

MYH9与树突状细胞中TRIF-GEFH1-RhoB 信号途径的相关性研究

唐 蓓* 李 影

(重庆师范大学生命科学院, 重庆 401331)

摘要 为探讨RhoB(ras homolog family member B)靶蛋白MYH9(nonmuscle myosin heavy chain IIa)与TRIF-GEFH1-RhoB信号途径的关系, 通过实时定量PCR技术、siRNA干扰技术、激光共聚焦显微镜、流式细胞术以及基因敲除小鼠等, 分析了MYH9与TRIF(TIR domain-containing adapter inducing IFN β)途径、GEFH1(guanine nucleotide-exchange factors H1)以及MHCII(major histocompatibility complex II)的关系。结果显示, 在LPS(lipopolysaccharide)刺激后, MYH9的mRNA表达在野生型小鼠的树突状细胞(dendritic cells, DCs)中增加, 在TRIF基因敲除小鼠的DCs中则未被上调。在野生型小鼠中MYH9的mRNA上调可被GEFH1的siRNA明显抑制($P<0.01$)。同时, 在LPS刺激后, MYH9与MHCII在细胞内共定位。MYH9的siRNA还抑制了DCs中LPS介导的MHCII在细胞表面的表达($P<0.05$)。这些结果表明, MYH9与TRIF-GEFH1-RhoB信号途径存在相关性。

关键词 MYH9; TRIF-GEFH1-RhoB信号途径; GEFH1; MHCII

The Study on the Relationship between MYH9 and TRIF-GEFH1-RhoB Signaling Pathway in Dendritic Cells

Tang Bei*, Li Ying

(College of Life Sciences, Chongqing Normal University, Chongqing 401331, China)

Abstract In order to explore the relationship between the ras homolog family member B (RhoB) targeting protein nonmuscle myosin heavy chain IIa (MYH9) and TRIF-GEFH1-RhoB signal pathway, the relationship between MYH9 and TIR domain-containing adapter inducing IFN β (TRIF) pathway, guanine nucleotide-exchange factors H1 (GEFH1) and major histocompatibility complex II (MHCII) were investigated through Real-time quantitative PCR technique and siRNA interference technique, laser scanning confocal microscopy, flow cytometry and gene knockout mice. The results showed that lipopolysaccharide (LPS) induced the up-regulation of MYH9 mRNA level in DCs from wild-type (WT) mice but not in DCs from TRIF knockout, and siRNA of GEFH1 significantly suppressed the LPS-mediated up-regulation of MYH9 mRNA level ($P<0.01$). After LPS stimulation, MYH9 colocalized with MHCII in DCs. In addition, RNAi of MYH9 inhibited the LPS-mediated surface expression of MHCII in DCs ($P<0.05$). These results indicated that there was a correlation between MYH9 and TRIF-GEFH1-RhoB signaling pathway.

Keywords MYH9; TRIF-GEFH1-RhoB pathway; GEFH1; MHCII

收稿日期: 2016-11-04 接受日期: 2017-01-10

重庆市自然科学基金(批准号: cstc2014jcyjA10020)资助的课题

*通讯作者。Tel: 023-65910315, E-mail: xiaobt26@126.com

Received: November 4, 2016 Accepted: January 10, 2017

This work was supported by Natural Science Foundation Project of CQ CSTC (Grant No.cstc2014jcyjA10020)

Corresponding author. Tel: +86-23-65910315, E-mail: xiaobt26@126.com

网络出版时间: 2017-02-23 19:43:59

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20170223.1943.016.html>

MYH9(nonmuscle myosin heavy chain IIa)是编码220 kDa的非肌性肌球蛋白重链IIa的基因,其编码产物既是构成细胞骨架、肌球蛋白和质膜等的成分,也是一种马达分子,在细胞运动、细胞黏附、骨架重组、肌动蛋白介导的移动以及蛋白转运中发挥着重要作用^[1-3]。该基因若发生突变,可引起称为MYH9综合征的遗传性疾病^[4-5]。

树突状细胞(dendritic cells, DCs)是重要的抗原提呈细胞^[6-7],对适应性免疫应答的启动至关重要,其抗原提呈机制也向来是研究的热点。DCs在LPS(lipopolysaccharide)刺激后,TLR4(Toll-like receptor 4)途径被活化,在其下游,至少有两条信号途径被激活,一条依赖于TRIF(TIR domain-containing adapter inducing IFN β),另一条依赖于MyD88(myeloid differentiation primary response gene 88)^[8-9]。已有研究表明,TRIF-GEFH1(guanine nucleotide-exchange factors H1)-RhoB(ras homolog family member B)信号途径与抗原提呈的关键分子MHCII(major histocompatibility complex II)在细胞表面的表达有关^[10]。其中,RhoB(ras homolog gene family member B)是小G蛋白,主要参与调节细胞内的囊泡转运^[11-12];鸟苷酸交换因子H1(guanine nucleotide-exchange factors H1, GEFH1)可促进RhoB的活化^[13],该分子还与细胞附着、迁移及囊泡转运等有关^[14-15]。在以往的研究中,我们鉴定了一个RhoB的靶蛋白——MYH9,MYH9可与RhoB的活性形式结合,并与RhoB在细胞内共定位,提示其可能作为RhoB下游的一种马达分子,驱动由RhoB介导的囊泡转运^[16]。由于MYH9上游的RhoB与GEFH1均与TRIF途径及抗原提呈有关,那MYH9是否也与TRIF-GEFH1-RhoB信号途径及抗原提呈有关呢?

本文研究了MYH9与TRIF-GEFH1-RhoB信号途径的关系,发现MYH9与该途径存在相关性,并且初步结果表明,MYH9可能与MHCII分子在细胞表面的表达有关。此外还发现,MYH9基因的表达与TRIF-IFN β 途径无关。

1 材料与方法

1.1 材料

TRIF基因敲除小鼠(C57BL/6TRIFKO)、IFN α/β 受体基因敲除小鼠(C57BL/6IFN α/β KO)和C57BL/6小鼠来自大阪大学免疫发生学研究室。GM-CSF购自Immunogenex公司;RPMI-1640培养基、FCS购自

Gibco公司;Mouse Dendritic Cell Enrichment Set试剂盒、BD cytofix/cytopermTM plus kit均购自BD公司;M-MLV反转录试剂盒购自Sigma公司;QiAquick Gel Extraction试剂盒、RNeasy mini总RNA抽提试剂盒购自Qiagen公司;GenePORTER转染试剂购自Genlantis公司;鼠抗PE-I-A^b、鼠抗FITC-I-A^b、鼠抗APC-CD11c抗体购自eBioscience公司;兔抗鼠MYH9多克隆抗体购自BAB公司;混合荧光染料SYBR Green PCR Master Mix、荧光定量PCR仪Gene Amp 5700 sequence Detection System购自Applied Biosystems公司。激光共聚焦显微镜为Carl Zeiss公司的LSM 5 pascal software release 3.2。

1.2 分离和培养小鼠骨髓来源DCs

TRIF基因敲除小鼠、IFN α/β 受体基因敲除小鼠和C57BL/6小鼠骨髓来源DCs(bone marrow cells, BMDCs)的分离和培养参考文献[17],具体过程为:用RPMI-1640培养液冲洗后肢股骨、胫骨和肱骨的骨髓腔制备骨髓悬液,在红细胞裂解液去除红细胞后,加入含有GM-CSF(1 000 U/mL)的RPMI-1640全培养液,以 2×10^6 /mL的细胞密度按10 mL/皿分装于100 mm培养皿中,在5% CO₂、37 °C条件下培养。每2 d换一次液并补充等剂量的GM-CSF,在培养的第6 d,未熟DCs的纯度可达80%以上。这时加入终浓度为100 ng/mL的LPS分别处理0 h和12 h^[10],收集细胞,并用Mouse Dendritic Cell Enrichment Set试剂盒纯化后备用。

1.3 RNA提取及cDNA的制备

细胞的总RNA通过抽提试剂盒提取,并采用M-MLV反转录试剂盒制备cDNA,以上操作均按试剂盒说明进行,合成的cDNA在测定浓度后于-20 °C保存备用。

1.4 siRNA干扰实验

小鼠MYH9基因和GEFH1基因的siRNA由日本的Sigma-Aldrich公司合成。经筛选后有效应的MYH9的siRNA序列为:正义链5'-TGG GAA GAA GGT GAA GGT GA-3',反义链5'-ATA AGG GTT GAT GAC CAC ACA GA-3'。GEFH1的序列为:正义链5'-GAU UUA CAA CCG AAU GGA UCC-3',反义链5'-AUC CAU UCG GUU GUA AAU CUC-3'。以效应siRNA的随机序列作为实验的对照siRNA。siRNA转染的具体步骤为:将4 μ L siRNA和5 μ L Geneporter分别用无血清培养基RPMI-1640调体积至500 μ L,然后将两者混合,室温静置30 min后添加到已原代培养4 d的DCs中,转

染3~5 h, 更换新鲜培养液并继续培养24 h, 然后进行LPS刺激和未刺激处理, 收集细胞进行下一步检测。

1.5 荧光定量PCR用引物的设计

参考GenBank中小鼠 *MYH9*、*GEFH1* 基因和内参 *HPRT* (Hypoxanthine-phosphoribosyl-transferase gene) 的核苷酸序列, 分别设计特异性引物。*MYH9* 的引物为: 上游5'-TGG GAA GAA GGT GAA GGT GA-3', 下游5'-ATA AGG GTT GAT GAC CAC ACA GA-3'。*GEFH1* 的引物为: 上游5'-GCA AGG AGC AGG CAA CCA A-3', 下游5'-TGT AGG ACA AAT GAG GGC TTC C-3'。*HPRT* 引物为: 上游5'-GAT TAG CGA TGA TGA ACC AGG-3', 下游5'-CCCT CCC ATC TCC TTC ATG ACA-3'。

1.6 实时荧光定量PCR检测

利用上述引物进行普通PCR, 模板为总RNA反转录合成的cDNA, 产物经琼脂糖凝胶电泳进行鉴定。纯化回收的DNA片段在测定浓度后, 进行10倍梯度稀释以制作标准曲线。定量PCR如下: 上下游引物各10 pmol, 模板1 μ L, SYBR Green PCR Master Mix 10 μ L, 用无RNase水补足至20 μ L体积。反应条件为: 95 $^{\circ}$ C预变性10 min; 95 $^{\circ}$ C 15 s, 60 $^{\circ}$ C 1 min, 进行45个循环。循环结束后, 利用GeneAmp 5700 SDS荧光定量分析软件自动绘制熔解曲线、扩增曲线和标准曲线。设不含反应模板的阴性对照, 每个样本重复3次, 结果以均值表示。并以目的基因与内对照的相对比值来表示目的基因的相对含量, 实验重复3次。

1.7 流式细胞术检测

用MYH9的siRNA转染BMDC, 以LPS刺激12 h, 收集细胞用APC-CD11c和PE-I-A^b抗体进行标记, 通过流式细胞术(flow cytometry)检测DCs的MHCII表达。实验重复3次并对数据进行统计学处理。

1.8 激光共聚焦显微镜

用LPS刺激已培养6 d的BMDC, 12 h后收集细胞, 并用4%多聚甲醛在室温下固定20 min。然后用1 $\times$ perm/wash缓冲液于室温下作用20 min。PBS清洗后, 一抗用1:250兔抗鼠MYH9多克隆抗体、1:25鼠抗FITC-MHCII, 室温下孵育1 h。二抗用Alexa Fluor-594标记的羊抗兔IgG和Alexa Fluor-488标记的羊抗鼠IgG, 室温下孵育30 min。再用Fluorescent mounting封片并于共聚焦显微镜63 $\times$ /1.4油浸物镜下观察和摄取图像。用波长594 nm的激发光观察Alexa Fluor标记的红色荧光, 488 nm的激发光观察

FITC标记的绿色荧光。

1.9 统计学分析

采用SPSS 15.0统计软件进行数据处理, 数据用 $\bar{x}\pm s$ 表示并进行t检验, 以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 LPS可引起野生型与TRIFKO小鼠DCs差异表达MYH9

分离培养的BMDC, 经检测纯度达到了80%以上(图1A)。为了探讨MYH9是否与TLR4-TRIF途径有关, 我们通过实时定量PCR分别检测了野生型和TRIFKO小鼠DCs中MYH9的mRNA水平。结果如图1B, 以LPS未刺激时MYH9的mRNA相对含量为100进行标准化处理, 在野生型小鼠的DCs中, LPS刺激后, MYH9的mRNA水平增加, 差异有统计学意义, 而在TRIFKO小鼠的DCs中, MYH9的mRNA水平在LPS刺激后未被上调, 即其上调被显著抑制($P<0.01$)。

2.2 GEFH1 siRNA抑制MYH9 mRNA表达

由于GEFH1是RhoB的上游分子, 与RhoB的活化有关, 那GEFH1是否对RhoB的靶蛋白MYH9也有影响呢? 用GEFH1的siRNA转染DCs, 以对照siRNA为对照组(control), 通过实时定量PCR检测了MYH9的mRNA水平。以LPS未刺激时MYH9的mRNA相对水平为100进行标准化处理, 结果显示, 在LPS刺激后, 在对照DCs中MYH9 mRNA水平明显增加, 但在转染GEFH1 siRNA的DCs中其水平上调被显著抑制(图2)($P<0.01$)。

2.3 MYH9与MHCII在DCs中共定位

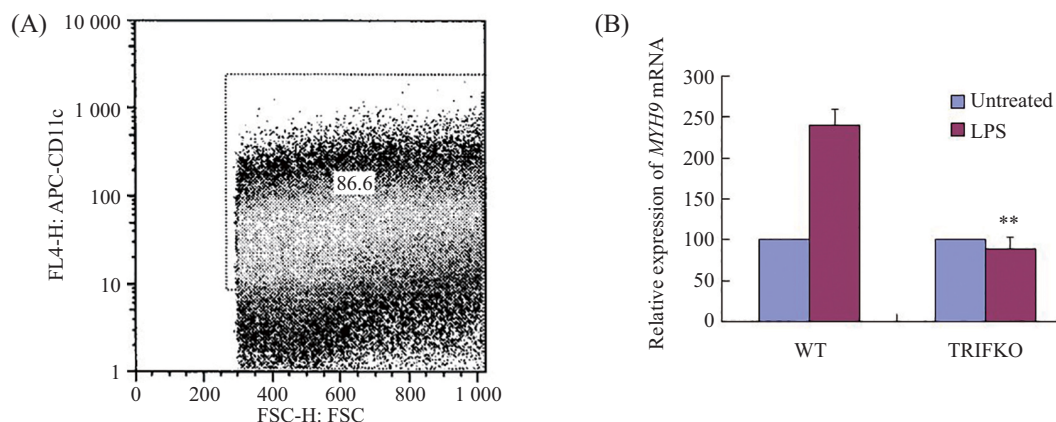
由于LPS-TRIF途径活化后, 使DCs高表达MHCII分子, 那MYH9与MHCII是否有关呢? 我们检测了两者在细胞内的定位, 激光共聚焦显微镜的结果见图3。从两者的融合图像可见, 在LPS刺激后, MYH9与MHCII在细胞内的分布有明显重合, 图中箭头表示MYH9与MHCII共定位。

2.4 MYH9 siRNA抑制DCs的MHCII表达

我们进一步检测了MYH9 siRNA对MHCII表达的影响, 流式细胞术的检测结果显示, 在LPS刺激后, 与对照组比较, MYH9 siRNA能显著抑制MHCII在细胞膜表面的表达(图4)($P<0.05$)。

2.5 野生型与IFN α/β 受体基因敲除小鼠MYH9的mRNA表达

已知TRIF途径活化后, 使DCs表达与分泌了

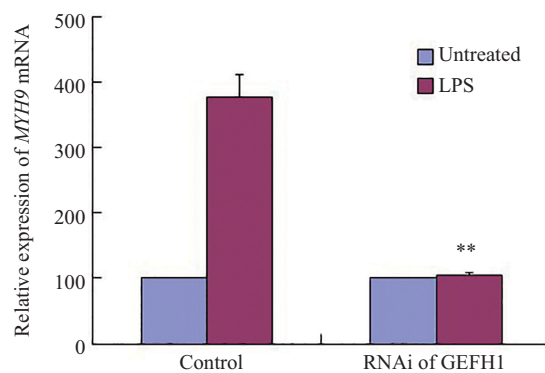


A: CD11c DCs的纯度检测; B: TRIFKO小鼠DCs中MYH9 mRNA水平; WT: 野生型小鼠的DCs; TRIFKO: *TRIF*基因敲除小鼠的DCs。** $P < 0.01$, 与WT的LPS刺激组比较。

A: analysis of the purity of the CD11c DCs; B: mRNA level of *MYH9* in DCs from *TRIF* knock-out mice; WT: DCs from wild-type mice; TRIFKO: DCs from *TRIF* knock-out mice. ** $P < 0.01$ compared with wild type after LPS treatment group.

图1 TRIFKO小鼠DCs中MYH9 mRNA的水平

Fig.1 mRNA level of *MYH9* in DCs from *TRIF* knock-out mice

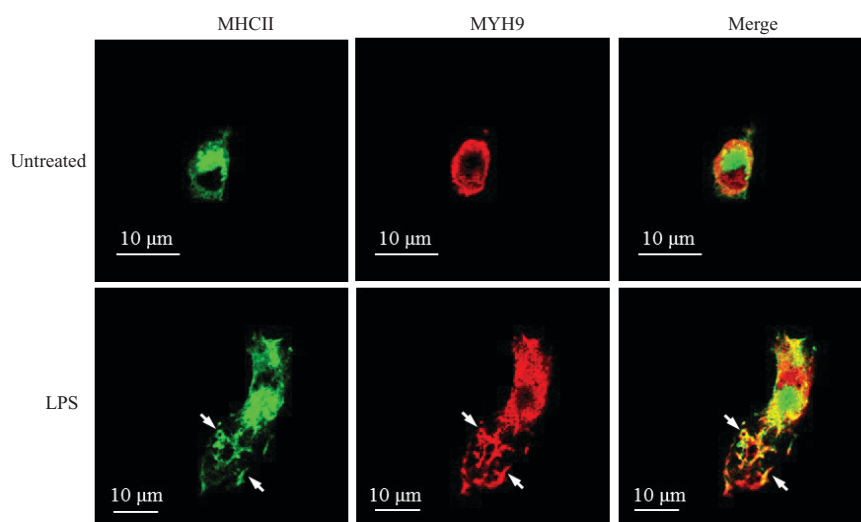


** $P < 0.01$, 与对照的LPS刺激组比较。

** $P < 0.01$ compared with control after LPS treatment group.

图2 GEFH1 siRNA对MYH9 mRNA水平的影响

Fig.2 Effects of GEFH1 siRNA on *MYH9* mRNA level

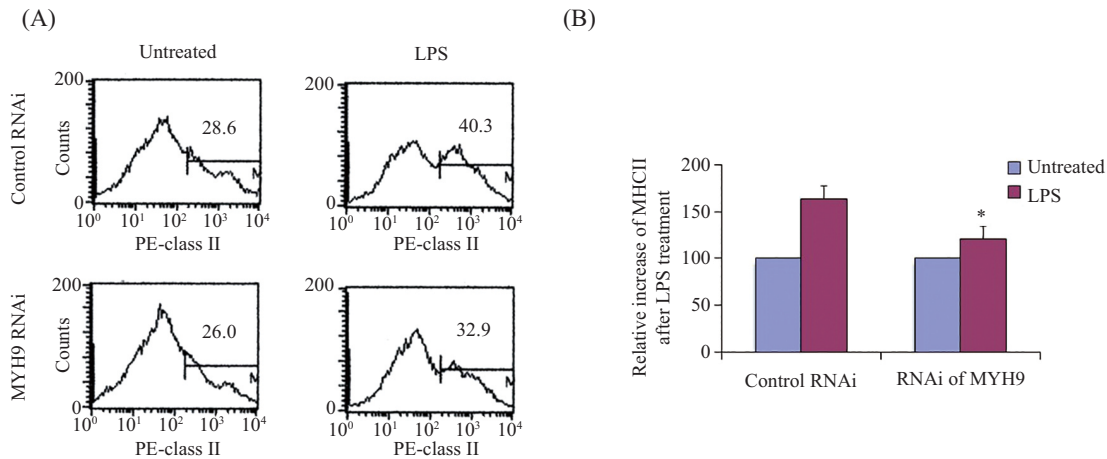


箭头表示MYH9与MHCII共定位。

Arrowheads indicate MYH9 colocalized with MHCII.

图3 MYH9与MHCII在细胞内共定位

Fig.3 MYH9 colocalized with MHCII in the cells

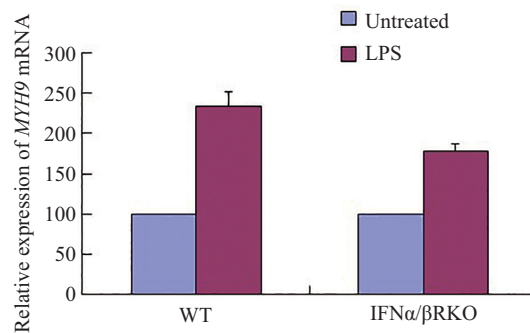


A: 流式细胞术检测MHCII表面表达; B: 检测结果的比较; * $P < 0.05$, 与对照的LPS刺激组比较。

A: surface expression of MHCII detected by flow cytometry; B: comparing with the results of analysis; * $P < 0.05$ compared with control after LPS treatment group.

图4 MYH9 siRNA对MHCII表面表达的影响

Fig.4 Impact of MYH9 siRNA on surface expression of MHCII in DCs



WT: 野生型小鼠的DCs; IFN α / β RKO: IFN α / β 受体基因敲除小鼠的DCs。 $P > 0.05$, 与WT的LPS刺激组比较。

WT: DCs from wild-type mice; IFN α / β RKO: DCs from IFN α / β receptor knock-out mice. $P > 0.05$ compared with wild type after LPS treatment group.

图5 IFN α / β RKO小鼠DCs中MYH9的mRNA水平

Fig.5 mRNA level of MYH9 in DCs from IFN α / β RKO mice

IFN β , IFN β 又作用于DCs, 使CD86等共刺激分子的表达上调。为了探讨MYH9是否也与TRIF-IFN α / β 途径有关, 我们分别检测了野生型和IFN α / β 受体基因敲除小鼠DCs中MYH9的mRNA水平。结果以LPS未刺激时MYH9的mRNA相对水平为100进行标准化处理, 研究表明, 在野生型C57BL/6小鼠的DCs中, 随LPS刺激时间的延长, MYH9的mRNA水平增加, 在IFN α / β 受体基因敲除小鼠的DCs中, 虽然降低了LPS刺激后的MYH9 mRNA水平上调, 但与野生型相比差异不显著(图5)($P > 0.05$)。

3 讨论

MYH9编码非肌性肌球蛋白重链IIA, 是一种马达分子, 由于肌球蛋白驱动由肌动蛋白介导的胞内转运, 因此MYH9与胞内蛋白转运以及细胞运动等

过程有关。由于MYH9基因突变会引起遗传学疾病, 因此对该分子的研究主要集中于MYH9综合征上。DCs作为抗原提呈细胞, 在适应性免疫应答的启动中扮演着十分重要的角色, 对其抗原提呈机制的研究有着很重要的生物学意义。已有研究表明, DCs的TRIF-GEFH1-RhoB信号途径与抗原提呈的关键分子MHCII在细胞表面的表达有关^[10]。在前期的研究中我们发现, MYH9可与RhoB的活性形式结合, 是RhoB分子的靶蛋白, 而TRIF-GEFH1-RhoB信号途径又与MHCII在DCs细胞表面的表达有关, 因此我们探讨了MYH9是否也与这一信号途径以及MHCII在细胞表面的表达有关。

如前所述, 在LPS-TLR4途径的下游, 至少有两条信号途径, 一条依赖于TRIF, 一条依赖于MyD88^[16-17]。已有研究表明, RhoB是依赖于TRIF途径的, 我们研

究了MYH9是否也与该途径有关, 结果表明, MYH9也是依赖于TRIF途径的。此外, GEFH1是RhoB上游的分子, 针对其的RNA干涉可抑制MYH9 mRNA水平, 同时RhoB也可与MYH9在细胞内共定位^[14]。这说明MYH9与TRIF-GEFH1-RhoB信号途径存在相关性。由于这一途径活化后, 上调了MHCII分子在DCs膜表面的表达, 对活化CD4⁺T细胞启动适应性免疫应答至关重要。而MHCII分子在内质网合成后, 是经囊泡从内质网转运到高尔基体, 又从高尔基体转运到细胞膜表面的。MYH9可以驱动由囊泡介导的转运, 作为RhoB的靶蛋白, MYH9可能参与了由RhoB介导的某种囊泡转运, 我们研究了MYH9是否与MHCII分子的转运过程有关。

结果显示, 在LPS刺激后MYH9可与MHCII分子共定位, 同时MYH9 siRNA也能显著抑制LPS刺激后MHCII在DCs细胞表面的表达, 这说明MYH9可能与MHCII分子的胞内转运过程有关。那MYH9是否可能是一个新的与DCs抗原提呈有关的分子? 这还需要进行CD4⁺T细胞的刺激实验加以证实, 同时在MYH9与TRIF-GEFH1-RhoB信号途径相关性的研究中我们还需要进一步进行蛋白质水平的检测。

此外, 我们知道TRIF途径活化后, 还导致了DCs表达与分泌IFN β , IFN β 又反过来作用于DCs, 使CD86等共刺激分子的表达上调^[18-19], 我们研究了TRIF途径的诱导产物IFN β 与MYH9之间的关系, 研究结果表明, MYH9基因的表达与TRIF-IFN β 途径无关。

本文首次报道了MYH9与TRIF-GEFH1-RhoB信号途径存在相关性, 并且初步结果表明, MYH9可能与MHCII分子在细胞表面的表达有关, 而MYH9基因的表达与TRIF-IFN β 途径无关。本研究结果为进一步研究MYH9在DCs中的功能奠定了基础。

致谢——

感谢日本大阪大学免疫发生学研究室的平野俊夫教授为本研究提供相应的实验条件。

参考文献 (References)

- Xu X, Jaeger ER, Wang X, Lagler-Ferrez E, Batalov S, Mathis NL, *et al.* Mst1 directs Myosin IIa partitioning of low and higher affinity integrins during T cell migration. *PLoS One* 2014; 9(8): e105561.
- Stall R, Ramos J, Kent Fulcher F, Patel YM. Regulation of myosin IIA and filamentous actin during insulin-stimulated glucose uptake in 3T3-L1 adipocytes. *Exp Cell Res* 2014; 322(1): 81-8.
- Casalou C, Seixas C, Portelinha A, Pintado P, Barros M, Ramalho JS, *et al.* Arl13b and the non-muscle myosin heavy chain IIA are required for circular dorsal ruffle formation and cell migration. *J Cell Sci* 2014; 127(Pt 12): 2709-22.
- Zhang Y, Conti MA, Malide D, Dong F, Wang A, Shmist YA, *et al.* Mouse models of MYH9-related disease: Mutations in nonmuscle myosin II-A. *Blood* 2012; 119(1): 238-50.
- Verver EJ, Topsakal V, Kunst HP, Huygen PL, Heller PG, Pujol-Moix N, *et al.* Nonmuscle myosin heavy chain IIA mutation predicts severity and progression of sensorineural hearing loss in patients with MYH9-related disease. *Ear Hear* 2016; 37(1): 112-20.
- Pearce EJ, Everts B. Dendritic cell metabolism. *Nat Rev Immunol* 2015; 15(1): 18-29.
- Liu Z, Roche PA. Macropinocytosis in phagocytes: Regulation of MHC class-II-restricted antigen presentation in dendritic cells. *Front Physiol* 2015; 6: 1-6.
- Barton GM, Kagan JC. A cell biological view of Toll-like receptor function: Regulation through compartmentalization. *Nat Rev Immunol* 2009; 9(8): 535-42.
- Takeda K, Akira S. TLR signaling pathways. *Semin Immunol* 2004; 16(1): 3-9.
- Kamon H, Kawabe T, Kitamura H, Lee J, Kamimura D, Kaisho T, *et al.* TRIF-GEFH1-RhoB pathway is involved in MHCII expression on dendritic cells that is critical for CD4 T-cell activation. *EMBO J* 2006; 25(17): 4108-19.
- Guilluy C, Garcia-Mata R, Burridge K. Rho protein crosstalk: Another social network? *Trends Cell Biol* 2011; 21(12): 718-26.
- Howe GA, Addison CL. RhoB controls endothelial cell morphogenesis in part via negative regulation of RhoA. *Vascular Cell* 2012; 4: 1-11.
- Birkenfeld J, Nalbant P, Yoon SH, Bokoch GM. Cellular functions of GEF-H1, a microtubule-regulated Rho-GEF: Is altered GEF-H1 activity a crucial determinant of disease pathogenesis? *Trends Cell Biol* 2008; 18(5): 210-19.
- Yamashita Y, Saito Y, Murata-Kamiya N, Hatakeyama M. Polarity-regulating kinase partitioning- defective 1b (PAR1b) phosphorylates guanine nucleotide exchange factor H1 (GEF-H1) to regulate RhoA-dependent actin cytoskeletal reorganization. *J Biol Chem* 2011; 286(52): 44576-84.
- Heasman SJ, Carlin LM, Cox S, Ng T, Ridley AJ. Coordinated RhoA signaling at the leading edge and uropod is required for T cell transendothelial migration. *J Cell Biol* 2010; 190(4): 553-63.
- 唐 蓓, 唐 彦. RhoB分子靶蛋白MYH9的鉴定. *中国细胞生物学学报* (Tang Bei, Tang Yan. Identification of target protein with RhoB. *Chinese Journal of Cell Biology*) 2013; 35(3): 341-5.
- Park SJ, Nakagawa T, Kitamura H, Atsumi T, Kamon H, Sawa S, *et al.* IL-6 regulates *in vivo* dendritic cell differentiation through STAT3 activation. *J Immunol* 2004; 173(6): 3844-54.
- Yamamoto M, Sato S, Hemmi H, Hoshino K, Kaisho T, Sanjo H, *et al.* Role of adaptor TRIF in the MyD88-independent toll-like receptor signaling pathway. *Science* 2003; 301(5633): 640-3.
- Hoshino K, Kaisho T, Iwabe T, Takeuchi O, Akira S. Differential involvement of IFN-beta in Toll-like receptor-stimulated dendritic cell activation. *Int Immunol* 2002; 14(10): 1224-31.