert

Zuerst wurde die Frage geklärt, ob Atemwegsepithelzellen TLR3 exprimieren. Dazu wurden verschiedene Zelllinien und Primärzellen aus Atemwegsepithel bezüglich der Expression von TLR3 untersucht. Die TLR3 Expression auf mRNA Ebene wurde in den Zelllinien BEAS-2B, 16HBE14o- und 1HAEo- und in primären Atemwegsepithelzellen gefunden, wobei die Expression in 16HBE14o- am stärksten war (Abb. 26).

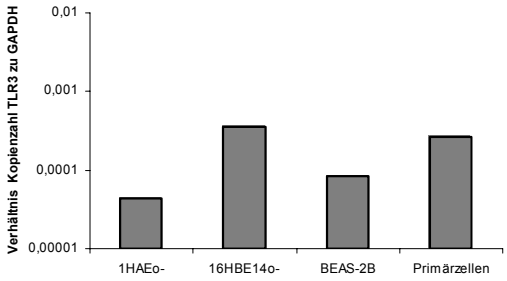


Abb. 26 TLR3 wird von humanen respiratorischen Epithelzelllinien und Primärzellen exprimiert. TLR3 Expression auf mRNA Ebene wurde in den respiratorischen Epithelzelllinien 1HAEo-, 16HBE14o- und BEAS-2B und Primärzellen durch quantitative RT-PCR bestimmt. Das Verhältnis der Kopienzahlen von TLR3 und GAPDH wurde mittels der Δ cT Werte unter Verwendung der Formel $2^{(-1)} * \Delta Ct$ errechnet.

Weiterhin wurde untersucht, ob die Expression von TLR3 in Atemwegsepithelzellen reguliert ist. Nach Zugabe des möglichen TLR3 Liganden poly (I:C) zu der Zelllinie 16HBE14o- konnte ein kleiner aber signifikanter Anstieg in der TLR3 mRNA Expression beobachtet werden (Abb. 27). Eine Stimulation mit IFNγ ergab keine Veränderungen der Expression auf mRNA Ebene (Abb. 27). Diese Daten zeigen, dass TLR3 in Atemwegsepithelzellen exprimiert ist.

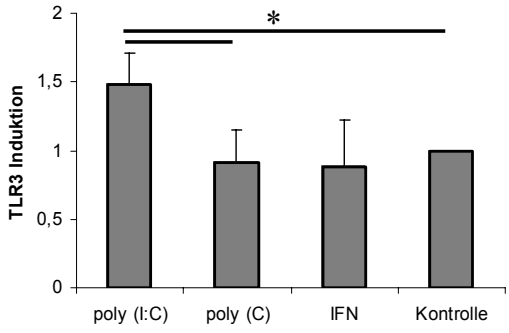
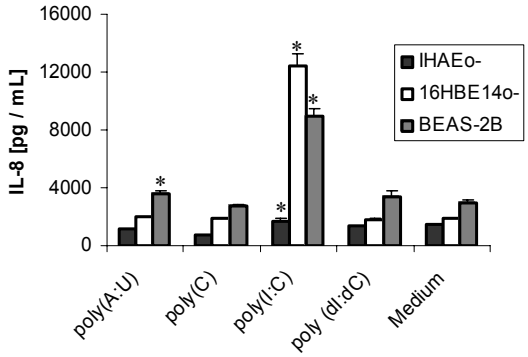


Abb. 27 Effekt von poly (I:C) auf die TLR3 mRNA Expression. 16HBE14o- Zellen wurden mit poly (I:C), poly (C) (25 µg / ml) und IFNγ (1000 U / ml) für 24 h stimuliert. Kleine aber signifikante Unterschiede im Vergleich zur Kontrollgruppe von $P < 0.05$ sind mit * ($n = 4$) markiert

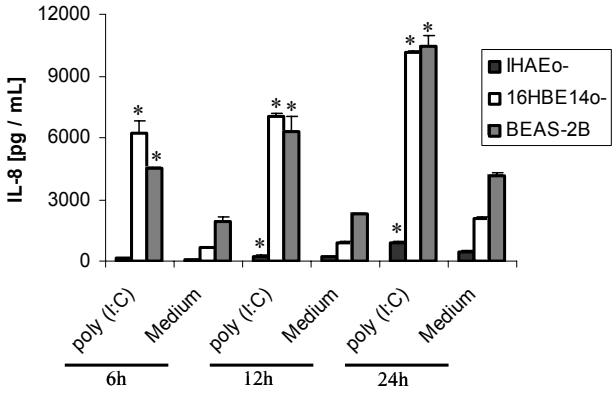
4.2.2.2 Stimulation von humanen respiratorischen Epithelzellen mit dsRNA resultiert in der gesteigerten Sekretion von Zytokinen

Als nächstes wurde überprüft, ob die TLR3 Expression in humanen respiratorischen Epithelzellen auch mit einer Reaktion auf dsRNA, einem möglichen Liganden für TLR3 einhergeht. Die sythetische dsRNA poly(I:C) ruft Effekte hervor, welche mit denen viraler dsRNA vergleichbar sind (Alexopoulou *et al.*, 2001). poly(I:C) wurde in den folgenden Experimenten zur Stimulation verschiedener Zelllinien aus Atemwegsepithel verwendet. Als Negativkontrolle dienten einzelsträngige poly(C), poly (A:U) und einzelsträngige DNA poly (dI:dC). Primäre Messparameter waren IL-8 und IL-6, welche mittels ELISA bestimmt wurden. poly(I:C) verursachte eine gesteigerte Sekretion von IL-8 (Abb. 28 A) und IL-6 (Daten nicht gezeigt) in BEAS-2B, 16HBE14o- und 1HAEo- während poly(C), poly (A:U) und poly (dI:dC) keinen Effekt zeigten. Die gesteigerte Sekretion von IL-8 war Zeit-und Dosis-abhängig (Abb. 28 B, C). Die Induktion von IL-8 in 16HBE14o- war dabei am ausgeprägtesten, was mit der stärksten Expression des TLR3 auf mRNA Ebene korreliert.

A



B



C

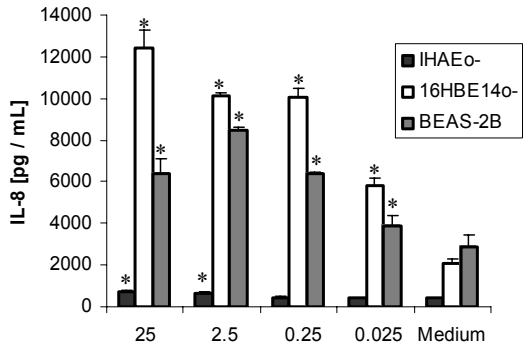


Abb. 28 Effekt von dsRNA auf respiratorische Epithelzellen. *A*. 1HAEo-, BEAS-2B und 16HBE14o- Zellen wurden mit poly (I:C) (25µg / ml) stimuliert. poly (C), poly (A:U) und poly (dI:dC) wurden als Kontrollen verwendet. *B*. 1HAEo-, BEAS-2B und 16HBE14o- Zellen wurden mit poly (I:C) (25µg / ml) über verschiedene Zeiträume stimuliert. *C*. 1HAEo-, BEAS-2B und 16HBE14o- Zellen wurden mit poly (I:C) (Konzentrationen in µg / ml) stimuliert. Signifikante Unterschiede von $P < 0,05$ sind mit * ($n = 4$) markiert.

4.2.2.3 Der stimulierende Effekt von poly (I:C) wird durch die Expression einer dominant negativen Form von MyD88 inhibiert

Die Transfektion der Zellen erfolgte analog Kapitel *4.2.1.3.* Zuerst wurden 16HBE14o- Zellen transient mit 5x NF-κB-luc und pcDNA3 ko-transfiziert. Stimulation mit poly (I:C) erhöhte signifikant die NF-κB abhängige Luciferase Aktivität (Abb. 29). Der stimulierende Effekt wurde signifikant erniedrigt, wenn anstatt poly (I:C) einzelsträngige poly (C) zur Stimulation benutzt wurde (Abb. 29). Wenn 16HBE14o- Zellen mit 5x NF-κB-luc und ΔMyD88 im Verhältnis 1 / 2 ko-transfiziert wurden, war der stimulierende Effekt von poly (I:C) aufgehoben und es bestand kein signifikanter Unterschied mehr zur Stimulation mit poly (C) (Abb. 29).

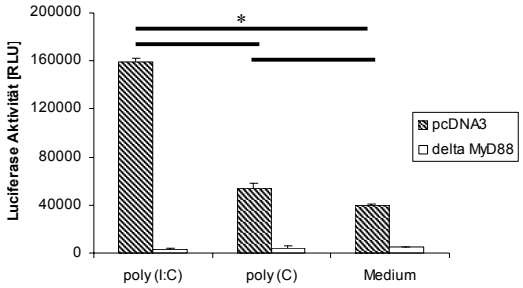


Abb. 29 Überexpression einer dominant negativen Mutante von MyD88 inhibiert die Antwort des Epithels auf dsRNA. 16HBE14o- Zellen wurden mit 5 x NF-κB-luc, leerem pcDNA3 oder pcDNA3 welcher ΔMyD88 enthält, ko-transfiziert. Zellen wurden anschließend mit poly (I:C) und poly (C) (25 µg / ml) stimuliert. Signifikante Unterschiede von $P < 0,05$ sind mit * (n = 3) markiert.

5 Diskussion

Die Ergebnisse der vorliegenden Studie lassen sich wie folgt zusammenfassen: Durch die Applikation von AS ON und siRNA konnte die Genexpression im entzündeten Atemwegsepithel verändert werden. Allerdings zeigte sich, dass Nukleinsäuren im Atemwegsepithel entzündliche Reaktionen auslösen können. Die Untersuchung der zugrunde liegenden Mechanismen ergab, dass TLRs, insbesondere TLR3 und TLR9, für diese Reaktionen verantwortlich sein könnten. Diese Ergebnisse geben einen Einblick in die Rolle des Atemwegsepithels im Rahmen der angeborenen Immunität. Weiterhin zeigen sie mögliche therapeutische Anwendungen kleiner Nukleinsäuren auf, weisen jedoch auch auf Limitationen hin.

5.1 Kleine Nukleinsäuren als antientzündliche Therapienansätze

Zur Beeinflussung von Entzündungsvorgängen im Atemwegsepithel wurden AS ON und siRNA, welche gegen die p65 Untereinheit von NF-κB gerichtet waren, verwendet. Mehrere Gründe sprechen für die Auswahl von NF-κB als Zielmolekül. (1) NF-κB ist ein zentraler Transkriptionsfaktor des Entzündungsgeschehens und eine Fehlregulation von NF-κB liegt vielen entzündlichen Atemwegserkrankungen zugrunde. (2) Induktoren und Messparameter für eine NF-κB abhängige Reaktion sind deshalb einfach zu identifizieren und zu bestimmen. (3) NF-κB ist ein ubiquitäres, stark exprimiertes Gen. Es ist wahrscheinlich, dass RNAi bezüglich der Genregulation bei stark exprimierten Genen effektiver ist als bei schwach exprimierten Genen oder Genen, die nur in einer kleinen Anzahl von Zellen vorliegen (Fire *et al.*, 1998).

Kurze Nukleinsäuren sind in der Lage, die Expression von p65 und in der Folge NF-κB –abhängige Reaktionen im Atemwegsepithel spezifisch zu blockieren. Die Transfektion der Zellen ist abhängig vom Transfektionsreagenz und ist im Falle der siRNA beschränkt auf Zelllinien oder undifferenzierte Primärzellen. siRNA und AS ON verringern die Sekretion pro-inflammatorischer Mediatoren im Atemwegsepithel. Vollständig ausdifferenzierte Zellen in air liquid interface Kultursystemen scheinen unter den in dieser Studie angewandten Bedingungen resistent gegenüber der

Aufnahme von siRNA, nicht aber gegenüber der Aufnahme von AS ON zu sein. Der Grund hierfür könnte darin liegen, dass die AS ON im Gegensatz zur siRNA in vollständig PTO-modifizierter Form angewendet wurden. Neben einer Erhöhung der Stabilität hat dies auch eine bessere Adsorption an die Zellmembran zur Folge (Lebedeva *et al.*, 2000), was die Aufnahme in die Zelle fördern mag. Ein weiterer Grund für den Unterschied in der Aufnahme zwischen AS ON und siRNA könnte die Tatsache sein, dass siRNA aufgrund der Strukturähnlichkeit mit viraler dsRNA vom Atemwegsepithel als fremd erkannt und zügig abgebaut wird.

Es wurde gezeigt, dass eine durch Transfektionsreagenzien vermittelte Aufnahme der siRNA in Atemwegsepithelzellen spezifisch die endogene Expression von p65 verringert. Dieser Effekt resultiert in der Suppression der NF-κB abhängigen Genexpression. Auch die Applikation von AS ON hatte eine Suppression der NF-κB abhängigen Genexpression zur Folge. Der Vergleich beider Ansätze zeigt jedoch, dass eine Verringerung der Zytokinsekretion in den mit siRNA transfizierten Zellen weitaus stärker ist, als in den mit AS vorbehandelten Zellen. RNAi ist eine außergewöhnlich effektive Methode der Genregulation, welche durch geringe Mengen dsRNA ausgelöst wird (Fire *et al.*, 1998; Elbashir *et al.*, 2001a). siRNA ist in Konzentrationen wirksam, welche mehrere Größenordnungen unter den Konzentrationen herkömmlicher AS- oder Ribozym- Applikationen liegen (Macejak *et al.*, 2000). Eine wahrscheinliche Erklärung dafür ist der oben beschriebene Amplifikationsschritt, in dem die siRNAs nicht nur als „guide“ Sequenzen für den Abbau der komplementären mRNA, sondern auch als Primer für die Amplifikation des blockierenden Signals fungieren (Lipardi *et al.*, 2001).

Die intrazelluläre Expression des Zielproteins wurde durch siRNA.p65 signifikant gesenkt. Im Vergleich zu Drosophila ist die Verringerung der Genexpression in Säugern effektiv, aber generell wird das Zielprotein nicht vollständig supprimiert (Elbashir *et al.*, 2001b). Mehrere siRNA Moleküle gegen verschiedene Regionen der p65 mRNA wurden evaluiert. Die erste Sequenz zeigte keinen Effekt im Bezug auf die gemessenen Parameter. Dies verdeutlicht, dass ein Erfolg von der Identifikation einer passenden Zielsequenz abhängt. Deshalb müssen Strategien entwickelt werden, in welchen durch größerangelegtes Screening die optimale Zielsequenz identifiziert werden kann. Das oben beschriebene duale Promoter-siRNA-Expressionssystem,

welches die einfache Konstruktion von siRNA Expressionsbibliotheken für genomweite Screenings erlaubt (Zheng *et al.*, 2004), bietet dafür einen Ansatz. Neuere Studien identifizierten Charakteristika, welche mit der Funktionalität der siRNA einhergehen, u.a. sind hier ein geringer G/C Gehalt und ein Fehlen von inverted repeats zu nennen (Reynolds *et al.*, 2004).

Studien mit Fluoreszenz markierten AS ON ergaben, dass ein Unterschied zwischen der Aufnahme bei Applikation der nackten oder der mit Oligofectamine komplexierten ON bestand. Nackte AS ON fanden sich fast ausschließlich im Zytoplasma der Zelle, wohingegen mit Oligofectamine komplexierte ON hauptsächlich im Zellkern und in geringerem Ausmaß auch im Zytoplasma der Zelle lokalisiert waren. Dies entspricht den Ergebnissen früherer Untersuchungen, in denen festgestellt wurde, dass ON ohne die Applikation im Komplex mit Transfektionsreagenzien nicht Zellkern-gängig sind (Bennett *et al.*, 1992; Thierry und Dritschilo, 1992). Betrachtet man den Wirkmechanismus von AS ON ist beides denkbar: entweder entsteht der Effekt durch Hybridisierung der ON an die DNA im Zellkern und blockiert die Transkription (*Anti-Gen-Therapie*) oder die Bindung der AS ON erfolgt an die Ziel mRNA im Zytoplasma und verhindert die Translation (*Antisense-Therapie*) (Varga *et al.*, 1999). Auch eine unspezifische Interaktion mit Proteinen (*Aptamer-Bindung*) führt zu einer Gensuppression (Varga *et al.*, 1999). Letzteres ist allerdings unwahrscheinlich, da die Applikation des Sense ON keine verminderte Zytokinsekretion zur Folge hatte und damit von einem spezifischen Effekt ausgegangen werden kann. Der Inhibition der Zytokinsekretion zufolge hat as.p65 auf Zelllinien des Atemwegsepithels nur einen Effekt, wenn es in Form eines Komplexes mit Oligofectamine appliziert wird. Aus dieser Beobachtung könnte man den Schluss ziehen, dass die AS ON zur Entfaltung ihrer Wirkung in den Zellkern gelangen müssen. Dies entspricht der Theorie von Moulds et al., welche fanden, dass in den Zellkern injizierte AS ON eine wesentlich höhere Stabilität und damit verbunden auch einen stärkeren Effekt aufwiesen als in das Zytoplasma injizierte AS ON (Moulds *et al.*, 1995). Allerdings wurde in den eigenen Experimenten auch im Zytoplasma der Zelle ein Teil der AS ON detektiert.

Der Grund für den Unterschied in der Wirkung von nackten und mit Oligofectamine komplexierten ON liegt möglicherweise in der Freisetzung der ON in der Zelle. Nach

der Aufnahme durch Endozytose sind die ON topologisch immernoch außerhalb der Zelle lokalisiert, da sie eine Lipiddoppelschicht vom Zytoplasma trennt. Dieses endosomale / lysosomale Kompartiment stellt normalerweise eine Einbahnstrasse dar, da die ON entweder über Exozytose von der Zelle freigesetzt oder verdaut werden (Tonkinson und Stein, 1994). Mit Oligofectamine komplexierte ON weisen gegenüber den nackten ON mehrere Vorteile auf: (1) Sie werden in größerem Maße aufgenommen, (2) sie sind durch die Lipiddoppelschicht des Transfektionsreagenzes besser vor Abbau geschützt und (3) die elektrostatische Wechselwirkung zwischen Transfektionsreagenz und endosomaler Phospholipiddoppelschicht mag zu einem Flip-Flop der Endosomenmembran und in der Folge zur Freisetzung des ON in das Zytoplasma beitragen (Lebedeva *et al.*, 2000). Von dort werden die ON dann schnell in den Zellkern transportiert (Fisher *et al.*, 1993), während die nackten AS ON im endosomalen / lysosomalen Kompartiment verbleiben. Im Gegensatz dazu gibt es einige Berichte in der Literatur, welche AS Effekte nach Applikation nackter ON schildern (Gewirtz und Calabretta, 1988; Anfossi *et al.*, 1989). Auch in den eigenen Experimenten im air liquid interface Kultursystem konnte durch Applikation nackter ON eine Absenkung der Sekretion von Entzündungsmediatoren beobachtet werden. Eine mögliche Erklärung hierfür ist, dass die Rate endosomaler / lysosomaler Ruptur zwar gering, aber doch ausreichend ist, um intrazytoplasmatische Konzentrationen des aktiven ON zu erzeugen. Dieser Effekt mag durch sehr hohe Konzentrationen, wie sie bei Behandlung der air liquid interface Kulturen benutzt wurden, verstärkt werden. Von PTO modifizierten ON ist zudem bekannt, dass sie sehr gut an die Zellmembran adsorbieren (Lebedeva *et al.*, 2000), was ihre Aufnahme in nackter Form begünstigen mag.

Kolokalisationsexperimente mit Zellen, welche mit markierter siRNA und Fluoreszenz-markiertem Transferrin ko-inkubiert wurden, ergaben, dass sich die siRNA kurz nach der Transfektion zuerst in vesikulären Strukturen – wobei es sich vermutlich um frühe Endosomen handelt- anreichert. Nach 24 h ist die Kolokalisation zum größten Teil aufgehoben. Die siRNA scheint aus den Vesikeln freigesetzt zu werden und findet sich in der Zielzelle über das gesamte Zytoplasma verteilt. Dies stimmt mit früheren Ergebnissen überein, welche besagen, dass RNAi in humanen Zellen auf das Zytoplasma beschränkt ist (Zeng und Cullen, 2002). Weiterhin hat man gefunden, dass RISC mit Ribosomen kolokalisiert (Hammond *et al.*, 2000). Die

siRNA der vorliegenden Studie zeigte unterschiedliche Effekte in den verschiedenen Zellkultursystemen. Zelllinien und undifferenzierte Primärzellen konnten leicht mit siRNA transfiziert werden. Im Gegensatz dazu zeigte differenziertes Atemwegsepithel weder die Aufnahme der siRNA noch einen biologischen Effekt. Die Aufnahmefähigkeit für siRNA scheint mit der Fähigkeit der siRNA, in die Zelle zu gelangen, zu korrelieren. Es ist bekannt, dass sich die Eigenschaften von differenziertem Atemwegsepithel grundlegend von undifferenzierten Zellen unterscheiden. Die beobachtete Limitation bei der Aufnahme der siRNA in Atemwegsepithel könnte den klinischen Einsatz unmodifizierter siRNA erschweren. Interessanterweise konnte eine signifikante Inhibition der NF-κB abhängigen Genexpression beobachtet werden, wenn undifferenzierte Primärzellen mit siRNA transfiziert wurden und anschließend in einem air liquid interface Kultursystem ausdifferenzierten. Diese Technik stellt einen sinnvollen Ansatz dar um die Funktion einzelner Gene in differenziertem Atemwegsepithel zu untersuchen. Die vorliegenden Ergebnisse könnten zur Etablierung eines neuen experimentellen Systems führen, um die Funktion spezifischer Gene in Atemwegsepithel mittels siRNA-vermittelter post-transkriptionaler Genblockade zu beurteilen. Sie zeigen auch, dass der Effekt der siRNA eine signifikante Zeit in humanen Primärzellen bestehen bleibt.
Viele pulmonäre Erkrankungen basieren auf entzündlichen Prozessen. Deshalb könnte die Modulation der Entzündungsantwort einen neuen therapeutischen Ansatz darstellen. Eine siRNA- oder AS vermittelte Suppression der Genfunktion sollte als neue therapeutische Modalität für Lungenerkrankungen entwickelt werden.

5.2 Atemwegsepithel erkennt Nukleinsäuren

Des Weiteren ergab die vorliegende Studie, dass Nukleinsäuren im Atemwegsepithel Entzündung induzieren können. Das humane respiratorische Epithel ist in der Lage, CpG Motive in bakterieller DNA und virale dsRNA zu erkennen. TLR9 und TLR3 werden im Atemwegsepithel exprimiert und sind sehr wahrscheinlich in diesen Erkennungsmechanismus involviert. Diese Daten geben einen wichtigen Einblick in die Rolle des humanen Atemwegsepithels bei der Erkennung von Pathogenen und seine Bedeutung in der angeborenen Immunität.

Es wurde gezeigt, dass TLR9 für die Erkennung von CpG DNA in Zellen des humanen Immunsystems essentiell ist (Chuang *et al.*, 2002). TLR3 dagegen scheint für die Erkennung viraler dsRNA verantwortlich zu sein (Alexopoulou *et al.*, 2001). Bemerkenswert ist, dass die in vielen dieser Studien verwendeten Zellen epithelialen Ursprungs waren. Die Effekte von CpG DNA auf humanen Immunzellen wie DC und B Lymphozyten umfassen Zytokinproduktion, B Zell Proliferation und DC Reifung (Ashkar und Rosenthal, 2002). Diese Reaktionen zeigen TLR9 defiziente Zellen nicht (Hemmi *et al.*, 2000). Bakterielle DNA und immunstimulierende CpG ODN aktivieren in vitro und in vivo Makrophagen und induzieren dort die Expression von Aktivierungsmarkern, NF-κB Translokation und die Produktion pro-inflammatorischer Zytokine wie TNF-α, IL-1, IL-6 und IL-12 und (Stacey *et al.*, 1996; Lipford *et al.*, 1997; Sparwasser *et al.*, 1997a; Sparwasser *et al.*, 1997b). TLR3 ist auf der Zelloberfläche von Fibroblasten (Matsumoto *et al.*, 2002), in verschiedenen Subtypen von DC (Muzio *et al.*, 2000), NK Zellen (Schmidt *et al.*, 2004) und in intestinalen Epithelzellen (Cario und Podolsky, 2000) exprimiert. Virale dsRNA und synthetische poly (I:C) induzieren in Fibroblasten Typ I Interferone (IFN-α und –β), die Transkription einiger IFN-induzierbarer Gene, fördern die Reifung von DC (Takeda *et al.*, 2003) und verstärken die Zytoxizität und die Produktion pro-inflammatorischer und antiviraler Zytokine in NK Zellen (Schmidt *et al.*, 2004).

In der vorliegenden Studie wird beschrieben, dass TLR9 und TLR3 in differenziertem Atemwegsepithel und Zelllinien des Atemwegsepithels exprimiert sind. Die FACS-Analyse weist auf eine intrazelluläre Expression des TLR9 hin. Eine Färbung mit dem humanen TLR9 Antikörper ohne vorhergehende Permeabilisierung der Zellen ergab im Gegensatz zu den permeabilisierten Zellen keinen Fluoreszenzshift gegenüber der Isotyp-Kontrolle. Dies stimmt mit den Ergebnissen aus früheren Untersuchungen überein, in denen gefunden wurde, dass für die Aktivierung von TLR9 in murinen Makrophagen die Internalisierung und endosomale Reifung der CpG DNA Voraussetzung ist (Ahmad-Nejad *et al.*, 2002). Im Gegensatz zu Zellwandbestandteilen ist bakterielle DNA für Zellen möglicherweise unsichtbar bevor die Struktur des Pathogens nicht zerstört und in der Folge die DNA freigesetzt wird. Diese Prozesse finden nach endosomaler Reifung, Azidifizierung und Produktion toxischer Substanzen im endosomalen / lysosomalen Kompartiment statt.

In vollständig ausdifferenziertem Atemwegsepithel bestand kein Unterschied zwischen der Applikation der CpG ODN von apikal und basolateral. Im Dünndarmepithel findet eine entzündliche Antwort auf Flagellin nur auf eine Stimulation von basolateral, nicht von apikal hin statt (Gewirtz *et al.*, 2001). Im Gegensatz zu den Ergebnissen in differenziertem Atemwegsepithel zeigten polarisierte Calu-3 eine stärkere Sekretion von IL-8 und IL-6 auf eine Stimulation von apikaler Seite hin.

Im Gegensatz zu PBMC (peripheral blood mononuclear cells) (Takeshita *et al.*, 2001) scheint die epitheliale Expression von TLR9 nicht signifikant durch IFN-γ reguliert zu sein. Nach Zugabe von IFN-γ zu der Zelllinie 1HAEo- konnte ein geringer Anstieg in der TLR9 mRNA Expression beobachtet werden, welcher allerdings unabhängig von der eingesetzten INF-γ Konzentration war. Auch konnte durch Vorbehandlung mit INF-γ und anschließende Stimulation lediglich ein additiver Effekt bzgl der IL-8- und IL-6-Sekretion beobachtet werden. Jedoch wäre mit einer gesteigerten Expression des TLR9 auch ein gesteigertes Ansprechen auf bakterielle DNA bzw. CpG ODN verbunden. Eine Stimulation mit TNF-α, LPS, DNA *E. coli*, CpG ODN oder Kombinationen dieser Stimuli ergaben keine Veränderungen der Expression auf mRNA Ebene. Diese Beobachtungen legen die Vermutung nahe, dass die Expression von TLR9 in Atemwegsepithel vielleicht gar nicht reguliert, sondern vielmehr konstitutiv ist. Ähnliches gilt für die Regulation des TLR3. Durch Stimulation mit dem TLR3 Liganden poly (I:C) konnte nur eine sehr geringe Steigerung der TLR3 Expression auf mRNA Ebene erreicht werden, während die TLR3 Expression auf die Gabe von IFN-γ unverändert blieb. Dies steht im Gegensatz zu den Ergebnissen in humanen DC und NK Zellen, wo sich die TLR3 Expression durch Zugabe von poly (I:C) erhöht (Matsumoto *et al.*, 2003; Schmidt *et al.*, 2004). Auch dies ist wiederum ein Hinweis, dass Unterschiede zwischen der TLR Regulation in Epithel- und in Immunzellen bestehen. Allerdings beschreiben andere Untersuchungen in Epithel- und Endothelzelllinien einen Anstieg der TLR3 Expression auf mRNA Ebene durch die Zugabe von IFN-γ (Miettinen *et al.*, 2001).

In dieser Arbeit wird gezeigt, dass TLR9 die Aktivierung von Epithelzellen durch CpG Motiv enthaltende ODN oder bakterielle DNA vermittelt. Mehrere

Beobachtungen untermauern diese These: 1. verschiedene Typen von CpG Motive enthaltender DNA induzieren Dosis-abhängig eine gesteigerte Sekretion von mehreren Outcome Parametern (IL-8, IL-6, hBD-2, NF-κB). 2. Eine Überexpression einer dominat negativen Form von MyD88 inhibiert die durch CpG DNA induzierte NF-κB Aktivierung. Etwas weniger effektiv war die Überexpression einer Kombination aus dominant negativen Formen von MyD88 und IRAK oder einer dominant negativen Form von IRAK alleine. MyD88 und IRAK sind zentrale Elemente des TLR Signaltransduktionswegs. MyD88 agiert dabei upstream von IRAK, was möglicherweise die etwas größere inhibitorische Potenz der dominant negativen Form von MyD88 im Vergleich zur dominant negativen Form von IRAK erklärt.

Ein kritischer Punkt ist die Kontamination von DNA Präparationen mit anderen bakteriellen Komponenten, besonders mit LPS. Um auszuschließen, dass eine Kontamination mit LPS für die beobachteten Effekte verantwortlich ist wurden Endotoxin-freie synthetische ODN verwendet. Außerdem sind relativ hohe Konzentrationen von LPS notwendig, um Atemwegsepithelzellen zu stimulieren (Becker *et al.*, 2000). Deshalb ist es unwahrscheinlich, dass eine Kontamination mit LPS für die beobachteten Effekte verantwortlich ist. Die Konzentrationen bakterieller DNA, welche für die Auslösung einer Immunantwort notwendig sind, unterscheiden sich zwischen Atemwegsepithelzellen und klassischen Immunzellen wie B Lymphozyten oder DC signifikant. Analog ist die Antwort von Antigen präsentierenden Zellen auf andere PAMPs wie LPS sensitiver als von Epithelzellen. Epithelzellen befinden sich in ständigem Kontakt mit bakteriellen Komponenten und mögen aus diesem Grund nicht auf jeden bakteriellen Reiz mit einer verstärkten Abgabe von Entzündungsmediatoren reagieren. Die Konzentrationen von bakterieller DNA in dieser Studie (25 µg / ml) entsprechen ungefähr einer bakteriellen Dichte von 2.5×10^8 CFU / ml. Diese bakterielle Belastung kann durchaus in den Atemwegen von Patienten mit schweren Infektionen wie zystischer Fibrose gefunden werden (Van Dalfsen *et al.*, 2002). Außerdem ist es schwierig, die Konzentrationen individueller Moleküle an der Oberfläche der Atemwege zu berechnen. Basierend auf der sehr kleinen Tiefe der Atemwegsflüssigkeit könnte eine minimale Menge von lysierten Bakterien ausreichen, um eine hohe Konzentration zellulärer bakterieller Komponenten zu erreichen.

Neben einer erhöhten Sekretion der pro-inflammatorischen Zytokine IL-6 und IL-8 wurde eine lokale Abwehrreaktion durch Induktion des antimikrobiellen Peptids hBD-2 beobachtet. Antimikrobielle Peptide sind wichtige Effektormoleküle der angeborenen Immunabwehr, welche von Epithelzellen und anderen Zelltypen produziert werden. Die Expression von hBD-2 wird zum Teil durch NF-κB kontrolliert (Tsutsumi-Ishii und Nagaoka, 2002).

In dieser Arbeit wird weiterhin gezeigt, dass TLR3 die Aktivierung von Epithelzellen durch poly (I:C) vermittelt. Untermauert wird diese These durch folgende Beobachtungen: 1. Poly (I:C) induziert Dosis- und Zeitabhängig eine gesteigerte Sekretion von mehreren Messparametern (IL-8, IL-6, NF-κB). 2. Eine Überexpression einer dominant negativen Form von MyD88 inhibiert die durch dsRNA induzierte NF-κB Aktivierung. Die Erkennung von viraler dsRNA erfolgt äußerst spezifisch, da weder einzelsträngige RNA (poly (C)), noch doppelsträngige DNA eine Entzündung in Atemwegsepithel hervorrufen. Eine leichte Entzündungsreaktion wird teilweise auch von poly (A:U) verursacht, welche im Vergleich zur Stimulation mit poly (I:C) signifikant schwächer ist. Dies stimmt mit Ergebnissen aus früheren Untersuchungen überein, welche nach Applikation von poly (A:U) auf Makrophagen eine schwache NF-κB Aktivierung beschreiben. Allerdings ist bekannt, dass dsRNA unspezifisch die Aktivierung des IFN-Systems auslöst (Stark *et al.*, 1998), was ebenfalls für eine gesteigerte Sekretion von Zytokinen verantwortlich sein könnte. Die Tatsache, dass die Überexpression einer dominant negativen Form von MyD88 die durch dsRNA induzierte NF-κB Aktivierung inhibiert, weist jedoch darauf hin, dass es sich hier um eine Sequenz-spezifische Erkennung durch TLR3 handelt.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass das humane respiratorische Epithel fähig ist, auf Nukleinsäuren mit einer Immunabwehrreaktion zu reagieren. TLR9 und TLR3 sind in Atemwegsepithelzellen exprimiert und vermitteln wahrscheinlich die Erkennung von bakterieller DNA bzw. viraler dsRNA. Diese Beobachtungen verdeutlichen die Rolle des respiratorischen Epithels in der Auslösung einer Immunantwort.

6 Zusammenfassung

Das Atemwegsepithel ist als Teil der angeborenen Immunität in der Lage, mikrobielle Bestandteile zu erkennen und mit einer Entzündungsreaktion zu antworten. Ziel der vorliegenden Studie war es, die Interaktion von kleinen Nukleinsäuren und Atemwegsepithel zu untersuchen.

Die vorliegende Studie ergab, dass durch die Applikation von AS ON und siRNA gegen die p65 Untereinheit von NF- κB die Genexpression im Atemwegsepithel verändert und entzündliche Reaktionen auf diese Weise modifiziert werden können. Die Aufnahme der Nukleinsäuren in Atemwegsepithel ist dabei abhängig vom verwendeten Transfektionsreagenz und dem Differenzierungsgrad der Zellen. Ein Vergleich der beiden Ansätze ergab, dass die Applikation von siRNA bezüglich der Inhibition von Entzündung im Atemwegsepithel einen stärkeren Effekt hervorruft.

Nukleinsäuren können im Atemwegsepithel jedoch auch entzündliche Reaktionen auslösen. Die Untersuchung der zugrunde liegenden Mechanismen ergab, dass das System der TLR, insbesondere TLR3 und TLR9 für diese Reaktionen verantwortlich sind. Hiermit wird klar, dass Atemwegsepithel nicht nur eine passive Barriere gegen eindringende Mikroorganismen darstellt, sondern aktiv an der Auslösung einer Immunantwort beteiligt ist.

Kürzlich neu gewonnene Einblicke in die Pathophysiologie entzündlicher Erkrankungen haben für die Entwicklung neuer therapeutischer Ansätze die Basis geliefert. Die vorliegende Studie zeigt, dass die Applikation kleiner Nukleinsäuren eine neue therapeutische Modalität für entzündliche Lungenerkrankungen wie Asthma, COPD und Zystische Fibrose darstellt. Die Ergebnisse weisen jedoch ebenfalls auf Limitationen dieser Therapieform hin. Die schlechte Zugänglichkeit des Atemwegsepithels stellt dabei das größte Hindernis dar. Die Tatsache, dass kleine Nukleinsäuren im Atemwegsepithel Entzündungsreaktionen verursachen können, verdeutlicht, dass eine sorgfältige Auswahl der Sequenz Voraussetzung für den therapeutischen Erfolg ist.

7 Literaturverzeichnis

AHMAD-NEJAD, P., HACKER, H., RUTZ, M., BAUER, S., VABULAS, R.M., and WAGNER, H. (2002). Bacterial CpG-DNA and lipopolysaccharides activate Toll-like receptors at distinct cellular compartments. Eur J Immunol **32**, 1958-1968.

AKIRA, S., TAKEDA, K., and KAISHO, T. (2001). Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. Nat Immunol **2**, 675-680.

ALEXOPOULOU, L., HOLT, A.C., MEDZHITOV, R., and FLAVELL, R.A. (2001). Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3. Nature **413**, 732-738.

ANANDALAKSHMI, R., MARATHE, R., GE, X., HERR, J.M., JR., MAU, C., MALLORY, A., PRUSS, G., BOWMAN, L., and VANCE, V.B. (2000). A calmodulin-related protein that suppresses posttranscriptional gene silencing in plants. Science **290**, 142-144.

ANFOSSI, G., GEWIRTZ, A.M., and CALABRETTA, B. (1989). An oligomer complementary to c-myb-encoded mRNA inhibits proliferation of human myeloid leukemia cell lines. Proc Natl Acad Sci U S A **86**, 3379-3383.

ANGELL, S.M., and BAULCOMBE, D.C. (1997). Consistent gene silencing in transgenic plants expressing a replicating potato virus X RNA. Embo J **16**, 3675-3684.

ANTO, R.J., MUKHOPADHYAY, A., SHISHODIA, S., GAIROLA, C.G., and AGGARWAL, B.B. (2002). Cigarette smoke condensate activates nuclear transcription factor-kappaB through phosphorylation and degradation of IkappaB(alpha): correlation with induction of cyclooxygenase-2. Carcinogenesis **23**, 1511-1518.

ASHKAR, A.A., and ROSENTHAL, K.L. (2002). Toll-like receptor 9, CpG DNA and innate immunity. Curr Mol Med **2**, 545-556.

BALS, R. (1997). [Cell types of respiratory epithelium: morphology, molecular biology and clinical significance]. Pneumologie **51**, 142-149.

BALS, R. (2000). Epithelial antimicrobial peptides in host defense against infection. Respir Res **1**, 141-150. Epub 2000 Oct 2020.

BALS, R., WANG, X., ZASLOFF, M., and WILSON, J.M. (1998). The peptide antibiotic LL-37/hCAP-18 is expressed in epithelia of the human lung where it has broad antimicrobial activity at the airway surface. Proc Natl Acad Sci U S A **95**, 9541-9546.

BANCHEREAU, J., and STEINMAN, R.M. (1998). Dendritic cells and the control of immunity. Nature **392**, 245-252.

BASS, B.L. (2000). Double-stranded RNA as a template for gene silencing. Cell **101**, 235-238.

BAUER, S., KIRSCHNING, C.J., HACKER, H., REDECKE, V., HAUSMANN, S., AKIRA, S., WAGNER, H., and LIPFORD, G.B. (2001). Human TLR9 confers responsiveness to bacterial DNA via species-specific CpG motif recognition. Proc Natl Acad Sci U S A **98**, 9237-9242.

BECKER, M.N., DIAMOND, G., VERGHESE, M.W., and RANDELL, S.H. (2000). CD14-dependent lipopolysaccharide-induced beta-defensin-2 expression in human tracheobronchial epithelium. J Biol Chem **275**, 29731-29736.

BELL, S., DEGITZ, K., QUIRLING, M., JILG, N., PAGE, S., and BRAND, K. (2003). Involvement of NF-kappaB signalling in skin physiology and disease. Cell Signal **15**, 1-7.

BENNETT, C.F., CHIANG, M.Y., CHAN, H., SHOEMAKER, J.E., and MIRABELLI, C.K. (1992). Cationic lipids enhance cellular uptake and activity of phosphorothioate antisense oligonucleotides. Mol Pharmacol **41**, 1023-1033.

BROWN, D.A., KANG, S.H., GRYAZNOV, S.M., DEDIONISIO, L., HEIDENREICH, O., SULLIVAN, S., XU, X., and NERENBERG, M.I. (1994). Effect of phosphorothioate modification of oligodeoxynucleotides on specific protein binding. J Biol Chem **269**, 26801-26805.

CARIO, E., and PODOLSKY, D.K. (2000). Differential alteration in intestinal epithelial cell expression of toll-like receptor 3 (TLR3) and TLR4 in inflammatory bowel disease. Infect Immun **68**, 7010-7017.

CHIN, D.J., GREEN, G.A., ZON, G., SZOKA, F.C., JR., and STRAUBINGER, R.M. (1990). Rapid nuclear accumulation of injected oligodeoxyribonucleotides. New Biol **2**, 1091-1100.

CHU, W.M., OSTERTAG, D., LI, Z.W., CHANG, L., CHEN, Y., HU, Y., WILLIAMS, B., PERRAULT, J., and KARIN, M. (1999). JNK2 and IKKbeta

are required for activating the innate response to viral infection. Immunity **11**, 721-731.

CHUANG, T.H., LEE, J., KLINE, L., MATHISON, J.C., and ULEVITCH, R.J. (2002). Toll-like receptor 9 mediates CpG-DNA signaling. J Leukoc Biol **71**, 538-544.

CROOKE, S.T. (2000). Progress in antisense technology: the end of the beginning. Methods Enzymol **313**, 3-45.

CULLEN, B.R. (2002). RNA interference: antiviral defense and genetic tool. Nat Immunol **3**, 597-599.

DI STEFANO, A., CARAMORI, G., OATES, T., CAPELLI, A., LUSUARDI, M., GNEMMI, I., IOLI, F., CHUNG, K.F., DONNER, C.F., BARNES, P.J., and ADCOCK, I.M. (2002). Increased expression of nuclear factor-kappaB in bronchial biopsies from smokers and patients with COPD. Eur Respir J **20**, 556-563.

ELBASHIR, S.M., HARBORTH, J., LENDECKEL, W., YALCIN, A., WEBER, K., and TUSCHL, T. (2001a). Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. Nature **411**, 494-498.

ELBASHIR, S.M., LENDECKEL, W., and TUSCHL, T. (2001b). RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs. Genes Dev **15**, 188-200.

FAGARD, M., BOUTET, S., MOREL, J.B., BELLINI, C., and VAUCHERET, H. (2000). AGO1, QDE-2, and RDE-1 are related proteins required for post-transcriptional gene silencing in plants, quelling in fungi, and RNA interference in animals. Proc Natl Acad Sci U S A **97**, 11650-11654.

FAURE, E., THOMAS, L., XU, H., MEDVEDEV, A., EQUILS, O., and ARDITI, M. (2001). Bacterial lipopolysaccharide and IFN-gamma induce Toll-like receptor 2 and Toll-like receptor 4 expression in human endothelial cells: role of NF-kappa B activation. J Immunol **166**, 2018-2024.

FIRE, A., XU, S., MONTGOMERY, M.K., KOSTAS, S.A., DRIVER, S.E., and MELLO, C.C. (1998). Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in Caenorhabditis elegans. Nature **391**, 806-811.

FISHER, T.L., TERHORST, T., CAO, X., and WAGNER, R.W. (1993). Intracellular disposition and metabolism of fluorescently-labeled unmodified and modified oligonucleotides microinjected into mammalian cells. Nucleic Acids Res **21**, 3857-3865.

GAGLIARDO, R., CHANEZ, P., MATHIEU, M., BRUNO, A., COSTANZO, G., GOUGAT, C., VACHIER, I., BOUSQUET, J., BONSIGNORE, G., and VIGNOLA, A.M. (2003). Persistent activation of nuclear factor-kappaB signaling pathway in severe uncontrolled asthma. Am J Respir Crit Care Med **168**, 1190-1198. Epub 2003 Jul 1131.

GEWIRTZ, A.M., and CALABRETTA, B. (1988). A c-myb antisense oligodeoxynucleotide inhibits normal human hematopoiesis in vitro. Science **242**, 1303-1306.

GEWIRTZ, A.T., NAVAS, T.A., LYONS, S., GODOWSKI, P.J., and MADARA, J.L. (2001). Cutting edge: bacterial flagellin activates basolaterally expressed TLR5 to induce epithelial proinflammatory gene expression. J Immunol **167**, 1882-1885.

GUIDOTTI, L.G., and CHISARI, F.V. (2001). Noncytolytic control of viral infections by the innate and adaptive immune response. Annu Rev Immunol **19**, 65-91.

GUILLOT, L., MEDJANE, S., LE-BARILLEC, K., BALLOY, V., DANEL, C., CHIGNARD, M., and SI-TAHAR, M. (2004). Response of human pulmonary epithelial cells to lipopolysaccharide involves Toll-like receptor 4 (TLR4)-dependent signaling pathways: evidence for an intracellular compartmentalization of TLR4. J Biol Chem **279**, 2712-2718. Epub 2003 Nov 2714.

GURSEL, I., GURSEL, M., ISHII, K.J., and KLINMAN, D.M. (2001). Sterically stabilized cationic liposomes improve the uptake and immunostimulatory activity of CpG oligonucleotides. J Immunol **167**, 3324-3328.

HACKER, H., VABULAS, R.M., TAKEUCHI, O., HOSHINO, K., AKIRA, S., and WAGNER, H. (2000). Immune cell activation by bacterial CpG-DNA through myeloid differentiation marker 88 and tumor necrosis factor receptor-associated factor (TRAF)6. J Exp Med **192**, 595-600.

HAMMOND, S.M., BERNSTEIN, E., BEACH, D., and HANNON, G.J. (2000). An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in Drosophila cells. Nature **404**, 293-296.

HARTMANN, G., BATTIANY, J., POECK, H., WAGNER, M., KERKMANN, M., LUBENOW, N., ROTHENFUSSER, S., and ENDRES, S. (2003). Rational design of new CpG oligonucleotides that combine B cell activation with high

IFN-alpha induction in plasmacytoid dendritic cells. Eur J Immunol **33**, 1633-1641.

HARTMANN, G., and KRIEG, A.M. (2000). Mechanism and function of a newly identified CpG DNA motif in human primary B cells. J Immunol **164**, 944-953.

HAYASHI, F., MEANS, T.K., and LUSTER, A.D. (2003). Toll-like receptors stimulate human neutrophil function. Blood **102**, 2660-2669. Epub 2003 Jun 2626.

HAYASHI, F., SMITH, K.D., OZINSKY, A., HAWN, T.R., YI, E.C., GOODLETT, D.R., ENG, J.K., AKIRA, S., UNDERHILL, D.M., and ADEREM, A. (2001). The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5. Nature **410**, 1099-1103.

HAYASHI, T., and FAUSTMAN, D.L. (2003). Role of defective apoptosis in type 1 diabetes and other autoimmune diseases. Recent Prog Horm Res **58**, 131-153.

HEIL, F., HEMMI, H., HOCHREIN, H., AMPENBERGER, F., KIRSCHNING, C., AKIRA, S., LIPFORD, G., WAGNER, H., and BAUER, S. (2004). Species-specific recognition of single-stranded RNA via toll-like receptor 7 and 8. Science **303**, 1526-1529. Epub 2004 Feb 1519.

HEMMI, H., KAISHO, T., TAKEUCHI, O., SATO, S., SANJO, H., HOSHINO, K., HORIUCHI, T., TOMIZAWA, H., TAKEDA, K., and AKIRA, S. (2002). Small anti-viral compounds activate immune cells via the TLR7 MyD88-dependent signaling pathway. Nat Immunol **3**, 196-200.

HEMMI, H., TAKEUCHI, O., KAWAI, T., KAISHO, T., SATO, S., SANJO, H., MATSUMOTO, M., HOSHINO, K., WAGNER, H., TAKEDA, K., and AKIRA, S. (2000). A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. Nature **408**, 740-745.

HERDEWIJN, P. (2000). Heterocyclic modifications of oligonucleotides and antisense technology. Antisense Nucleic Acid Drug Dev **10**, 297-310.

HERTZ, C.J., KIERTSCHER, S.M., GODOWSKI, P.J., BOUIS, D.A., NORGARD, M.V., ROTH, M.D., and MODLIN, R.L. (2001). Microbial lipopeptides stimulate dendritic cell maturation via Toll-like receptor 2. J Immunol **166**, 2444-2450.

HILL, E.M., BADER, T., NETTESHEIM, P., and ELING, T.E. (1996). Retinoid-induced differentiation regulates prostaglandin H synthase and cPLA2 expression in tracheal epithelium. Am J Physiol **270**, L854-862.

HILLIARD, B.A., MASON, N., XU, L., SUN, J., LAMHAMEDI-CHERRADI, S.E., LIOU, H.C., HUNTER, C., and CHEN, Y.H. (2002). Critical roles of c-Rel in autoimmune inflammation and helper T cell differentiation. J Clin Invest **110**, 843-850.

HIRSCHFELD, M., WEIS, J.J., TOSHCHAKOV, V., SALKOWSKI, C.A., CODY, M.J., WARD, D.C., QURESHI, N., MICHALEK, S.M., and VOGEL, S.N. (2001). Signaling by toll-like receptor 2 and 4 agonists results in differential gene expression in murine macrophages. Infect Immun **69**, 1477-1482.

HO, S.P., BAO, Y., LESHER, T., MALHOTRA, R., MA, L.Y., FLUHARTY, S.J., and SAKAI, R.R. (1998). Mapping of RNA accessible sites for antisense experiments with oligonucleotide libraries. Nat Biotechnol **16**, 59-63.

HO, S.P., BRITTON, D.H., STONE, B.A., BEHRENS, D.L., LEFFET, L.M., HOBBS, F.W., MILLER, J.A., and TRAINOR, G.L. (1996). Potent antisense oligonucleotides to the human multidrug resistance-1 mRNA are rationally selected by mapping RNA-accessible sites with oligonucleotide libraries. Nucleic Acids Res **24**, 1901-1907.

HORNG, T., BARTON, G.M., FLAVELL, R.A., and MEDZHITOV, R. (2002). The adaptor molecule TIRAP provides signalling specificity for Toll-like receptors. Nature **420**, 329-333.

HOSHINO, K., TAKEUCHI, O., KAWAI, T., SANJO, H., OGAWA, T., TAKEDA, Y., TAKEDA, K., and AKIRA, S. (1999). Cutting edge: Toll-like receptor 4 (TLR4)-deficient mice are hyporesponsive to lipopolysaccharide: evidence for TLR4 as the Lps gene product. J Immunol **162**, 3749-3752.

HUGHES, M.D., HUSSAIN, M., NAWAZ, Q., SAYYED, P., and AKHTAR, S. (2001). The cellular delivery of antisense oligonucleotides and ribozymes. Drug Discov Today **6**, 303-315.

IMLER, J.L., and HOFFMANN, J.A. (2001). Toll receptors in innate immunity. Trends Cell Biol **11**, 304-311.

JACOBS, B.L., and LANGLAND, J.O. (1996). When two strands are better than one: the mediators and modulators of the cellular responses to double-stranded RNA. Virology **219**, 339-349.

KADOWAKI, N., HO, S., ANTONENKO, S., MALEFYT, R.W., KASTELEIN, R.A., BAZAN, F., and LIU, Y.J. (2001). Subsets of human dendritic cell precursors express different toll-like receptors and respond to different microbial antigens. J Exp Med **194**, 863-869.

KAISHO, T., and AKIRA, S. (2001). Dendritic-cell function in Toll-like receptor- and MyD88-knockout mice. Trends Immunol **22**, 78-83.

KARIN, M., YAMAMOTO, Y., and WANG, Q.M. (2004). The IKK NF-kappa B system: a treasure trove for drug development. Nat Rev Drug Discov **3**, 17-26.

KAWAI, T., ADACHI, O., OGAWA, T., TAKEDA, K., and AKIRA, S. (1999). Unresponsiveness of MyD88-deficient mice to endotoxin. Immunity **11**, 115-122.

KITABWALLA, M., and RUPRECHT, R.M. (2002). RNA interference--a new weapon against HIV and beyond. N Engl J Med **347**, 1364-1367.

KLINE, J.N., KITAGAKI, K., BUSINGA, T.R., and JAIN, V.V. (2002). Treatment of established asthma in a murine model using CpG oligodeoxynucleotides. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol **283**, L170-179.

KOBAYASHI, K., HERNANDEZ, L.D., GALAN, J.E., JANEWAY, C.A., JR., MEDZHITOV, R., and FLAVELL, R.A. (2002). IRAK-M is a negative regulator of Toll-like receptor signaling. Cell **110**, 191-202.

KOCZULLA, R., VON DEGENFELD, G., KUPATT, C., KROTZ, F., ZAHLER, S., GLOE, T., ISSBRUCKER, K., UNTERBERGER, P., ZAIOU, M., LEBHERZ, C., KARL, A., RAAKE, P., PFOSSER, A., BOEKSTEGERS, P., WELSCH, U., HIEMSTRA, P.S., VOGELMEIER, C., GALLO, R.L., CLAUSS, M., and BALS, R. (2003). An angiogenic role for the human peptide antibiotic LL-37/hCAP-18. J Clin Invest **111**, 1665-1672.

KONDO, M., FINKBEINER, W.E., and WIDDICOMBE, J.H. (1991). Simple technique for culture of highly differentiated cells from dog tracheal epithelium. Am J Physiol **261**, L106-117.

KRIEG, A.M. (1996). Lymphocyte activation by CpG dinucleotide motifs in prokaryotic DNA. Trends Microbiol **4**, 73-76.

KRIEG, A.M. (2002). CpG motifs in bacterial DNA and their immune effects. Annu Rev Immunol **20**, 709-760. Epub 2001 Oct 2004.

KRIEG, A.M., YI, A.K., MATSON, S., WALDSCHMIDT, T.J., BISHOP, G.A., TEASDALE, R., KORETZKY, G.A., and KLINMAN, D.M. (1995). CpG motifs in bacterial DNA trigger direct B-cell activation. Nature **374**, 546-549.

KRUG, A., TOWAROWSKI, A., BRITSCH, S., ROTHENFUSSER, S., HORNUNG, V., BALS, R., GIESE, T., ENGELMANN, H., ENDRES, S., KRIEG, A.M., and HARTMANN, G. (2001). 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 **31**, 3026-3037.

KURRECK, J. (2003). Antisense technologies. Improvement through novel chemical modifications. Eur J Biochem **270**, 1628-1644.

KURRECK, J., BIEBER, B., JAHNEL, R., and ERDMANN, V.A. (2002). Comparative study of DNA enzymes and ribozymes against the same full-length messenger RNA of the vanilloid receptor subtype I. J Biol Chem **277**, 7099-7107. Epub 2001 Dec 7020.

KURT-JONES, E.A., POPOVA, L., KWINN, L., HAYNES, L.M., JONES, L.P., TRIPP, R.A., WALSH, E.E., FREEMAN, M.W., GOLENBOCK, D.T., ANDERSON, L.J., and FINBERG, R.W. (2000). Pattern recognition receptors TLR4 and CD14 mediate response to respiratory syncytial virus. Nat Immunol **1**, 398-401.

LAI, J., GOLD, M.S., KIM, C.S., BIAN, D., OSSIPOV, M.H., HUNTER, J.C., and PORRECA, F. (2002). Inhibition of neuropathic pain by decreased expression of the tetrodotoxin-resistant sodium channel, NaV1.8. Pain **95**, 143-152.

LATZ, E., SCHOENEMEYER, A., VISINTIN, A., FITZGERALD, K.A., MONKS, B.G., KNETTER, C.F., LIEN, E., NILSEN, N.J., ESPEVIK, T., and GOLENBOCK, D.T. (2004). TLR9 signals after translocating from the ER to CpG DNA in the lysosome. Nat Immunol **5**, 190-198. Epub 2004 Jan 2011.

LEADBETTER, E.A., RIFKIN, I.R., HOHLBAUM, A.M., BEAUDETTE, B.C., SHLOMCHIK, M.J., and MARSHAK-ROTHSTEIN, A. (2002). Chromatin-IgG complexes activate B cells by dual engagement of IgM and Toll-like receptors. Nature **416**, 603-607.

LEBEDEVA, I., BENIMETSKAYA, L., STEIN, C.A., and VILENCHIK, M. (2000). Cellular delivery of antisense oligonucleotides. Eur J Pharm Biopharm **50**, 101-119.

LEMAITRE, B., NICOLAS, E., MICHAUT, L., REICHHART, J.M., and HOFFMANN, J.A. (1996). The dorsoventral regulatory gene cassette spatzle/Toll/cactus controls the potent antifungal response in Drosophila adults. Cell **86**, 973-983.

LEVIN, A.A. (1999). A review of the issues in the pharmacokinetics and toxicology of phosphorothioate antisense oligonucleotides. Biochim Biophys Acta **1489**, 69-84.

LI, D., and MRSNY, R.J. (2000). Oncogenic Raf-1 disrupts epithelial tight junctions via downregulation of occludin. J Cell Biol **148**, 791-800.

LI, S., STRELOW, A., FONTANA, E.J., and WESCHE, H. (2002). IRAK-4: a novel member of the IRAK family with the properties of an IRAK-kinase. Proc Natl Acad Sci U S A **99**, 5567-5572.

LIANG, L., LIU, D.P., and LIANG, C.C. (2002). Optimizing the delivery systems of chimeric RNA.DNA oligonucleotides. Eur J Biochem **269**, 5753-5758.

LINDBO, J.A., SILVA-ROSALES, L., PROEBSTING, W.M., and DOUGHERTY, W.G. (1993). Induction of a Highly Specific Antiviral State in Transgenic Plants: Implications for Regulation of Gene Expression and Virus Resistance. Plant Cell **5**, 1749-1759.

LIPARDI, C., WEI, Q., and PATERSON, B.M. (2001). RNAi as random degradative PCR: siRNA primers convert mRNA into dsRNAs that are degraded to generate new siRNAs. Cell **107**, 297-307.

LIPFORD, G.B., HEEG, K., and WAGNER, H. (1998). Bacterial DNA as immune cell activator. Trends Microbiol **6**, 496-500.

LIPFORD, G.B., SPARWASSER, T., BAUER, M., ZIMMERMANN, S., KOCH, E.S., HEEG, K., and WAGNER, H. (1997). Immunostimulatory DNA: sequence-dependent production of potentially harmful or useful cytokines. Eur J Immunol **27**, 3420-3426.

LOKE, S.L., STEIN, C.A., ZHANG, X.H., MORI, K., NAKANISHI, M., SUBASINGHE, C., COHEN, J.S., and NECKERS, L.M. (1989). Characterization of oligonucleotide transport into living cells. Proc Natl Acad Sci U S A **86**, 3474-3478.

LUND, J., SATO, A., AKIRA, S., MEDZHITOV, R., and IWASAKI, A. (2003). Toll-like receptor 9-mediated recognition of Herpes simplex virus-2 by plasmacytoid dendritic cells. J Exp Med **198**, 513-520.

MACEJAK, D.G., JENSEN, K.L., JAMISON, S.F., DOMENICO, K., ROBERTS, E.C., CHAUDHARY, N., VON CARLOWITZ, I., BELLON, L., TONG, M.J., CONRAD, A., PAVCO, P.A., and BLATT, L.M. (2000). Inhibition of hepatitis C virus (HCV)-RNA-dependent translation and replication of a chimeric HCV poliovirus using synthetic stabilized ribozymes. Hepatology **31**, 769-776.

MANCHE, L., GREEN, S.R., SCHMEDT, C., and MATHEWS, M.B. (1992). Interactions between double-stranded RNA regulators and the protein kinase DAI. Mol Cell Biol **12**, 5238-5248.

MANZEL, L., and MACFARLANE, D.E. (1999). Lack of immune stimulation by immobilized CpG-oligodeoxynucleotide. Antisense Nucleic Acid Drug Dev **9**, 459-464.

MATSUMOTO, M., FUNAMI, K., TANABE, M., OSHIUMI, H., SHINGAI, M., SETO, Y., YAMAMOTO, A., and SEYA, T. (2003). Subcellular localization of Toll-like receptor 3 in human dendritic cells. J Immunol **171**, 3154-3162.

MATSUMOTO, M., KIKKAWA, S., KOHASE, M., MIYAKE, K., and SEYA, T. (2002). Establishment of a monoclonal antibody against human Toll-like receptor 3 that blocks double-stranded RNA-mediated signaling. Biochem Biophys Res Commun **293**, 1364-1369.

MATVEEVA, O., FELDEN, B., AUDLIN, S., GESTELAND, R.F., and ATKINS, J.F. (1997). A rapid in vitro method for obtaining RNA accessibility patterns for complementary DNA probes: correlation with an intracellular pattern and known RNA structures. Nucleic Acids Res **25**, 5010-5016.

MCCURDY, J.D., LIN, T.J., and MARSHALL, J.S. (2001). Toll-like receptor 4-mediated activation of murine mast cells. J Leukoc Biol **70**, 977-984.

MEDZHITOV, R. (2001). Toll-like receptors and innate immunity. Nat Rev Immunol **1**, 135-145.

MICHELSEN, K.S., AICHER, A., MOHAUPT, M., HARTUNG, T., DIMMELER, S., KIRSCHNING, C.J., and SCHUMANN, R.R. (2001). The role of toll-like receptors (TLRs) in bacteria-induced maturation of murine dendritic cells (DCS). Peptidoglycan and lipoteichoic acid are inducers of DC maturation and require TLR2. J Biol Chem **276**, 25680-25686. Epub 22001 Apr 25620.

MIETTINEN, M., SARENEVA, T., JULKUNEN, I., and MATIKAINEN, S. (2001). IFNs activate toll-like receptor gene expression in viral infections. Genes Immun **2**, 349-355.

MILNER, N., MIR, K.U., and SOUTHERN, E.M. (1997). Selecting effective antisense reagents on combinatorial oligonucleotide arrays. Nat Biotechnol **15**, 537-541.

MINKS, M.A., WEST, D.K., BENVIN, S., and BAGLIONI, C. (1979). 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 **254**, 10180-10183.

MIYAZAKI, J., TAKAKI, S., ARAKI, K., TASHIRO, F., TOMINAGA, A., TAKATSU, K., and YAMAMURA, K. (1989). Expression vector system based on the chicken beta-actin promoter directs efficient production of interleukin-5. Gene **79**, 269-277.

MOULDS, C., LEWIS, J.G., FROEHLER, B.C., GRANT, D., HUANG, T., MILLIGAN, J.F., MATTEUCCI, M.D., and WAGNER, R.W. (1995). Site and mechanism of antisense inhibition by C-5 propyne oligonucleotides. Biochemistry **34**, 5044-5053.

MUZIO, M., BOSISIO, D., POLENTARUTTI, N., D'AMICO, G., STOPPACCIARO, A., MANCINELLI, R., VAN'T VEER, C., PENTON-ROL, G., RUCO, L.P., ALLAVENA, P., and MANTOVANI, A. (2000). Differential expression and regulation of toll-like receptors (TLR) in human leukocytes: selective expression of TLR3 in dendritic cells. J Immunol **164**, 5998-6004.

MUZIO, M., NI, J., FENG, P., and DIXIT, V.M. (1997). IRAK (Pelle) family member IRAK-2 and MyD88 as proximal mediators of IL-1 signaling. Science **278**, 1612-1615.

NOVINA, C.D., MURRAY, M.F., DYKXHOORN, D.M., BERESFORD, P.J., RIESS, J., LEE, S.K., COLLMAN, R.G., LIEBERMAN, J., SHANKAR, P., and SHARP, P.A. (2002). siRNA-directed inhibition of HIV-1 infection. Nat Med **8**, 681-686.

PICKFORD, A.S., and COGONI, C. (2003). RNA-mediated gene silencing. Cell Mol Life Sci **60**, 871-882.

RANKIN, R., PONTAROLLO, R., IOANNOU, X., KRIEG, A.M., HECKER, R., BABIUK, L.A., and VAN DRUNEN LITTEL-VAN DEN HURK, S. (2001). CpG motif identification for veterinary and laboratory species demonstrates that sequence recognition is highly conserved. Antisense Nucleic Acid Drug Dev **11**, 333-340.

RASTOGI, D., RATNER, A.J., and PRINCE, A. (2001). Host-bacterial interactions in the initiation of inflammation. Paediatr Respir Rev **2**, 245-252.

RAY, A., and COHN, L. (1999). Th2 cells and GATA-3 in asthma: new insights into the regulation of airway inflammation. J Clin Invest **104**, 985-993.

REIS E SOUSA, C. (2001). Dendritic cells as sensors of infection. Immunity **14**, 495-498.

REYNOLDS, A., LEAKE, D., BOESE, Q., SCARINGE, S., MARSHALL, W.S., and KHVOROVA, A. (2004). Rational siRNA design for RNA interference. Nat Biotechnol **22**, 326-330. Epub 2004 Feb 2001.

RIFKIN, I.R., LEADBETTER, E.A., BEAUDETTE, B.C., KIANI, C., MONESTIER, M., SHLOMCHIK, M.J., and MARSHAK-ROTHSTEIN, A. (2000). Immune complexes present in the sera of autoimmune mice activate rheumatoid factor B cells. J Immunol **165**, 1626-1633.

SANO, K., HANEDA, K., TAMURA, G., and SHIRATO, K. (1999). Ovalbumin (OVA) and Mycobacterium tuberculosis bacilli cooperatively polarize anti-OVA T-helper (Th) cells toward a Th1-dominant phenotype and ameliorate murine tracheal eosinophilia. Am J Respir Cell Mol Biol **20**, 1260-1267.

SCACHERI, P.C., ROZENBLATT-ROSEN, O., CAPLEN, N.J., WOLFSBERG, T.G., UMAYAM, L., LEE, J.C., HUGHES, C.M., SHANMUGAM, K.S., BHATTACHARJEE, A., MEYERSON, M., and COLLINS, F.S. (2004). Short interfering RNAs can induce unexpected and divergent changes in the levels of untargeted proteins in mammalian cells. Proc Natl Acad Sci U S A **101**, 1892-1897. Epub 2004 Feb 1899.

SCHMIDT, K.N., LEUNG, B., KWONG, M., ZAREMBER, K.A., SATYAL, S., NAVAS, T.A., WANG, F., and GODOWSKI, P.J. (2004). APC-independent activation of NK cells by the Toll-like receptor 3 agonist double-stranded RNA. J Immunol **172**, 138-143.

SHARMA, H.W., and NARAYANAN, R. (1995). The therapeutic potential of antisense oligonucleotides. Bioessays **17**, 1055-1063.

SHI, N., BOADO, R.J., and PARDRIDGE, W.M. (2000). Antisense imaging of gene expression in the brain in vivo. Proc Natl Acad Sci U S A **97**, 14709-14714.

SHIRAKAWA, T., ENOMOTO, T., SHIMAZU, S., and HOPKIN, J.M. (1997). The inverse association between tuberculin responses and atopic disorder. Science **275**, 77-79.

SHLOMCHIK, M.J., MARSHAK-ROTHSTEIN, A., WOLFOWICZ, C.B., ROTHSTEIN, T.L., and WEIGERT, M.G. (1987). The role of clonal selection and somatic mutation in autoimmunity. Nature **328**, 805-811.

SNYDER, P.M. (2000). Liddle's syndrome mutations disrupt cAMP-mediated translocation of the epithelial Na(+) channel to the cell surface. J Clin Invest **105**, 45-53.

SPARWASSER, T., MIETHKE, T., LIPFORD, G., BORSCHERT, K., HACKER, H., HEEG, K., and WAGNER, H. (1997a). Bacterial DNA causes septic shock. Nature **386**, 336-337.

SPARWASSER, T., MIETHKE, T., LIPFORD, G., ERDMANN, A., HACKER, H., HEEG, K., and WAGNER, H. (1997b). Macrophages sense pathogens via DNA motifs: induction of tumor necrosis factor-alpha-mediated shock. Eur J Immunol **27**, 1671-1679.

STACEY, K.J., SWEET, M.J., and HUME, D.A. (1996). Macrophages ingest and are activated by bacterial DNA. J Immunol **157**, 2116-2122.

STARK, G.R., KERR, I.M., WILLIAMS, B.R., SILVERMAN, R.H., and SCHREIBER, R.D. (1998). How cells respond to interferons. Annu Rev Biochem **67**, 227-264.

STEIN, C.A. (2001). The experimental use of antisense oligonucleotides: a guide for the perplexed. J Clin Invest **108**, 641-644.

SUPAJATURA, V., USHIO, H., NAKAO, A., OKUMURA, K., RA, C., and OGAWA, H. (2001). Protective roles of mast cells against enterobacterial infection are mediated by Toll-like receptor 4. J Immunol **167**, 2250-2256.

SUZUKI, N., SUZUKI, S., DUNCAN, G.S., MILLAR, D.G., WADA, T., MIRTSOS, C., TAKADA, H., WAKEHAM, A., ITIE, A., LI, S., PENNINGER, J.M., WESCHE, H., OHASHI, P.S., MAK, T.W., and YEH, W.C. (2002). Severe impairment of interleukin-1 and Toll-like receptor signalling in mice lacking IRAK-4. Nature **416**, 750-756.

SWANTEK, J.L., TSEN, M.F., COBB, M.H., and THOMAS, J.A. (2000). IL-1 receptor-associated kinase modulates host responsiveness to endotoxin. J Immunol **164**, 4301-4306.

TAK, P.P., and FIRESTEIN, G.S. (2001). NF-kappaB: a key role in inflammatory diseases. J Clin Invest **107**, 7-11.

TAKEDA, K., KAISHO, T., and AKIRA, S. (2003). Toll-like receptors. Annu Rev Immunol **21**, 335-376. Epub 2001 Dec 2019.

TAKESHITA, F., GURSEL, I., ISHII, K.J., SUZUKI, K., GURSEL, M., and KLINMAN, D.M. (2004). Signal transduction pathways mediated by the interaction of CpG DNA with Toll-like receptor 9. Semin Immunol **16**, 17-22.

TAKESHITA, F., LEIFER, C.A., GURSEL, I., ISHII, K.J., TAKESHITA, S., GURSEL, M., and KLINMAN, D.M. (2001). Cutting edge: Role of Toll-like receptor 9 in CpG DNA-induced activation of human cells. J Immunol **167**, 3555-3558.

TAKEUCHI, O., KAUFMANN, A., GROTE, K., KAWAI, T., HOSHINO, K., MORR, M., MUHLRADT, P.F., and AKIRA, S. (2000a). Cutting edge: preferentially the R-stereoisomer of the mycoplasmal lipopeptide macrophage-activating lipopeptide-2 activates immune cells through a toll-like receptor 2- and MyD88-dependent signaling pathway. J Immunol **164**, 554-557.

TAKEUCHI, O., TAKEDA, K., HOSHINO, K., ADACHI, O., OGAWA, T., and AKIRA, S. (2000b). Cellular responses to bacterial cell wall components are mediated through MyD88-dependent signaling cascades. Int Immunol **12**, 113-117.

TAN, E.M. (1989). Antinuclear antibodies: diagnostic markers for autoimmune diseases and probes for cell biology. Adv Immunol **44**, 93-151.

THIERRY, A.R., and DRITSCHILO, A. (1992). Intracellular availability of unmodified, phosphorothioated and liposomally encapsulated oligodeoxynucleotides for antisense activity. Nucleic Acids Res **20**, 5691-5698.

THOMA-USZYNSKI, S., STENGER, S., TAKEUCHI, O., OCHOA, M.T., ENGELE, M., SIELING, P.A., BARNES, P.F., ROLLINGHOFF, M., BOLCSKEI, P.L., WAGNER, M., AKIRA, S., NORGARD, M.V., BELISLE, J.T., GODOWSKI, P.J., BLOOM, B.R., and MODLIN, R.L. (2001).

Induction of direct antimicrobial activity through mammalian toll-like receptors. Science **291**, 1544-1547.

TIGHE, H., TAKABAYASHI, K., SCHWARTZ, D., VAN NEST, G., TUCK, S., EIDEN, J.J., KAGEY-SOBOTKA, A., CRETICOS, P.S., LICHTENSTEIN, L.M., SPIEGELBERG, H.L., and RAZ, E. (2000). Conjugation of immunostimulatory DNA to the short ragweed allergen amb a 1 enhances its immunogenicity and reduces its allergenicity. J Allergy Clin Immunol **106**, 124-134.

TONKINSON, J.L., and STEIN, C.A. (1994). Patterns of intracellular compartmentalization, trafficking and acidification of 5'-fluorescein labeled phosphodiester and phosphorothioate oligodeoxynucleotides in HL60 cells. Nucleic Acids Res **22**, 4268-4275.

TSUJI, S., MATSUMOTO, M., TAKEUCHI, O., AKIRA, S., AZUMA, I., HAYASHI, A., TOYOSHIMA, K., and SEYA, T. (2000). Maturation of human dendritic cells by cell wall skeleton of Mycobacterium bovis bacillus Calmette-Guerin: involvement of toll-like receptors. Infect Immun **68**, 6883-6890.

TSUTSUMI-ISHII, Y., and NAGAOKA, I. (2002). NF-kappa B-mediated transcriptional regulation of human beta-defensin-2 gene following lipopolysaccharide stimulation. J Leukoc Biol **71**, 154-162.

TUCKER, T.A., VARGA, K., BEBOK, Z., ZSEMBERY, A., MCCARTY, N.A., COLLAWN, J.F., SCHWIEBERT, E.M., and SCHWIEBERT, L.M. (2003). Transient transfection of polarized epithelial monolayers with CFTR and reporter genes using efficacious lipids. Am J Physiol Cell Physiol **284**, C791-804. Epub 2002 Nov 2006.

TUSCHL, T. (2001). RNA interference and small interfering RNAs. Chembiochem **2**, 239-245.

UDUEHI, A.N., MOSS, S.H., NUTTALL, J., and POUTON, C.W. (1999). Cationic lipid-mediated transfection of differentiated Caco-2 cells: a filter culture model of gene delivery to a polarized epithelium. Pharm Res **16**, 1805-1811.

UNDERHILL, D.M., OZINSKY, A., HAJJAR, A.M., STEVENS, A., WILSON, C.B., BASSETTI, M., and ADEREM, A. (1999). The Toll-like receptor 2 is recruited to macrophage phagosomes and discriminates between pathogens. Nature **401**, 811-815.

VAN DALFSEN, J.M., STAPP, J.R., PHELPS, C., STEWART, P., and BURNS, J.L. (2002). Comparison of two culture methods for detection of tobramycin-resistant gram-negative organisms in the sputum of patients with cystic fibrosis. J Clin Microbiol **40**, 26-30.

VARGA, L.V., TOTH, S., NOVAK, I., and FALUS, A. (1999). Antisense strategies: functions and applications in immunology. Immunol Lett **69**, 217-224.

VERDEL, A., JIA, S., GERBER, S., SUGIYAMA, T., GYGI, S., GREWAL, S.I., and MOAZED, D. (2004). RNAi-mediated targeting of heterochromatin by the RITS complex. Science **303**, 672-676. Epub 2004 Jan 2002.

VERTHELYI, D., ISHII, K.J., GURSEL, M., TAKESHITA, F., and KLINMAN, D.M. (2001). Human peripheral blood cells differentially recognize and respond to two distinct CPG motifs. J Immunol **166**, 2372-2377.

VISINTIN, A., MAZZONI, A., SPITZER, J.H., WYLLIE, D.H., DOWER, S.K., and SEGAL, D.M. (2001). Regulation of Toll-like receptors in human monocytes and dendritic cells. J Immunol **166**, 249-255.

WAGNER, R.W. (1995). The state of the art in antisense research. Nat Med **1**, 1116-1118.

WERTS, C., TAPPING, R.I., MATHISON, J.C., CHUANG, T.H., KRAVCHENKO, V., SAINT GIRONS, I., HAAKE, D.A., GODOWSKI, P.J., HAYASHI, F., OZINSKY, A., UNDERHILL, D.M., KIRSCHNING, C.J., WAGNER, H., ADEREM, A., TOBIAS, P.S., and ULEVITCH, R.J. (2001). Leptospiral lipopolysaccharide activates cells through a TLR2-dependent mechanism. Nat Immunol **2**, 346-352.

WRIGHT, J.G., and CHRISTMAN, J.W. (2003). The role of nuclear factor kappa B in the pathogenesis of pulmonary diseases: implications for therapy. Am J Respir Med **2**, 211-219.

YAMAMOTO, M., SATO, S., HEMMI, H., SANJO, H., UEMATSU, S., KAISHO, T., HOSHINO, K., TAKEUCHI, O., KOBAYASHI, M., FUJITA, T., TAKEDA, K., and AKIRA, S. (2002). Essential role for TIRAP in activation of the signalling cascade shared by TLR2 and TLR4. Nature **420**, 324-329.

YAMAMOTO, S., YAMAMOTO, T., and TOKUNAGA, T. (2000). The discovery of immunostimulatory DNA sequence. Springer Semin Immunopathol **22**, 11-19.

YAMAMOTO, T., YAMAMOTO, S., KATAOKA, T., and TOKUNAGA, T. (1994). Lipofection of synthetic oligodeoxyribonucleotide having a palindromic sequence of AACGTT to murine splenocytes enhances interferon production and natural killer activity. Microbiol Immunol **38**, 831-836.

YAMAYA, M., FINKBEINER, W.E., CHUN, S.Y., and WIDDICOMBE, J.H. (1992). Differentiated structure and function of cultures from human tracheal epithelium. Am J Physiol **262**, L713-724.

YANG, Y.L., REIS, L.F., PAVLOVIC, J., AGUZZI, A., SCHAFER, R., KUMAR, A., WILLIAMS, B.R., AGUET, M., and WEISSMANN, C. (1995). Deficient signaling in mice devoid of double-stranded RNA-dependent protein kinase. Embo J **14**, 6095-6106.

YI, A.K., CHANG, M., PECKHAM, D.W., KRIEG, A.M., and ASHMAN, R.F. (1998). CpG oligodeoxyribonucleotides rescue mature spleen B cells from spontaneous apoptosis and promote cell cycle entry. J Immunol **160**, 5898-5906.

ZABNER, J., ZEIHER, B.G., FRIEDMAN, E., and WELSH, M.J. (1996). Adenovirus-mediated gene transfer to ciliated airway epithelia requires prolonged incubation time. J Virol **70**, 6994-7003.

ZAMECNIK, P.C., and STEPHENSON, M.L. (1978). Inhibition of Rous sarcoma virus replication and cell transformation by a specific oligodeoxynucleotide. Proc Natl Acad Sci U S A **75**, 280-284.

ZENG, Y., and CULLEN, B.R. (2002). RNA interference in human cells is restricted to the cytoplasm. Rna **8**, 855-860.

ZHENG, L., LIU, J., BATALOV, S., ZHOU, D., ORTH, A., DING, S., and SCHULTZ, P.G. (2004). An approach to genomewide screens of expressed small interfering RNAs in mammalian cells. Proc Natl Acad Sci U S A **101**, 135-140. Epub 2003 Dec 2019.

ZHOU, A., SCOGGIN, S., GAYNOR, R.B., and WILLIAMS, N.S. (2003). Identification of NF-kappa B-regulated genes induced by TNFalpha utilizing expression profiling and RNA interference. Oncogene **22**, 2054-2064.

ZUANY-AMORIM, C., HASTEWELL, J., and WALKER, C. (2002a). Toll-like receptors as potential therapeutic targets for multiple diseases. Nat Rev Drug Discov **1**, 797-807.

ZUANY-AMORIM, C., MANLIUS, C., TRIFILIEFF, A., BRUNET, L.R., ROOK, G., BOWEN, G., PAY, G., and WALKER, C. (2002b). Long-term protective and antigen-specific effect of heat-killed Mycobacterium vaccae in a murine model of allergic pulmonary inflammation. J Immunol **169**, 1492-1499.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Vor- und Zuname: Juliane Platz

Geburtsdatum,-ort: 17. September 1975, Hannover

Staatsangehörigkeit: deutsch

Familienstand: ledig

Schulischer Werdegang

1982 – 1986 Raiffeisenschule, Unterschleißheim

1986 – 1995 Carl-Orff-Gymnasium, Unterschleißheim

1995 Abitur

Beruflicher Werdegang

11/1995 – 07/2001 Studium der Pharmazie,
Ludwig-Maximilians-Universität, München

05/2000 – 10/2000 Praktikum, Bienenapotheke, München

11/2000 – 04/2001	Praktikum, University of Florida, Department of Pharmacy, Gainesville, Florida, USA
08/2001 – 11/2001	Promotionsstudium, Medizinische Klinik und Poliklinik I, Ludwig-Maximilians-Universität, München Titel: *Modifikation der Genexpression respiratorischen Epithels mittels Oligonukleotiden zur Entwicklung innovativer Behandlungsstrategien von entzündlichen Erkrankungen der Atemwege*
Seit 12/2001	Fortsetzung des Promotionsstudiums, Innere Medizin, Schwerpunkt Pneumologie, Klinikum der Philipps-Universität, Marburg

Publikationen & Präsentationen

03/2001 Annual College of Pharmacy Research Day, Gainesville, Florida: Effect of Vitamin E TPGS and Cremophor RH 40 on the particle size and dissolution of cyclosporine. J. Platz, N. Nagaraja, V.A. Bhattaram, H. Derendorf

09/2002 Annual Congress of the European Respiratory Society, Stockholm, Schweden: Microbial DNA and RNA induce a host defense reaction of human respiratory epithelial cells. J. Platz, R. Koczulla, A. Püchner, C. Vogelmeier, R. Bals

09/2002 Herbsttagung der Sektion Zellbiologie der Deutschen Gesellschaft für Pneumologie 2002, München, Deutschland: Bakterielle DNA induziert eine Abwehrreaktion in humanem Atemwegsepithel. J. Platz, R. Koczulla, A. Püchner, C. Vogelmeier, R. Bals

03/2003 Tagung der Deutschen Gesellschaft für Pneumologie, München, Deutschland: Bakterielle DNA induziert eine Abwehrreaktion in humanem Atemwegsepithel. J. Platz, R. Koczulla, A. Püchner, C. Vogelmeier, R. Bals

10/2003 Herbsttagung der Sektion Zellbiologie der Deutschen Gesellschaft für Pneumologie 2003, Magdeburg, Deutschland: siRNA Inhibition von Entzündung in Atemwegsepithel. J. Platz, C. Vogelmeier, R. Bals

03/2004 Tagung der Deutschen Gesellschaft für Pneumologie, Frankfurt, Deutschland
siRNA Inhibition von Entzündung in Atemwegsepithel. J. Platz, C. Vogelmeier, R. Bals

03/2004 2nd ERS Lung Science Conference, Taormina, Italien: siRNA specific for the p65 subunit of NF-kappa B modulates the inflammatory response of the airway epithelial cells. J. Platz, C. Vogelmeier, R. Bals.

05/2004 ATS 2004, 100th International Conference, Orlando, Florida. siRNA specific for the p65 subunit of NF-kappa B modulates the inflammatory response of the airway epithelial cells: J. Platz, C. Vogelmeier, R. Bals.

in press Novel Drugs for Inflammatory Lung Diseases. J. Platz, R. Bals. *Curr. Med. Chem. – Anti-Inflammatory & Anti-Allergy Agents*, 2004, 3.

Microbial DNA induces a host defense reaction of human respiratory epithelial cells. J. Platz, C. Beisswenger, A. Dalpke, A. R. Koczulla, O. Pinkenburg, C. Vogelmeier and R. Bals. *J Immunol*, 2004.

Exposure of Differentiated Airway Epithelial Cells to Volatile Smoke in vitro. C. Beisswenger, J. Platz, A. R. Koczulla, C. Seifart, C. Vogelmeier and R. Bals. *Respiration*, 2004

eingereicht Application of small interfering RNA (siRNA) for modulation of airway epithelial gene expression. J. Platz, C. Beisswenger, O. Pinkenburg, A Püchner and R. Bals. *Human Gene Therapy.*

Marburg, Juli 2004

Verzeichnis der akademischen Lehrer

Meine akademischen Lehrer waren Damen / Herren

in München:

Bals
Beck
Bracher
Derendorf
Fichtl
Habrich
Reimann
Schäffer
Steglich
Thoma
Vollmar
Wagner
Wanner
Zenk

in Marburg:

Bals
Czubayko
Gemsa
Gudermann
Heeg
Müller
Vogelmeier

Danksagung

Herrn Privatdozenten Dr. Dr. R. Bals möchte ich für die Bereitstellung des Themas, die sehr gute, fortwährende Betreuung und Unterstützung meiner Arbeit und die Förderung meiner wissenschaftlichen Laufbahn danken.
Bei Herrn Prof. Dr. Vogelmeier möchte ich mich für die vorübergehende Übernahme der Doktorvaterschaft bedanken.
Mein ganz besonderer Dank gilt meiner Familie für die immerwährende Unterstützung in privater und finanzieller Hinsicht und das in mich gesetzte Vertrauen.
Herrn Dr. A. Rembert Koczulla möchte ich für die entgegengebrachte Freundschaft danken, welche die Lebensqualität Marburgs für mich erheblich erhöht hat.
Frau Beate Kleb danke ich herzlich für die Hilfe in jeglichen Labor- und Lebensfragen.
Auch meinen Kollegen, die mich durch diese zweieinhalb Jahre des Labordaseins begleitet haben und mir immer hilfsbereit beiseite standen, möchte ich danken.

EHRENWÖRTLICHE ERKÄRUNG

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die dem Fachbereich Medizin Marburg zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel „Modifikation der Genexpression respiratorischen Epithels mittels Oligonukleotiden zur Entwicklung innovativer Behandlungsstrategien von entzündlichen Erkrankungen der Atemwege“ im Klinikum der Philipps-Universität, Innere Medizin, Schwerpunkt Pneumologie unter Leitung von Herrn PD Dr. Dr. Bals mit Unterstützung durch die unten genannten Personen ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe. Ich habe bisher an keinem in- und ausländischen Medizinischen Fachbereich ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht noch die vorliegende oder eine andere Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Teile der vorliegenden Arbeit werden im *Journal of Immunology* veröffentlicht bzw. sind für eine Publikation in *Human Gene Therapy* eingereicht. Ein weiterer Teil ist bereits in *Respiration* veröffentlicht.

Eine Unterstützung der Arbeit fand durch folgende Personen statt:

PD Dr. Dr. Robert Bals:	Bereitstellung des Themas und fortwährende Betreuung
Christoph Beisswenger:	Etablierung der quantitativen PCR, Entwicklung des Modells für die Zigarettenrauchexposition
Dr. Alexander Dalpke:	Unterstützung bei der FACS-Analyse
Thomas Damm:	technische Unterstützung
Dr. A. Rembert Koczulla:	Etablierung der quantitativen PCR
Dr. Olaf Pinkenburg:	Etablierung der quantitativen PCR
Annette Püchner:	technische Unterstützung

Marburg, Juli 2004