

Aus dem Universitätsklinikum Münster
Klinik und Poliklinik für Hautkrankheiten
- Direktor: Univ.- Prof. Dr. med. Dr. h.c. T. Luger -

Expression, Funktionalität und Modulation von Toll-like Rezeptoren in
Keratinocyten

INAUGURAL-DISSERTATION

zur
Erlangung des doctor medicinae dentium

der Medizinischen Fakultät der
Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

vorgelegt von

Maria Elisabeth Pohlgeers

aus Lohne

2010

Gedruckt mit freundlicher Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. Wilhelm Schmitz

1. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. M. Schiller
2. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. C. Lippold

Tag der mündlichen Prüfung: 06.10.2010

Aus dem Universitätsklinikum Münster
Klinik und Poliklinik für Hautkrankheiten
– Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Dr. h.c. T. Luger –

Referent: Priv.-Doz. Dr. M. Schiller
Coreferent: Priv.-Doz. Dr. C. Lippold

Zusammenfassung

Expression, Funktionalität und Modulation von Toll-like Rezeptoren in Keratinozyten

Maria Pohlgeers

Die Haut nimmt eine Sonderstellung in der körpereigenen Abwehr ein, weil sie als Grenzorgan zwischen dem Körper und der Außenwelt die erste Barriere gegen exogene Mikroorganismen darstellt. Toll-like Rezeptoren spielen eine wesentliche Rolle innerhalb dieser ersten Abwehrfront, da sie das angeborene Immunsystem aktivieren können. Ziel dieser Arbeit ist, die Expression und Funktionalität von TLRs auf Keratinozyten zu bestimmen und die Interaktion mit dem immunmodulierenden POMC-System der Haut zu untersuchen.

In einem ersten Schritt wurde mittels konventioneller PCR die Expression der TLRs 1, 2, 4 und 6 in der murinen Keratinozytenzelllinie PAM 212 nachgewiesen. Exemplarisch konnte anhand des TLR 4 mRNA-Spiegels in der real-time PCR gezeigt werden, dass proinflammatorische Signale, wie LPS und IL-1 α , zu einer vermehrten Expression der Rezeptoren führen. In der humanen keratinozytären Zelllinie HaCaT war zum Zeitpunkt unserer Untersuchungen bereits die Expression der TLRs 1, 2, 3, 4, 5 und 10 belegt.

Die Funktionalität der exprimierten TLRs wurde mit den rezeptorspezifischen Stimuli Pam₃Cys (TLR 1/2), Poly (I:C) (TLR 3), LPS (TLR 4) und Flagellin (TLR 5) nachgewiesen. In den HaCaT Zellen war nach ligandeninduzierter Aktivierung der TLRs 1, 2, 3, 4 und 5 eine vermehrte Expression der proinflammatorischen Zytokine IL-6 und IL-8 auf mRNA Ebene in der real-time PCR feststellbar. Außerdem konnte eine Aktivierung der MAP-Kinasen p38 und ERK 1/2 im Immunowesternblotting nach Stimulation mit Pam₃Cys, LPS und Flagellin ermittelt werden. Interessanterweise konnte eine mittels Immunfluoreszenz detektierte Nf- κ B Translokation in den Nukleus jedoch nur nach Stimulation mit dem TLR 5-spezifischen Flagellin gezeigt werden. Parallel dazu konnte in der murinen Zelllinie PAM 212 nach spezifischer Stimulation der TLRs 1/2 und 4 eine vermehrte Expression des murinen Gro- α -Analogons CXCL-2 auf mRNA Ebene nachgewiesen werden. Allerdings zeigte lediglich die Stimulation mit Pam₃Cys eine Aktivierung der MAP-Kinase ERK 1/2.

Weitere Untersuchungen deuten darauf hin, dass das immunmodulierende POMC-System über eine Erhöhung der cAMP Konzentration die TLR-vermittelte Expression von IL-8 und CXCL-2 in beiden Zelllinien beeinflusst, was auf eine verminderte Aktivität von p38 und ERK 1/2 in Gegenwart von cAMP beruhen könnte.

Die vorgestellten Ergebnisse belegen die Expression und Funktionalität des TLR Systems in Keratinozyten. Es ergeben sich darüber hinaus Hinweise, dass der Organismus vor einer überschießenden TLR-vermittelten Immunantwort durch das ebenfalls in Keratinozyten vorhandene POMC-System geschützt werden könnte.

Tag der mündlichen Prüfung: 06.10.2010

Für Oma und Opa

INHALTSVERZEICHNIS

1	Einleitung	1
1.1	Aufbau der Haut	1
1.2	Das Immunsystem – ein Überblick	2
1.2.1	Erkennung von Pathogenen	3
1.3	Toll-like Rezeptoren	4
1.3.1	Drosophila Toll	4
1.3.2	Aufbau und Lokalisation der Rezeptoren	4
1.3.3	Aktivierung von TLRs durch Liganden	5
1.3.3.1	TLR 4	5
1.3.3.2	TLR 1, 2 und 6	6
1.3.3.3	TLR 3	7
1.3.3.4	TLR 5	7
1.3.3.5	TLR 9	7
1.3.3.6	TLR 7, 8 und 10	7
1.4	Signalkaskade	8
1.4.1	Der Transkriptionsfaktor Nf- κ B	10
1.4.2	MAP-Kinasen	12
1.5	Proopiomelanokortin-System	13
1.5.1	Biosynthese	13
1.5.2	Rezeptoren	14
1.5.3	Immunmodulierende Wirkung	14
2	Fragestellung	16
3	Material und Methode	17
3.1	Zellkultur	17
3.1.1	Zellkultivierung	17

3.1.2	Zellzahl- und Vitalitätsbestimmung	18
3.1.3	Toxikologische Untersuchung: MTT Proliferationsassay	18
3.1.4	Stimulation der Zellen	19
3.2	Immunologische Methoden	20
3.2.1	Immunfluoreszenz	20
3.3	Molekularbiologische Methoden	22
3.3.1	RNA Präparation	22
3.3.2	Konzentrations- und Reinheitsbestimmung von RNA	23
3.3.3	Reverse Transkription	23
3.3.4	Polymerase-Kettenreaktion	24
3.3.4.1	Prinzip der PCR	24
3.3.4.2	Oligonukleotid-Primer	24
3.3.4.3	PCR-Amplifikation	25
3.3.4.4	Elektrophorese	26
3.3.4.4.1	Agarosegelelektrophorese	27
3.3.4.5	Quantitative real-time PCR	28
3.4	Proteinchemische Methoden	30
3.4.1	Präparation von Proteinen mit der Hot Lysis Methode	30
3.4.2	Nachweis von Proteinen mit Hilfe des Western Blots	30
3.4.2.1	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese nach Laemmli	31
3.4.2.2	Blotting	32
3.4.2.3	Blocking	33
4	Ergebnisse	34
4.1	TLR-Genexpression auf Keratinozyten	34
4.1.1	Untersuchungen an unstimulierten Zellen	34
4.1.2	Der Einfluss von Entzündungsstimuli auf die TLR 4 Expression	37

4.2	Funktionelle Wirkung von TLRs	38
4.2.1	TLR-Liganden modulieren die Expression inflammatorischer Zytokine	38
4.2.1.1	Expression von Zytokinen in humanen HaCaT Zellen	38
4.2.1.2	Expression von Zytokinen in PAM 212 Zellen	40
4.2.2	TLR-induzierte Aktivierung des Transkriptionsfaktors Nf- κ B	41
4.2.3	TLR-Liganden aktivieren die MAP-Kinasen p38 und ERK 1/2	43
4.2.4	Modulation der Liganden-induzierten Expression von IL-8 mRNA nach Inhibition von ERK 1/2 und p38 in den HaCaT Zellen	47
4.3	Modulation der TLR-spezifischen Entzündungsreaktion durch die cAMP-Signalkaskade	49
4.3.1	db-cAMP und Forskolin beeinflussen die TLR- induzierte Zytokinexpression	49
4.3.2	db-cAMP und Forskolin üben keine Wirkung auf die TLR-induzierte Nf- κ B Translokation aus	51
4.3.3	db-cAMP und Forskolin modulieren die TLR-induzierte Phosphorylierung von p38 und ERK 1/2	52
5	Diskussion	54
5.1	Keratinocyten als geeignetes Zellkulturmodell	54
5.2	TLR-Expression auf Keratinocyten	55
5.3	Funktionelle Wirkung von TLRs	56
5.3.1	Phosphorylierung von MAP-Kinasen	56
5.3.2	Aktivierung von Nf- κ B	59
5.3.3	Expression von Zytokinen	61

5.4	Modulation der TLR-vermittelten Entzündungsreaktion	66
5.5	Abschluss und Ausblick	70
6	Literaturverzeichnis	73
7	Abkürzungsverzeichnis	115
8	Danksagung	120
9	Lebenslauf	121

1 Einleitung

1.1 Aufbau der Haut

Die Haut stellt das größte zusammenhängende Organ des Menschen dar und erfüllt als Grenzorgan zur Umwelt Sinnes-, Kontakt- und Schutzfunktionen.

Wesentliche Bestandteile bilden die Epidermis (Oberhaut), die bindegewebige Dermis (Korium, Lederhaut) und die Subkutis. Die Epidermis sitzt einer Basallamina auf und besteht aus einem mehrschichtigen, verhornenden Plattenepithel, das sich zu 90% aus Keratinozyten und zu 10% aus Melanozyten, Merkel-Zellen und Langerhans-Zellen zusammensetzt. Sie gliedert sich histologisch in Stratum basale, Stratum spinosum, Stratum granulosum und Stratum corneum. Diese histologische Gliederung spiegelt die unterschiedlichen Differenzierungsstadien der Keratinozyten wider, welche die Epidermis durchwandern.

Der aus dem Ektoderm stammenden Epidermis schließt sich die aus dem Mesoderm stammende Dermis an. Sie besteht aus fibroelastischem Gewebe und enthält die nutritiven Nerven und Gefäße. Der Faserapparat setzt sich aus Kollagenfaserbündeln und elastischen Fasern zusammen, zwischen denen Fibroblasten, Mastzellen und weitere Gewebszellen liegen.

Die im Wesentlichen aus Fettgewebe bestehende Subkutis, dient der Wärmeisolierung und als Energiereservoir und bildet ein mechanisches Schutzpolster.

Zellbiologische und mikrobiologische Forschungsergebnisse der letzten beiden Jahrzehnte haben ergeben, dass Keratinozyten nicht nur als passive Barriere zur Umwelt den Organismus schützen, sondern auch in der Lage sind, diverse Mediatoren wie Zytokine und deren Rezeptoren, Wachstumsfaktoren, Oberflächenmoleküle (Adhäsionsmoleküle, MHC-Antigene), Hormone, Neuropeptide, Arachidonsäurederivate und Enzyme (Kollagenasen, Proteasen, Plasminogenaktivatoren) zu bilden, wodurch sie sowohl untereinander als auch mit dem Gefäß- und Immunsystem kommunizieren können. Dadurch wird eine initiale unspezifische Abwehr möglich, der bei Bedarf eine antigenspezifische Immunreaktion folgt.

1.2 Das Immunsystem - ein kurzer Überblick

Das Immunsystem schützt den Organismus vor Infektionen und Neoplasien mit Hilfe eines umfangreichen Erkennungs- und Eliminationssystems. Bei höheren Vertebraten unterscheidet man die phylogenetisch ältere angeborene Immunität von der erworbenen adaptiven Immunität [221].

Das angeborene Immunsystem ist, wenn auch nur mit geringer Spezifität, in der Lage, innerhalb der ersten Stunden bis Tage auf eindringende Mikroorganismen zu reagieren, wohingegen die adaptive Immunität erst nach 7-10 Tagen eine zelluläre oder humorale Abwehrreaktion einleiten kann [244]. Die angeborene Immunität wird im Wesentlichen durch neutrophile Granulozyten, Makrophagen und dendritische Zellen vermittelt. Charakteristisch sind schnelle Effektor-Mechanismen wie Phagozytose, Aktivierung proteolytischer Kaskaden und Synthese potenter antimikrobieller Peptide. Diese Mechanismen können in der Regel die Entstehung eines Infektionsherdes verhindern. Durchbricht aber ein pathogener Mikroorganismus diese erste Abwehrfront, löst er eine adaptive Immunantwort aus [220].

Das adaptive Immunsystem wird im Gegensatz zur angeborenen Immunität durch Lymphozyten vermittelt, die nach dem Ort ihrer Reifung in B- (Reifung im Knochenmark = bone marrow) bzw. T- Lymphozyten (Reifung im Thymus) unterteilt werden. Lymphozyten exprimieren auf ihrer Zelloberfläche einen individuellen Antigenrezeptor, der durch unterschiedlichste Rekombinationen von Genen entsteht. Daraus resultiert eine fast unlimitierte Anzahl antigenspezifischer Lymphozyten. Ausgehend von ihrem Reifungsort rezirkulieren die Lymphozyten kontinuierlich mit dem Blutstrom durch die peripheren lymphatischen Organe. Hier erfolgt die Aktivierung der T-Lymphozyten durch antigenpräsentierende Zellen (vor allem dendritische Zellen, bereits aktivierte T-Zellen und Makrophagen), die als Bindeglied zwischen angeborener und erworbener Immunität aufgenommene und prozessierte Antigene über MHC II Moleküle präsentieren. Die aktivierten Zellen expandieren klonal und gewinnen die Fähigkeit, Immuneffektorfunktionen auszuüben. Sie sind unter anderem befähigt, B-Zellen zu aktivieren und so die Produktion antigenspezifischer Antikörper einzuleiten. Darüber hinaus bilden

sich im Rahmen einer adaptiven Immunantwort Gedächtniszellen aus, die eine erneute Infektion mit dem gleichen Erreger verhindern können [142].

Die folgende Arbeit befasst sich primär mit der angeborenen Immunität, so dass im Weiteren nicht näher auf das adaptive Immunsystem eingegangen wird.

1.2.1 Erkennung von Pathogenen

Die zentrale Aufgabe des Immunsystems ist die Unterscheidung zwischen Fremd und Eigen. Diese Differenzierung ist wesentlich für die Erkennung und Bekämpfung von Krankheitserregern oder entarteten Zellen. Das angeborene Immunsystem besitzt im Gegensatz zum erworbenen Immunsystem nur eine limitierte Zahl von Rezeptoren, die konservierte, konstitutiv exprimierte Strukturen von Pathogenen -so genannte „pathogen associated molecular pattern“ (PAMP)- erkennen [221]. Alle PAMPs besitzen drei Merkmale, welche eine fundamentale Rolle bei der Erkennung spielen. Zum Einen werden PAMPs nur von Mikroben und nicht vom Wirt synthetisiert, wodurch die Erkennung zwischen Eigen und nicht Eigen ermöglicht wird. Des Weiteren variieren PAMPs einer bestimmten Klasse nicht unter den Mikroorganismen derselben, was eine Reduktion der Rezeptoren möglich macht. Drittens sind PAMPs für die Pathogenität und das Überleben von Mikroorganismen essentiell [220].

Innerhalb der angeborenen Immunität lassen sich funktionell drei Gruppen mustererkennender Rezeptoren unterscheiden: sezernierte, endozytierende und signaltransferierende [220]. Im Folgenden soll nur auf die dritte Gruppe näher eingegangen werden.

Die signaltransferierenden Rezeptoren sind durch die Fähigkeit gekennzeichnet, Informationen der Pathogenerkennung mit Hilfe von Signaltransduktionskaskaden in die Zelle weiterzuleiten und daraufhin die Expression verschiedener Gene der Immunantwort zu induzieren. Zu dieser Gruppe gehören die Toll-like Rezeptoren [160].

1.3 Toll-like Rezeptoren

1.3.1 Drosophila Toll

Das Toll-Protein wurde erstmalig 1984 von der Biochemikerin Christiane Nüsslein-Volhard in der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* identifiziert [13;106]. Primär wurde dem Protein eine tragende Rolle in der dorsoventralen Ausrichtung des Embryos eingeräumt. Erst wesentlich später konnte auch eine Beteiligung an der Auslösung einer Immunantwort auf grampositive Bakterien und Pilze nachgewiesen werden [13;106;187].

Aktiviert wird *Drosophila Toll* durch den endogenen Liganden Spätzle. Nachfolgend werden intrazelluläre Signalproteine wie der Adapter Tube und die Kinasen Pelle, Cactus und Dorsal aktiviert, die wiederum Transkriptionsfaktoren der Rel-Familie (Dif und Relish) phosphorylieren [106;224;284]. Dadurch wird schließlich die Produktion antimikrobieller Proteine wie Drosomycin, Diptericin und Defensin eingeleitet.

Kurz nach der Entdeckung des Toll-Proteins in der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* fand man in Säugetieren 13 Homologe von Toll, wobei im humanen System nur die TLRs 1-10 nachgewiesen werden konnten [59;60;74;221;279;328].

1.3.2 Aufbau und Lokalisation der Rezeptoren

Toll-like Rezeptoren sind transmembranöse Rezeptoren, die aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit zum IL-1 Rezeptor der Toll/IL-1 Rezeptor (TIR) Familie zugeordnet werden. Alle Mitglieder dieser Familie weisen intrazellulär einen homologen Aufbau auf, während sich extrazellulär jedoch eine gewisse Diversität zeigt [9;31;294]. Der zytoplasmatische Bereich -TIR Domäne genannt- setzt sich aus ca. 200 Aminosäuren zusammen und enthält drei konservierte Regionen, worüber Interaktionen mit Adapter-Proteinen erfolgen können [8;222;294]. Der extrazelluläre Bereich beinhaltet 19-25 hintereinandergeschaltete Leucin-reiche „repeats“ (LRRs), die sich vom IL-1 Rezeptor, welcher Immunglobulin-ähnliche Domänen enthält, unterscheidet

[175;294]. Die LRR-Domäne ist an der Ligandenerkennung beteiligt und wahrscheinlich für die Dimerisierung von TLRs notwendig [15].

Toll-like Rezeptoren, die an der Erkennung bakterieller Produkte beteiligt sind (TLR 1, 2, 4, 5 und 6), sind auf der Zelloberfläche lokalisiert. Die TLRs 3, 7, 8 und 9 erkennen Nukleinsäuren, liegen intrazellulär und dienen der Abwehr viraler Infektionen [114;231;294].

1.3.3 Aktivierung von TLRs durch Liganden

1.3.3.1 TLR 4

Medzhitov et al. entdeckten 1997 den ersten humanen Toll-like Rezeptor, der später als TLR 4 identifiziert wurde. Dieser Rezeptor erkennt LPS, ein Bestandteil der Zellwand Gram-negativer Bakterien [132;221;268;294], dessen aktivierende Komponente Lipid A darstellt [150]. Die Erkennung von LPS erfolgt nicht allein durch den Rezeptor, sondern durch einen Molekülkomplex aus TLR 4, MD-2, CD14 [302;308;340] und RP105 [232;324]. Ist freies LPS im Serum vorhanden, wird es von einem Lipopolysaccharid bindenden Protein (LBP) gebunden und so durch CD14 erkannt. Da CD14 keine intrazytoplasmatische Domäne besitzt, wird erst durch die Interaktion mit TLR 4 die Aktivierung des Signalweges ermöglicht [112;144;236]. Ein weiterer Bestandteil des Molekülkomplexes ist das Glykoprotein MD-2, welches an die extrazelluläre Domäne von TLR 4 bindet [6;308]. Untersuchungen an Zelllinien chinesischer Hamsterovarien, die Mutationen im MD-2 Gen aufwiesen, haben ergeben, dass MD-2 für eine adäquate Interaktion von LPS mit TLR 4 essentiell ist [302]. MD-2 wandert zunächst mit TLR 4 über das endoplasmatische Reticulum in den Golgi-Apparat und anschließend an die Zelloberfläche, wo überschüssiges MD-2 abgegeben wird [346]. RP105, ein Protein das vorzugsweise auf der Zelloberfläche von B-Lymphozyten exprimiert wird, enthält eine LRR-Domäne, die der Leucin-reichen Domäne der TLRs ähnelt. B-Zellen RP105-defizienter Mäuse zeigten eine reduzierte Ansprechbarkeit auf LPS [232;252].

Weitere bislang bekannte Liganden für TLR 4 sind Lipoteichonsäure [325], Lipoarabinomannan, ein Glykolipid und Virulenzfaktor des Mykobacterium

tuberkulosis [218], das Fusionsprotein des respiratorischen Dyncytical Virus (RSV) [111], Hüllproteine von Retroviren [271], Taxol, ein Produkt der pazifischen Eibe [47;164] sowie Mannan von *Saccharomyces cerevisiae* und *Candida albicans* [317]. Zudem erkennt TLR 4 endogene Substanzen wie die Hitzeschockproteine Hsp60 und 70 [17;100;253;344], Hyaluronsäure, Heparansulfat, β -Defensin, Fibronectin und Fibrinogen [145;255;311;332;334].

1.3.3.2 TLR 1, 2 und 6

Der Toll-like Rezeptor 2 ist in der Lage, eine große Vielfalt an Mikroorganismen zu erkennen. Zu den TLR 2 Liganden gehören Lipoproteine von Mykobakterien, Spirochäten und Gram- negativen Bakterien [12;38;124;193], Peptidoglykane und Lipoteichonsäuren Gram- positiver Bakterien [186;294;303;342;372], Lipoarabinomannan von Mykobakterien [186;218;342], Glykoinositolphospholipide von *Trypanosoma Cruzi* [48], Glykolipide von *Treponema maltophilum* [257], Oberflächenproteine von *Neisseria* sowie Zymosan von Pilzen [212;325;326;341].

Außerdem erkennt TLR 2 atypische Formen von LPS, die vornehmlich von *Leptospira interrogans* und *Porphyromonas gingivales* gebildet werden. Diese unterscheiden sich durch die Lipid A Komponente von dem LPS, das von TLR 4 erkannt wird [125;356].

Die meisten PAMPs werden in Form von TLR-Homodimeren erkannt. TLR 2 nimmt eine Sonderstellung ein, da er darüber hinaus in der Lage ist, Heterodimere mit den Rezeptoren 1 und 6 zu bilden, wodurch eine Abgrenzung zwischen den unterschiedlichen mikrobiellen Komponenten möglich wird. Untersuchungen ergaben, dass TLR 6 sowohl für eine hinreichende Immunantwort nach Stimulation mit Peptidoglykan und löslichem Modulin als auch für die Erkennung diacetylierter Lipopeptide notwendig ist [260;327]. Demgegenüber bindet das Heterodimer aus TLR 2 und TLR 1 triacetylierte Lipopeptide [329]. Außerdem erkennt das Heterodimer aus TLR 1 und 2 lösliche Faktoren, die von *Neisseria meningitidis* freigesetzt werden [363] und spielt eine wesentliche Rolle in der Erkennung von Lipoproteinen, die auf der Zelloberfläche von *B. burgdorferi* lokalisiert sind [11].

1.3.3.3 TLR 3

Doppelsträngige RNA (dsRNA) ist ein bekanntes virales Motiv, welches von den meisten Viren im Laufe ihres Vermehrungszykluses gebildet wird. Die Erkennung von dsRNA wird kontrovers diskutiert. So kann dsRNA ebenso wie das synthetische Analogon Poly (I:C) einerseits durch TLR 3 gebunden werden [10;294]. Andererseits wird angenommen, dass die immunstimulierende Wirkung von dsRNA zum Teil auf eine Aktivierung der dsRNA-abhängigen Proteinkinase (PKR) zurückzuführen ist [21;368].

1.3.3.4 TLR 5

Bakterielles Flagellin ist derzeit der einzige bekannte Ligand von TLR 5 [108]. Es ist der Hauptproteinbestandteil von Flagellar, einer hoch komplexen Struktur, die über die äußere Membran Gram- negativer und positiver Bakterien hinausragt und als Fortbewegungsmittel fungiert. Flagellar begünstigt zudem die Anhaftung an eine Wirtszelle und fördert so die bakterielle Invasion, womit es wesentlich zur Virulenz beiträgt. Genetische Untersuchungen an diversen Gram- negativen Bakterien deckten konservierte Regionen am Amino- und Carboxyl-Terminus auf, die für die immunstimulierende Wirkung von Flagellin verantwortlich gemacht werden konnten [76].

1.3.3.5 TLR 9

TLR 9 ist beteiligt an der Erkennung bakterieller und viraler DNA [294]. Die immunstimulierende Wirkung bakterieller DNA wird auf unmethylierte CpG Motive zurückgeführt [120], welche selten im Genom von Vertebraten vorkommen. Synthetische Desoxyoligonukleotide weisen ähnliche immunstimulierende Aktivität auf.

1.3.3.6 TLR 7, 8 und 10

TLR 7 und TLR 8 erkennen virale und synthetische einzelsträngige RNA sowie Nukleoside [72;115;119;185]. Imidazoquinoline (Imiquimod, Resiquimod) sind

synthetische Nukleoside, die bereits in den 80er Jahren entwickelt wurden. Ihnen kann eine potente antivirale und tumorsuppressive Wirkung zugeschrieben werden, da sie die Produktion proinflammatorischer und regulatorischer Zytokine durch immunkompetente Zellen fördern. Imiquimod ist als Arzneimittel zur Therapie von malignen Hauttumoren sowie zur Behandlung von Genitalwarzen, verursacht durch humane Papillomaviren, zugelassen [45;94;119;148;336;347]. Auch Guanosin-Analoga wie Loxoribine und Bropirimine werden durch TLR 7 und 8 gebunden und wirken sowohl immunmodulierend als auch tumorsuppressiv [114;185]. So wird Bropirimin heute als Medikament bei der Behandlung von Nierenzellkarzinomen angewendet [288].

Für TLR 10 ist bis heute kein Ligand bekannt.

1.4 Signalkaskade

Toll-like Rezeptoren aktivieren eine Signalkaskade, die zur vermehrten Expression immunkompetenter Gene führt. Auf der einen Seite können TLRs nach Aktivierung durch bakterielle Pathogene die Produktion proinflammatorischer Zytokine auslösen und somit eine effiziente Entzündungsreaktion hervorrufen. Auf der anderen Seite induzieren sie die Bildung von Typ I IFN, welches antiviral wirkt, immunkompetente Zellen aktiviert und die Apoptose infizierter Zellen einleitet.

Die Signalkaskade der Toll-like Rezeptoren weist Ähnlichkeiten zu der IL-1 Rezeptor vermittelten Kaskade auf. Sowohl der IL-1 Rezeptor als auch alle Toll-like Rezeptoren interagieren über die TIR-Domäne mit unterschiedlichen Adaptorproteinen, die wiederum TIR-Domänen enthalten. Dazu gehören MyD88, TIRAP-MAL, TRIF-TICAM sowie TRAM-TICAM [84;129;217;222;222;259]. Grundsätzlich kann grob zwischen einem MyD88-abhängigen und einem -unabhängigen Weg differenziert werden. Das Adaptorprotein MyD88 verfügt zusätzlich zur TIR-Domäne über eine death-Domäne am N-terminalen Ende, über welche die Aktivierung nachgeschalteter Proteine erfolgt [222]. Es kann, abgesehen von TLR 3, von allen TLRs genutzt werden und steht im MyD88-abhängigen Weg am Anfang der Signalkaskade.

Eine Ausnahme bilden die TLRs 2 und 4. So brachten Untersuchungen des letzten Jahrzehnts hervor, dass in der Signalkette der TLRs 2 und 4 das Protein TIRAP-MAL MyD88 vorangeschaltet ist. TIRAP-MAL besteht im Vergleich zu MyD88 aus einer kürzeren Aminosäurekette und enthält keine death-Domäne. Man geht davon aus, dass TIRAP-MAL für die Rekrutierung von MyD88 zum Rezeptor notwendig ist [79;84;129;365].

Nach Aktivierung rekrutiert MyD88 über die death-Domäne Mitglieder der IL-1 Rezeptor assoziierten Kinase (IRAK) [192;241]. Die IRAK Familie umfasst die vier Mitglieder IRAK-1, IRAK-2, IRAK-M und IRAK-4 [192]. In Versuchen mit IRAK-4 defizienten Mäusen konnte eine fehlende Ansprechbarkeit auf bakterielle Substanzen festgestellt werden [315]. IRAK-1 besitzt drei TRAF6- (TNFR-assoziiertes Faktor 6) bindende Domänen und darüber hinaus die Fähigkeit zur Autophosphorylierung [370]. IRAK-4 und IRAK-1 werden nacheinander durch Phosphorylierung aktiviert und rekrutieren daraufhin TRAF6. Der Komplex aus TRAF6 und IRAK-1 dissoziiert anschließend vom Rezeptor [180;319;351], was durch IRAK-M verhindert werden kann [166;315]. TRAF6 gehört zur Familie der Ubiquitin E3 Protein-Ligasen und besitzt somit die Fähigkeit Polyubiquitin-Ketten zu synthetisieren [56;192]. Er bildet einen Komplex mit den Ubiquitinations-E2-Enzymen UBC13 und UEV1A, welcher anschließend die Autopolyubiquitination von TRAF6 und die Bildung von Polyubiquitin-Ketten an IKK- γ /NEMO katalysiert [68]. Dadurch wird ein weiterer Komplex, bestehend aus der TGF- β -aktivierten Kinase 1 (TAK1) und den TAK1-bindenden Proteinen TAB1, TAB2 und TAB3, von TRAF6 rekrutiert [351]. TAK1 wiederum phosphoryliert nachfolgend MKK3/MKK6 und IKK- β , die schließlich zur Aktivierung der MAP-Kinasen und des Transkriptionsfaktors Nf- κ B führen [290].

Eine vermehrte Produktion von Typ I IFN wurde nach Aktivierung der TLRs 3, 4, 7 und 9 nachgewiesen. Der Signalweg zur Induktion von Typ I IFN erfolgt bei den TLRs 3 und 4 MyD88-unabhängig und wird durch zwei weitere Proteine, die TIR-Domänen enthalten, vermittelt: TRAM-TICAM und TRIF-TICAM [82;126;259;364]. TRAM-TICAM scheint mit der TIR-Domäne des TLR 4 zu interagieren und anschließend TRIF-TICAM zu aktivieren. In der TLR 3-

vermittelten Kaskade wird TRIF-TICAM direkt durch Interaktion mit dem Rezeptor aktiviert. Über eine TRAF-bindende Domäne am N-terminalen Ende geht TRIF-TICAM eine Bindung mit TRAF3 und TRAF6 ein [290]. TRAF3 ist für die Induktion von Typ I IFN verantwortlich, indem es TBK1 (auch bekannt als NAK oder T2K), ein Mitglied der TRAF-assoziierten Nf- κ B-Aktivatoren (TANK), aktiviert. TBK1 enthält induzierbare I κ B-Kinasen (IKK-i auch bekannt als IKK- ϵ). Diese Kinasen phosphorylieren IRF-3 [121;239], der daraufhin in den Zellkern wandert und zur vermehrten Expression IFN-induzierbarer Gene und proinflammatorischer Zytokine führt [82;128;239;263;307;330;358].

Am C-terminalen Ende verfügt TRIF über das `receptor-interacting protein (RIP) homotypic interaction motif` (RHIM), über welches eine Interaktion mit RIP1 ermöglicht wird. Über RIP1 kann wiederum der Transkriptionsfaktors Nf- κ B aktiviert werden [228].

Die durch TLR 7 und 9 induzierte Produktion von Typ I IFN und inflammatorischen Zytokinen erfolgt über das Adaptorprotein MyD88 [119;120]. MyD88 formt hier einen Komplex mit IRAK-1, IRAK-4, TRAF3, TRAF6, IKK- α und IRF-7, die nach Aktivierung der TLRs 7 und 9 zum Rezeptor rekrutiert werden [127;131;162;339]. Untersuchungen ergaben, dass IRAK-4 sowohl für die Produktion von Typ I IFN als auch für die Bildung proinflammatorischer Zytokinen notwendig ist [315], wohingegen IRAK-1, TRAF3 und IKK- α lediglich IRF-7 aktivieren und somit die Produktion von Typ I IFN kontrollieren [102;131;251;339].

1.4.1 Der Transkriptionsfaktor Nf- κ B

Nf- κ B reguliert die Transkription einer Vielzahl von Genen, die vor allem der Pathogenabwehr dienen [24;216]. Er besteht aus den 5 verschiedenen Rel Proteinen p65 (RelA), RelB, c-Rel, p50/p105 (Nf- κ B1) und p52/p100 (Nf- κ B2), die als Hetero- oder Homodimere an die DNA binden und zur Transkription der Zielgene führen [24;91;233;309]. Während die Proteine RelA/p65 und p50 ubiquitär exprimiert werden, kommen p52, c-Rel und RelB nur in spezifisch differenzierten Zellen vor [24;196]. P50 und p52 entstehen aus ihren Vorläufern p105 und p100 [107;118;195]. Alle Rel-Proteine besitzen eine konservierte, aus

300 Aminosäuren bestehende Struktur, die als Rel homologe Region (RHR) bezeichnet wird. Diese RHR ist verantwortlich für die Dimerisierung, die DNA-Bindung und die Interaktionen mit IκBs. Die RHR enthält darüber hinaus eine nukleäre Lokalisationssequenz (NLS) [233]. p65, RelB und c-Rel enthalten am C-Terminus Transaktivierungsdomänen (TADs), welche die Transkription von Zielgenen einleiten. p50 und p52 können nur als Komplex mit p65, c-Rel oder RelB die Transkription auslösen.

Im inaktiven Zustand liegt Nf-κB als an IκB-Proteinen gebundenes hetero- oder homodimeres Protein im Zytoplasma vor [24;91;233;309]. Die IκB-Familie enthält sieben Mitglieder: IκBα, IκBβ, IκBε, IκBγ, Bcl-3 sowie die Vorläuferproteine p100 und p105 [91;357]. IκB-Proteine besitzen sechs oder sieben Ankyrin-Wiederholungen, welche die Bindung der RHRs und die Maskierung der NLS vermitteln. Nur IκBα, IκBβ und IκBε enthalten am N-Terminus regulierende Regionen, die für die Stimulus-induzierte Degradierung notwendig sind [272].

Die Aktivität von Nf-κB wird durch den IκB Kinase-Komplex (IKK) reguliert, der sich aus den zwei katalytischen Untereinheiten IKK-α und IKK-β sowie dem Gerüstprotein IKK-γ (NEMO) zusammensetzt [27;154;226]. Man unterscheidet zwischen klassischer und alternativer Aktivierungskaskade. Da die TLR-vermittelte Aktivierung über den klassischen Weg verläuft, soll im Folgenden nur auf diesen näher eingegangen werden [40]. In der klassischen Signalkaskade phosphoryliert IKK-β die IκB-Proteine an den Serinresten 32 und 36, was deren Ubiquitination durch den SCF^{β-TrcP} Komplex und damit den Abbau durch Proteasomen ermöglicht. Dadurch wird die nukleäre Lokalisationsfrequenz frei gelegt, so dass der Transkriptionsfaktor in den Zellkern wandern und die Transkription von Zielgenen einleiten kann [23;39;55;71;117;118;293;357;369].

IKK kann durch verschiedene, vor allem aber inflammatorische und stress-assoziierte Stimuli aktiviert werden. Neben mikrobiellen Agenzien und Viren können Zytokine, wie IL-1 und TNF-α, und proapoptotische Stimuli, wie UV-Licht und freie Sauerstoffradikale, IKK aktivieren [24;27;91;226].

1.4.2 MAP-Kinasen

MAPK gehören zu den Serin-/Threonin- Proteinkinasen, die Bestandteile eines Signaltransduktionsnetzes sind, welches die Embryogenese, die Zelldifferenzierung, die Zellproliferation und den Zelltod kontrollieren. Typisch für die MAPK-Kaskade ist ihr Aufbau in eine dreischrittige Kinasenkaskade: MAP-Kinasen-Kinasen (MAPKKs) phosphorylieren die MAPKs an Serin/Threonin- und Tyrosinresten [62;171;362]. Die MAPKK selbst werden wiederum durch MAPKKKs phosphoryliert und damit aktiviert [65;80;99;169;190]. Anhand des Prolins, welches an bestimmten Positionen exprimiert wird, erkennen MAPKs ihre Substrate und phosphorylieren diese daraufhin an den Aminosäuren Serin bzw. Threonin. Zu ihren Substraten gehören Transkriptionsfaktoren, Proteine des Zytoskeletts und der Membranen sowie Phospholipasen [262;283].

Bis heute sind drei wichtige Gruppen bekannt: Extrazelluläre-signal-regulierte Kinasen (ERK 1/2), c-Jun N-terminale Kinasen (JNK) / Stress-aktivierte Proteinkinasen (SAPK) und p38 [54;178]. Nachfolgend wird nur auf die MAP-Kinasen ERK 1/2 und p38 näher eingegangen.

ERK 1/2, auch bekannt als p42/p44 MAPK, regulieren das Zellwachstum und die Zelldifferenzierung [283;374]. Vor allem Hormone, Phobanol-Ester und Wachstumsfaktoren, aber auch osmotischer Stress und Zytokine induzieren die Aktivierung des ERK-Signalweges [190]. ERK 1/2 werden durch MEK1 und MEK2 phosphoryliert [62;171;362], die wiederum durch Raf-Isoformen [69;85;177], Tpl-2, MOS und MEKK1-3 [286] aktiviert werden können.

Von der MAPK p38 sind vier verschiedene Isoformen bekannt: α , β , γ und δ [54]. Die p38-Signalkaskade wird in vielen Zellen durch Zytokine, wie TNF- α und IL-1 β , durch Hormone sowie durch unterschiedliche Stressoren, wie Hyperosmolarität und Hitzeschock, aktiviert [262;283;374] und kontrolliert vor allem die Immun- und Entzündungsantwort der Zelle [283]. Die Signalkaskade besteht aus den MAPKKs MKK3 und MKK6, die p38 phosphorylieren und selbst von den MAPKKK MEKK1-4, TAO1 und 2, ASK oder TAK aktiviert werden [262;283].

1.5 Proopiomelanokortin-System

Das α -Melanozyten stimulierende Hormon (α -MSH) gehört zur Gruppe der Melanokortine. Melanokortine sind strukturell ähnliche Peptide, die ihren Namen aufgrund ihrer melanotropen und kortikotropen Wirkung erhielten. Sie werden aus dem Vorläufermolekül Proopiomelanokortin (POMC) synthetisiert und umfassen neben α -MSH das β - und γ -Melanozyten stimulierende Hormon (β - und γ -MSH) sowie das adrenokortikotrope Hormon (ACTH) [77;209]. Erstmals entdeckt im Hypophysenvorderlappen, wurden die Peptide mittlerweile in verschiedensten Geweben und Zellen beschrieben [67;174;310;312]. Innerhalb der Haut konnte eine vermehrte Expression und Freisetzung von POMC-Derivaten in Melanozyten, Keratinozyten, Langerhans-Zellen und Fibroblasten nach Exposition externer Noxen, wie UV-Strahlung oder LPS, nachgewiesen werden [81;292;333;360].

1.5.1 Biosynthese

Das POMC-Gen besteht aus 3 Exons und 2 Introns, wobei Exon 1 nicht kodierende Regionen enthält, Exon 2 für ein N-terminales Signalpeptid kodiert, das für die Translokation und Sekretion notwendig ist und Exon 3 die Abfolge für die verschiedenen bioaktiven Peptide umfasst [18;349]. Die Transkription des POMC-Gens in mRNA erfolgt in Abhängigkeit vom Ort der Expression. So ergeben sich je nach Lokalisation unterschiedlich große bzw. lange mRNA-Transkriptate. Auch bei der Translation zeigen sich lokale Unterschiede. Nach der Translation wird das POMC-Prohormon gewebsspezifisch durch Proteasen, die sogenannten Prohormonkonvertasen 1 und 2 (PC-1 und -2), in die jeweiligen Derivate gespalten [30]. Die Prohormonkonvertase 1 (PC-1) generiert die Bildung von ACTH, während die Prohormonkonvertase 2 (PC-2) durch weitere Spaltung von ACTH die Melanokortine α -, β - und γ -MSH [269;295;298] bildet. Die so entstandenen Peptide werden anschließend durch Acetylierung und Amidierung weiter modifiziert [1].

1.5.2 Rezeptoren

Die Wirkung der Neuropeptide ist abhängig von der Expression der Melanokortinrezeptoren (MC-R). Bis heute sind 5 Subtypen (MC-1R bis MC-5R) identifiziert worden [57;87;179;238;281]. Melanokortinrezeptoren sind G-Protein-gekoppelte Rezeptoren mit sieben transmembranösen Domänen, die nach Bindung eines Liganden die Adenylatzyklase aktivieren, welche ATP in cAMP umwandelt [61;331;359]. In der Zelle wirkt cAMP als second messenger und steuert die physiologische Antwort der Zelle.

Innerhalb der Haut konnte vor allem der MC-1-Rezeptor nachgewiesen werden [36;43]. Dieser Rezeptor besitzt die höchste Bindungsaffinität für α -MSH [237] und wird auf Fibroblasten [35], Melanozyten [238;335], Keratinozyten [53;143], Neutrophilen, Mastzellen, Makrophagen, Monozyten [16;32;52;314], dendritischen sowie endothelialen Zellen [28;104] exprimiert. Zunächst wurde angenommen, dass die Hauptfunktion des MC-1R in der Regulation der Melanogenese liege. Mittlerweile konnte jedoch festgestellt werden, dass der Rezeptor darüber hinaus eine wichtige Rolle in der Modulation von Entzündungsreaktionen einnimmt.

1.5.3 Immunmodulierende Wirkung

Untersuchungen haben ergeben, dass unter den POMC-Derivaten vor allem α -MSH sowie dessen C-terminales Tripeptid α -MSH 11-13 (KPV) eine potente immunmodulierende und entzündungshemmende Wirkung besitzen. So wird beschrieben, dass α -MSH zum Einen die Produktion und Freisetzung proinflammatorischer und immunmodulierender Zytokine wie IL-1, IL-6, TNF- α , IL-2, IL-4, IL-13 und IFN- γ reduziert [2;4;51;197;202;204;206;277;355] und zum anderen die Synthese des antiinflammatorisch wirkenden Zytokins IL-10 fördert [33;95;204]. Auch die Chemotaxis immunkompetenter Zellen in das entzündete Gewebe wird durch α -MSH beeinflusst, indem es die Sekretion der Chemokine IL-8, MCP-1 und Gro- α moduliert [90;104]. Des Weiteren scheint das Melanokortin die IL-8-vermittelte Immunantwort von Neutrophilen unterdrücken zu können, da es durch Inhibition von Serin-Proteasen die Expression von

CXCR1 und CXCR2 reduziert [211]. Die Expression endothelialer Adhäsionsmoleküle, wie ICAM-1, VCAM-1, ELAM-1 und E-Selectin [34;46;113;151;299], die während einer Entzündung für eine hinreichende Migration und Diapedese von Immunzellen aus den Blutgefäßen in das betroffene Gewebe notwendig sind, wird ebenfalls durch α -MSH inhibiert. Untersuchungen haben darüber hinaus ergeben, dass α -MSH die Expression von MHC-I Molekülen [113;141;205] und kostimulierenden Molekülen wie CD86 und CD40 auf Monozyten und dendritischen Zellen unterdrückt [28;32]. Außerdem hemmt das Melanokortin die Synthese von Stickstoffmonoxid und Neopterin durch Makrophagen, die wesentliche Bestandteile zur Elimination pathogener Erreger darstellen [197;270;314]. Zudem scheint α -MSH IL-1 vermittelte Entzündungsparameter wie Fieber und Thymozytenproliferation unterdrücken zu können [136] und beeinflusst je nach Stimulus, Zytokinproduktion und -konzentration, die Synthese und Freisetzung von Antikörpern wie IgE [4;206]. Durch Inhibition der Prostaglandin-Synthese moduliert das Neuropeptid außerdem den Arachidonsäurestoffwechsel [245]. Immunreaktionen vom Soforttyp werden ebenfalls durch α -MSH beeinflusst, indem die Histamin-Freisetzung und die mRNA Expression von IL-1, TNF- α und Lymphotactin durch Mastzellen unterdrückt werden [2;98]. α -MSH entfaltet seine Wirkung, indem es cAMP-abhängig die Aktivierung des Transkriptionsfaktors Nf- κ B unterdrückt [109;110;151;210]. Es zeigte sich, dass sowohl die Degradierung von I κ B α [208] als auch die Translokation von p65 inhibiert werden. In Endothelzellen konnte außerdem nachgewiesen werden, dass nach Stimulation mit α -MSH die Expression von Nf- κ B mRNA inhibiert wird, die inhibitorische Untereinheit I κ B jedoch vermehrt transkribiert wird [41;139;151;203;210]. Eine ausführliche Darstellung der immunmodulierenden Wirkung von α -MSH ist in dem Review von Brzoska et al aus dem Jahr 2008 zu finden [42].

2 Fragestellung

Toll-like Rezeptoren spielen eine wesentliche Rolle in der Aktivierung des angeborenen Immunsystems. Die Bedeutung dieses Systems in der Haut und seine Interaktion mit anderen regulierenden Signalwegen sind jedoch nur unvollständig geklärt. Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist zu prüfen, in wie weit Keratinozyten durch eigenständige TLR-vermittelte Pathogenerkennung an der Auslösung und Regulierung von Entzündungsreaktionen beteiligt sind und ob dieser Prozess durch POMC-Peptide *in vitro* moduliert werden kann.

Konkret soll zunächst mittels RT-PCR die Expression von TLRs in der murinen Keratinozytenzelllinie PAM 212 verifiziert werden. Im nächsten Schritt soll die Modulation der TLR-Expression im Rahmen einer Entzündungsreaktion mittels verschiedener proinflammatorischer Stimuli (LPS, IL-1) ermittelt werden.

Darüber hinaus soll gezeigt werden, dass TLRs auf Keratinozyten *in vitro* funktionell exprimiert werden, und dass sie eine essentielle Aufgabe bei der Initiation und Regulation der Entzündungsreaktion haben. Hierzu ist geplant, in der humanen Keratinozytenzelllinie HaCaT sowie den PAM 212 Zellen die Aktivität des Transkriptionsfaktors Nf- κ B, der MAP-Kinasen p38 und ERK 1/2 sowie die Expression der Zytokine IL-8, IL-6 und CXCL-2 nach Stimulation mit TLR-Liganden zu bestimmen.

Abschließend soll der Einfluss des cAMP-Signalweges, welcher auch durch Proopiomelanokortine genutzt wird, auf die Signaltransduktion der TLRs untersucht werden. Im Detail wird wiederum der Aktivierungszustand des Transkriptionsfaktors Nf- κ B, der MAP-Kinasen p38 und ERK 1/2 sowie die Expression der Zytokine IL-6, IL-8 und CXCL-2 nach Koinkubation der Liganden mit dem cAMP-Analogon db-cAMP bzw. dem Adenylatzyklase-Aktivator Forskolin ermittelt.

3 Material und Methode

3.1 Zellkultur

Die Kultivierung der Zellen erfolgte in dem Inkubator Hera Safe (Heraeus, Hanau, Deutschland) in wasserdampfgesättigter Atmosphäre bei 37°C und 5% CO₂-Gehalt. Die Medien inklusive der Zusätze wurden mit 150ml Sterilfiltern mit einer Porengröße von 0,22µm filtriert. Glaswaren und nicht steril verpackte Plastikartikel wurden in einem Dampfsterilisator bei 120°C und 1 bar für 20 Minuten sterilisiert.

3.1.1 Zellkultivierung

Bei den verwendeten PAM 212 Zellen handelt es sich um eine murine Keratinozytenzelllinie. Die humane keratinozytäre Zelllinie HaCaT stellt die erste permanente, aneuploide Zelllinie dar, die aus adulter humaner Haut gewonnen werden konnte. Trotz ihres abgewandelten und unlimitierten Wachstumsverhaltens, formieren die HaCaTs strukturiertes epidermales Gewebe und weisen eine reguläre Differenzierung und Keratinisierung auf, so dass sie im besonderen Maße ein geeignetes *in vitro* Modell zur Erforschung von Keratinozyten darstellen [37].

Beide Zelllinien wurden in 75 cm² großen Kulturflaschen (Falcon BD, Heidelberg, Deutschland) in RPMI-Medium 1640 (PAA Laboratories, Linz, Österreich) kultiviert. Das Medium wurde vor Gebrauch unter sterilen Bedingungen mit 1% L-Glutamin, 1% Penicillin Streptomycin (PAA Laboratories, Linz, Österreich) und 10% FCS (Sigma Aldrich, München, Deutschland) versetzt. Jeden 3. Tag wurden die Zellen 1:10 (HaCaT) bzw. 1:20 (PAM 212) gesplittet. Zunächst wurden sie mit 10ml PBS (PAA Laboratories, Linz, Österreich) gewaschen und anschließend zum Lösen von der Plastikoberfläche mit 4ml Trypsin (PAA Laboratories, Linz, Österreich) versetzt. Nach 20-minütiger Inkubation wurde die Reaktion durch Zugabe von 6ml Medium gestoppt und die Zellen nach kurzem Resuspendieren in neue Kulturflaschen (Falcon BD, Heidelberg, Deutschland) überführt.

3.1.2 Zellzahl- und Vitalitätsbestimmung

Die Zellzahl und die Vitalität der Zellen wurden mit dem Trypanblauausschlussverfahren bestimmt. Hierfür wurde der Zellüberstand vom Splitten verwendet, der zunächst bei 1200 U/min für 5 Minuten abzentrifugiert wurde. Das Zellpellet wurde dann in 1ml Medium resuspendiert und daraufhin mit 19ml Medium versetzt. Anschließend wurden 10µl der nun vorliegenden Zellsuspension mit 10µl Trypanblau (Gibco, Eggenstein, Deutschland) gemischt und die Neubauerkammer (Brand, Wertheim, Deutschland) mit der Lösung beschickt. Lebende Zellen schleusen den verwendeten Farbstoff aktiv aus und erscheinen daher im Lichtmikroskop weiß in bläulicher Umgebung. Tote Zellen setzen der Diffusion des Farbstoffs durch die Plasmamembran keinen nach außen gerichteten Transport entgegen und werden tiefblau gefärbt.

Unter dem Mikroskop wurde die Anzahl der vitalen Zellen in zwei Großquadraten gezählt. Die Zellzahl wurde dann wie folgt errechnet:

$$z \text{ (Zellen/ml)} = Z \times 10^4$$

Z = Zahl der ungefärbten Zellen in zwei Großquadraten

3.1.3 Toxikologische Untersuchung: MTT Proliferationsassay

Mit Hilfe des MTT-Assays kann die Vitalität der Zellen bestimmt werden. Grundlage dieses Verfahrens ist das MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl Tetrazolium Bromid), eine schwach gelbe Substanz, welche von Zellen aufgenommen wird und durch mitochondriale Dehydrogenasen zu einem blauen wasserunlöslichen Formazan-Produkt umgewandelt wird. Voraussetzung für die Umwandlung ist die Vitalität der Zellen. Mittels eines Stopppuffers werden die Zellen lysiert und die blauen Farbkristalle gelöst. Die Konzentration des Farbstoffs kann anschließend photometrisch gemessen werden und lässt auf die Anzahl der lebenden Zellen schließen.

Für diesen Versuch wurden 1×10^5 /ml PAM 212 Zellen ausgesät. Die Stimulation erfolgte für 24 Stunden. Nach Ablauf der 24 Stunden wurden die Zellen mit dem MTT versetzt, welches vorab in einem PBS Puffer in einer Konzentration von 5mg/ml gelöst wurde. Die Reaktion wurde 4 Stunden später

mit dem Stopppuffer DMSO unterbrochen. Anschließend wurden 200µl aus jedem well je dreimal auf eine 96 well Platte (Falcon BD, Heidelberg, Deutschland) pipettiert, um vorhandene Volumina Mängel bei der Auswertung mitteln zu können. Die Auswertung erfolgte mit dem Elisa Reader (BioRad Laboratories GmbH, München, Deutschland) bei einer Wellenlänge von 595-610nm.

3.1.4 Stimulation der Zellen

Nach der Zellzahlbestimmung wurden die Zellen in der für den jeweiligen Versuch benötigten Menge auf wells ausgesät. Nach 24-stündiger Kultivierung im RPMI Medium und kurzem Waschen mit PBS wurde das Kulturmedium durch 5% FCS-Medium ersetzt, welches sich aus dem 0% Medium (PAA Laboratories, Linz, Österreich) und fetalem Kälberserum zusammensetzt. Einen Tag später erfolgte die Stimulation. Als Stimulantien kamen in dieser Arbeit Pam₃Cys-Ser-(Lys)₄ (5µg/ml) (Merck, Darmstadt, Deutschland), Poly (I:C) (20µg/ml) (Sigma Aldrich, München, Deutschland), LPS (500ng/ml und 1000ng/ml) (Sigma Aldrich, München, Deutschland), Flagellin Salmonella muenchen, Recombinant, E.coli (1µg/ml) (Merck, Darmstadt, Deutschland), murines IL-1α (10ng/ml) (Bioscience, Camarillo, USA), humanes IL-1β (10ng/ml) (Peprotech Inc., New York, USA), db-cAMP (1000µM) (Sigma Aldrich, München, Deutschland) und Forskolin (10µM) (Sigma Aldrich, München, Deutschland) sowie die Inhibitoren SB203580 (10µM) (Merck, Darmstadt, Deutschland) und PD98059 (25µM) (Merck, Darmstadt, Deutschland) zur Anwendung. Die angegebenen Konzentrationen wurden vorab im MTT-Assay an den PAM 212 Zellen getestet und erwiesen sich aus toxikologischer Sicht als unbedenklich. Des Weiteren entsprechen sie den Konzentrationsempfehlungen der Hersteller.

3.2 Immunologische Methoden

3.2.1 Immunfluoreszenz

Die Immunfluoreszenz wurde 1940 erstmalig durch den Mikrobiologen Albert Coons angewandt. Seitdem hat sie sich als immunhistologische Nachweismethode etabliert.

Eine häufig durchgeführte Methode ist die indirekte Doppelimmunfluoreszenz. Mit dieser Methode ist es möglich, unter Verwendung zwei verschiedener Antikörper Antigen-Strukturen nachzuweisen. Der erste Antikörper erkennt hierbei das gesuchte Epitop spezifisch. Der zweite Antikörper, der an einen Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt ist, richtet sich speziell gegen das F_c-Teil des ersten Antikörpers und bindet diesen. Bei Betrachtung unter dem Mikroskop kann man den Farbstoff mit einem Laser bestimmter Wellenlänge anregen und so das gesuchte Protein nachweisen.

Für den Versuch wurden 45×10^3 PAM 212 Zellen bzw. 90×10^3 HaCaT Zellen auf Chamber Slide-Platten (Nalge Nunc International, New York, USA) ausgesät. Die Stimulationszeit betrug 30 Minuten. Nach Ablauf der Zeit wurde das Medium aspiriert und die Zellen mit gefiltertem TBS-T, welcher aus 100ml 10× TBS, 900ml destilliertem Wasser und 500µl Tween 20 (Karl Roth, Karlsruhe, Deutschland) bestand, dreimal für je 2 Minuten gewaschen. Das 10× TBS wurde vorab aus 60,5g TRIS und 438,3g NaCl, die auf 5 l Wasser aufgefüllt wurden, hergestellt und autoklaviert. Nach dem Waschen wurden die Zellen mit 4%igem Paraformaldehyd (Sigma Aldrich, München, Deutschland) für 30 Minuten bei 4°C fixiert und, nach erneutem Waschen mit TBS-T, mit Methanol (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) für weitere 30 Minuten bei -20°C permeabilisiert. Nach Aspiration des Methanols wurden die Zellen mit TBS-T für 5 Minuten gewaschen und anschließend mit dem Blocking Puffer (5%iges Serum aus dem Esel) bei Raumtemperatur inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren. Nach einer Stunde wurde der Blocking Puffer aspiriert und die Zellen für zwei Stunden mit dem Erstantikörper Nf-κB p65 (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Heidelberg, Deutschland) versetzt, der gegen ein Peptid am C-Terminus des Transkriptionsfaktors gerichtet ist. Es folgten drei

fünfminütige Waschvorgänge mit TBS-T, um nicht gebundene Antikörper zu entfernen. Daraufhin wurden die Zellen mit dem Sekundärantikörper Alexa Fluor[®] 488 donkey anti-rabbit (Invitrogen, Darmstadt, Deutschland) und der Zellkernfärbung DAPI (Molekular probes, Karlsruhe, Deutschland), die eine genaue Lokalisation des Nukleus ermöglicht, für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgte ein erneuter dreimaliger Waschvorgang mit TBS-T für jeweils 10 Minuten. Zuletzt wurde das TBS-T ausgeklopft, die Champs abgelöst, der Objektträger mit dem Mounting Medium (Dako Deutschland GmbH, Hamburg, Deutschland) beschickt und mit einem Deckgläschen luftblasenfrei versiegelt. Bis zur Mikroskopie wurde der Objektträger lichtverschlossen bei 4°C aufbewahrt. Die Fluoreszenzbilder wurden mit einem 40× Ölimmersionsobjektiv und zusätzlich 16-facher Vergrößerung an dem Fluoreszenzmikroskop BX61 (Olympus, Hamburg, Deutschland) vorgenommen. Dabei betrug die Belichtungszeit der DAPI-Färbung 10ms, die der Alexa 488 konjugierten Färbung 2000ms. Als Software wurde das Programm Cell P (Olympus, Hamburg, Deutschland) verwendet.

3.3 Molekularbiologische Methoden

3.3.1 RNA Präparation

Die RNA wurde mittels des RNeasy Mini Kits (Quiagen, Hilden, Deutschland) nach den Angaben des Herstellers gewonnen. Bei diesem Verfahren wird die Nukleinsäure an Silikatmembranen gebunden. Durch die Wahl geeigneter Puffer bindet vor allem RNA, während genomische DNA weitestgehend ungebunden bleibt.

Nach Absaugen des Mediums wurden die Zellen mit 300µl RLT-Puffer lysiert, der vorab entsprechend der Herstellerangaben mit β-Mercaptoethanol versetzt wurde. Die Zellen wurden mit einem Scharber von der Plastikoberfläche gelöst und in ein Eppendorf Reaktionsgefäß überführt. Mit Hilfe von Insulin Spritzen wurde das Lysat durch mehrmaliges Resuspendieren homogenisiert und anschließend mit 350µl Ethanol versetzt. Nach erneutem Resuspendieren wurde das Lysat auf RneasyMiniSpin®Säulen gegeben und für 15 Sekunden bei 10000rpm zentrifugiert. Die aufgefangene Lösung wurde verworfen und 350µl des ersten Waschpuffers RW1 hinzugegeben. Die Säule wurde erneut 15 Sekunden bei 10000rpm zentrifugiert und die aufgefangene Flüssigkeit abermals verworfen. Anschließend wurden die Säulen mit je 50µl RNAse freier DNase in RDD Puffer (Verhältnis 1:7) beladen. Dieser 15-minütige Inkubationsschritt bewirkt, dass eventuell an die Säule gebundene DNA in kurze Stücke verdaut und somit beim folgenden Waschvorgang von der Membran entfernt wird. Hiefür wurden weitere 350µl des Waschpuffers RW1 hinzugefügt. Nach Zentrifugation über 15 Sekunden bei 10000rpm wurde die aufgefangene Flüssigkeit erneut verworfen. Dieser Waschschrift wurde mit 500µl eines zweiten Waschpuffers (RPE) zweimal wiederholt, wobei die Säulen beim zweiten Mal für 2 Minuten bei 10000rpm zentrifugiert wurden. Danach wurde die gebundene RNA durch Hinzufügen von 30µl RNAse freien Wassers in ein frisches 1,5ml Eppendorf Reaktionsgefäß eluiert. 2µl der jeweiligen Probe wurden für die spektralphotometrische Analyse verwendet. Der Rest der Proben wurde bis zur weiteren Verarbeitung bei -80 °C gelagert.

3.3.2 Konzentrations- und Reinheitsbestimmung von RNA

Durch spektralphotometrische Messungen lassen sich Konzentration und Reinheit von DNA und RNA bestimmen. Die Messungen erfolgten im Bio-Photometer (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) bei 260nm in speziellen Kunststoffküvetten (Quiagen, Hilden, Deutschland).

3.3.3 Reverse Transkription

Um bestimmte DNA-Sequenzen in der PCR amplifizieren zu können, muss zunächst die RNA in die so genannte komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben werden. Diese Aufgabe bewerkstelligt die 5'→3'DNA-Polymerase, die reverse Transkriptase. Das Enzym besitzt die Fähigkeit, einen DNA-Einzelstrang komplementär zu einer mRNA-Matrize zu synthetisieren. Hierfür muss ein Primer zur Verfügung stehen, der durch komplementäre Basenpaarung an die mRNA binden kann und eine freie 3'-OH Gruppe besitzt. Für die Reverse Transkription wurde das Kit von Fermentas (St. Leon-Rot, Deutschland) verwendet. Die Durchführung erfolgte entsprechend der Herstellerangaben. Aufgabe war es, 1µg RNA in cDNA umzuschreiben. Hierfür wurde die RNA nach spektralphotometrischer Konzentrationbestimmung mit DEPC-behandeltem Wasser verdünnt, um die gewünschte Konzentration von 1µg/µl zu erhalten. Als Primer dienten oligo(dT) Primer (0,5µg/µl). 1µl der vorliegenden Probe wurden mit 1µl Primer und 10µl DEPC-behandeltes Wasser gemischt, abzentrifugiert und für 5 Minuten auf 70°C erwärmt. Nach anschließender Abkühlung auf Eis wurden 4µl 5× Reaction Buffer, 1µl RiboLock™ Ribonuclease Inhibitor und 2µl 10mM dNTP Mix hinzugefügt. Nach gründlichem Wortexen und Zentrifugieren wurde die Suspension auf 37°C für 5 Minuten erwärmt. Dann wurde 1µl RevertAid™ M-MuLV Reverse Transcriptase zugesetzt, so dass das Endvolumen 20µl betrug. Danach wurde die Suspension für 1 Stunde auf 42°C erwärmt. Durch anschließendes Erhitzen auf 72°C für 10 Minuten und späteres Abkühlen auf Eis wurde die Reaktion unterbrochen. Die hergestellte cDNA wurde bis zum Gebrauch bei -20°C gelagert.

3.3.4 Polymerase-Kettenreaktion

3.3.4.1 Prinzip der PCR

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) erlaubt die *in vitro*-Vermehrung eines spezifischen DNA-Abschnittes aus einem Überschuss anderer Nukleinsäuren heraus. Sie setzt sich prinzipiell aus 3 Teilschritten zusammen. Zunächst wird bei einer Temperatur von über 90°C die doppelsträngige DNA denaturiert, so dass zwei Einzelstränge entstehen. Im zweiten Schritt binden Oligonukleotidprimer an die DNA (Annealing), die komplementär zu den flankierenden Bereichen des zu amplifizierenden DNA-Abschnittes sind. Der stromaufwärts gelegene Primer ist komplementär zu einer Sequenz auf dem 5'→3' Strang, der stromabwärts gelegene Primer zu einer Sequenz auf dem 3'→5' DNA-Matrizenstrang. Die für die Anlagerung benötigte Annealing-Temperatur ist abhängig von der Länge und dem G-C-Gehalt der Primer und liegt in der Regel zwischen 50°C und 60°C. Die Primer dienen als Startstück für eine hitzestabile DNA-abhängige DNA-Polymerase, die Taq-DNA-Polymerase, welche aus dem thermophilen Bakterium *Thermophilus aquaticus* gewonnen wurde. Die Taq-DNA-Polymerase beginnt bei Erreichen der Elongationstemperatur (in der Regel zwischen 68°C und 72°C) aus zugesetzten Desoxynukleosidtriphosphaten (dNTP) den komplementären DNA-Strang zu synthetisieren. Die ständige Wiederholung dieses Zyklus bewirkt eine exponentielle Vermehrung des ausgewählten DNA-Stranges. Dabei dient der jeweils neu synthetisierte DNA-Strang als Matrize für die nächste Amplifikation. Nach einer gewissen Anzahl von Wiederholungen ist die Sättigung erreicht, so dass kein exponentielles Wachstum mehr stattfindet. Dieses Stagnieren beruht auf der abnehmenden Konzentration der benötigten Substrate und der nachlassenden Funktionstüchtigkeit der Taq-DNA-Polymerase.

3.3.4.2 Oligonukleotid-Primer

Dankenswerter Weise wurden die Primer (Tabelle 1) von Dr. rer. nat. Karin Loser zur Verfügung gestellt. Die Primer wurden mit Primer Express 2.0 unter

Verwendung der in der Datenbank <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> angegebenen cDNA-Sequenzen designt und von der Firma Biozym synthetisiert.

Tabelle 1: Sequenzen der verwendeten Oligonukleotidprimer und Referenzkennungen von TLRs

Primer	Sequenz
IL-6	Stromaufwärts: 5`-AGC CAC TCA CCT CTT CAG AAC G-3` Stromabwärts: 5`-GGT TCA GGT TGT TTT CTG CCA G -3`
IL-8	Stromaufwärts: 5`-CTT GGC AGC CTT CTT GAT TTC-3` Stromabwärts: 5`-TTC TGT GTT GGC GCA GTG TG-3`
mCXCL-2	Stromaufwärts: 5`-AGT GAA CTG CGC TGT CAA TGC-3` Stromabwärts: 5`-AGG CAA ACT TTT TGA CCG CC-3`
mTLR 4	Stromaufwärts: 5`-ACC AGG AAG CTT GAA TCC CTG-3` Stromabwärts: 5`-GAG GTG GTG TAA GCC ATG CC-3`
TLR 1 (NM 030682.1)	Stromaufwärts: 5`-GGA TGT GTC CGT CAG GAC TA-3` Stromabwärts: 5`-TGT AAC TTT GGG GGA AGT TG-3`
TLR 2 (NM 011905)	Stromaufwärts: 5`-CAG ACG TAG TGA GCG AGC TG-3` Stromabwärts: 5`-GGC ATC GGA TGA AAA GTG TT-3`
TLR 3 (NM 126166)	Stromaufwärts: 5`-GAG GGC TGG SGG ATC TCT TT-3` Stromabwärts: 5`-TGC CTC AAT AGC TTG CTG AA-3`
TLR 4 (NM 021297)	Stromaufwärts: 5`-GCT TTC ACC TCT GCC TTC AC-3` Stromabwärts: 5`-CGA GGC TTT TCC ATC CAA TA-3`
TLR 5 (NM 016928.2)	Stromaufwärts: 5`-GCT TTG TTT TCT TCG CTT CG-3` Stromabwärts: 5`-ACA CCA GCT TCT GGA TGG TC-3`
TLR 6 (NM 011604)	Stromaufwärts: 5`-GCA ACA TGA GCC AAG ACA GA-3` Stromabwärts: 5`-GTT TTG CAA CCG ATT GTG TG-3`
TLR 7 (NM 133211)	Stromaufwärts: 5`-ATT CAG AGG CTC CTG GAT GA-3` Stromabwärts: 5`-AGG GAT GTC CTA GGT GGT GA-3`
TLR 8 (NM 133212)	Stromaufwärts: 5`-TCC TGG GGA TCA AAA ATC AA-3` Stromabwärts: 5`-AAG GTG GTA GCG CAG TTC AT-5`
TLR 9 (NM 031178)	Stromaufwärts: 5`-ACC CTG GTG TGG AAC ATC AT-3` Stromabwärts: 5`-GTT GGA CAG GTG GAC GAA GT-3`

3.3.4.3 PCR-Amplifikation

Aufgabe war es, die DNA-Sequenzen der Toll-like Rezeptoren zu amplifizieren. Zunächst wurde ein Mastermix hergestellt, bestehend aus 15,9µl Aqua dest.,

5µl 5× Green Reakt.-Buffer, 1µl dNTP-Mix, 1µl FW- und RW-Primer und 0,125µl Go Taq. 24µl des Mastermixes wurden mit 1µl cDNA versetzt, die entweder aus den PAM 212 Zellen oder aus mit LPS stimulierten, knochenmarksgenerierten dendritischen Zellen extrahiert wurde. Entsprechend der spezifischen Reaktionsbedingungen der Oligonukleotid-Primer (siehe Tabelle 3) wurde der Thermocycler (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) programmiert und gestartet.

Tabelle 3: Amplifizierungsprotokoll und Längen der PCR-Produkte der Toll-like Rezeptoren

Produkt	Größe	Zyklen	Denaturierung	Annealing	Elongation
TLR 1	337bp	1	94 °C/4min		72 °C/5min
		35	94 °C/1min	66 °C/1min	72 °C/1min
TLR 2	387bp	1	94 °C/4min		72 °C/5min
		35	94 °C/1min	68 °C/1min	72 °C/1min
TLR 3	347bp	1	94 °C/4min		72 °C/5min
		35	94 °C/1min	62 °C/1min	72 °C/1min
TLR 4	358bp	1	94 °C/4min		72 °C/5min
		35	94 °C/1min	68 °C/1min	72 °C/1min
TLR 5	339bp	1	94 °C/4min		72 °C/5min
		35	94 °C/1min	54 °C/1min	72 °C/1min
TLR 6	346bp	1	94 °C/4min		72 °C/5min
		35	94 °C/1min	66 °C/1min	72 °C/1min
TLR 7	255bp	1	94 °C/4min		72 °C/5min
		35	94 °C/1min	68 °C/1min	72 °C/1min
TLR 8	300bp	1	94 °C/4min		72 °C/5min
		35	94 °C/1min	60 °C/1min	72 °C/1min
TLR 9	338bp	1	94 °C/4min		72 °C/5min
		35	94 °C/1min	60 °C/1min	72 °C/1min

3.3.4.4 Elektrophorese

Die Elektrophorese beschreibt die Wanderung geladener Teilchen in einem elektrischen Feld. Je nach Ladung und Größe wandern die Teilchen auf dem Gel entsprechend weit, so dass ein Substanzgemisch, das aus unterschiedlichen Komponenten besteht, aufgetrennt wird. Bei Nukleinsäuren wurden horizontale Agarosegelelektrophoresen (3.3.4.4.1) durchgeführt.

Proteingemische wurden in vertikalen SDS-Polyacrylamid-Gelen (siehe 3.4.3) aufgetrennt.

3.3.4.4.1 Agarosegelelektrophorese

Bei der Agarosegelelektrophorese werden negativ geladene Nukleinsäuren, je nach Größe und Konformation und daraus resultierender Wanderungsgeschwindigkeit, im elektrischen Feld voneinander getrennt. Die Konzentration des Gels wird durch die Porengröße bestimmt, durch welche die Nukleinsäuren hindurchwandern müssen. Niedermolekulare Nukleinsäuren wandern schneller, da ihnen ein geringerer Widerstand durch die Porengröße entgegen gesetzt wird.

Zur Herstellung eines Agarosegels wurde Agarose (Sigma Aldrich, München, Deutschland) mit 1× TAE-Puffer, bestehend aus 20ml TAE (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) und 980ml Aqua dest., gemischt und so lange erhitzt, bis alle Kristalle gelöst und eine homogene Flüssigkeit entstanden war. Anschließend wurden 5µl Ethidiumbromid zugesetzt und das Gel in eine Gelelektrophoresekammer (BioRad Laboratories GmbH, München, Deutschland) gegossen. Durch Einsetzen eines Kammes in die noch flüssige Agarose bildeten sich nach dem Aushärten Taschen, auf denen die Proben aufgetragen werden konnten. Das Ethidiumbromid lagert sich zwischen die Basen der Nukleinsäuren. Nach Anregung mit UV-Licht wird der entstandene Ethidiumbromid-Nukleinsäure-Komplex als leuchtende Bande sichtbar. Nach der Aushärtung wurde das Gel mit 1×TAE-Puffer bedeckt, der Kamm entfernt und die Proben aufgetragen. Zusätzlich zu den Proben wurde der Marker GeneRuler 100bp DNA Ladder (Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland) aufgetragen, wodurch beim Vergleich mit den Proben auf die relative Größe der DNA-Sequenz geschlossen werden konnte. Der Lauf erfolgte bei 80V für ca. 1 Stunde. Nach hinreichender Auftrennung der Banden wurde das Gel zur Dokumentation auf einen UV-Transilluminator (Biostep GmbH, Jahnsdorf, Deutschland) gelegt und mit einer Fotodokumentationsanlage (Intec, Albershausen Deutschland) fotografiert. Um die korrekte und exakte Größe der

DNA-Sequenzen zu bestimmen, wurden die Ergebnisse anschließend mit den vorgeschriebenen Größen auf der Webseite www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/ verglichen.

3.3.4.5 Quantitative real-time PCR

Bei der „real-time“-PCR wird nicht das Endprodukt, sondern die zunehmende Menge der PCR Produkte während des Verlaufs der Reaktion gemessen. Durch den Einsatz interkalierender Farbstoffe, die spezifisch an doppelsträngige DNA binden und nach Bestrahlung mit UV-Licht fluoreszieren, kann die Menge der während der PCR synthetisierten DNA gemessen werden. Da die Menge an doppelsträngiger DNA im Verlauf einer PCR zunimmt, kann von Zyklus zu Zyklus mehr Farbstoff gebunden werden und folglich mehr Fluoreszenz entstehen. Trägt man die Zunahme der Fluoreszenz gegen die Zykluszahl in einem Graphen auf, kann der Verlauf der DNA-Synthese während der PCR verfolgt werden.

In der vorliegenden Arbeit wurde der interkalierende Farbstoff SYBR-Green (absolute™ qPCR SYBR-Green® MIX, ABgene, United Kingdom) verwendet. Der Farbstoff wird durch einen Laser zur Fluoreszenz einer bestimmten Wellenlänge angeregt, die wiederum von einer Fozelle detektiert wird. Die Spezifität wird anhand einer Dissotiationskurve überprüft, indem das PCR Produkt nach dem letzten Zyklus durch langsame Erhitzung bis zum Schmelzpunkt denaturiert wird. Dadurch lassen sich die Längen der PCR Produkte sowie die Spezifität der Reaktion bestimmen. Für die Amplifikation des sogenannten *housekeeping* Gens GAPDH wurde die cDNA 1:200 und für die Zielgene 1:5 verdünnt. Pro Template wurde ein Mastermix entsprechend Tabelle 4 hergestellt. Die Amplifikation (Tabelle 5) wurde in Duplikaten im 7300-Real-Time PCR System (applied Biosystem, Weiterstadt, Deutschland) durchgeführt.

Tabelle 4: Mastermix

Reagenzien	Volumen
cDNA	10µl
Forward Primer	0,4µl
Reverse Primer	0,4µl
SYBR-Green Mastermix, enthält SYBR [®] Green Dye I, Thermo-Start [®]	20µl
DNA Polymerase, dNTPs und Puffer	
DEPC-Aqua bidest.	9,2µl
Endvolumen	40µl

Tabelle 5: Real-time PCR Programm

Schritt	Aktion	Inkubationszeit	Temperatur
1.		2 Min	50°C
2.	Denaturierung	15 Min	95°C
3.	Denaturierung	15 Sek	95°C
4.	Anlagerung	60 Sek	60°C
5.	40 Zyklen von Schritt 2-3		
6.	Denaturierung	15 Sek	95°C
7.	Anlagerung	30 Sek	60°C
8.	Denaturierung	15 Sek	95°C

3.4 Proteinchemische Methoden

3.4.1 Präparation von Proteinen mit der Hot Lysis Methode

Die Hot Lysis Technik stellt eine Methode der Proteingewinnung dar. Hierfür wurden zunächst je 2×10^5 /ml PAM 212 Zellen bzw. HaCaT Zellen auf 12 well Platten (Flacon BD, Heidelberg, Deutschland) ausgesät. 24 Stunden später wurde das Kulturmedium aspiriert und nach kurzem Waschen mit PBS durch 0% Medium ersetzt. Am darauf folgenden Tag erfolgte die Stimulation. Nach Ablauf der Stimulationszeit wurden die Zellen mit gekühltem PBS gewaschen und mit $35 \mu\text{l}$ 1×SDS-Probenpuffer versetzt, der vorab auf 95°C erwärmt wurde. Dieser setzte sich aus 1 ml 2×SDS-Probenpuffer (siehe Tabelle 6) und $100 \mu\text{l}$ Betamercaptoethanol zusammen, die 1:1 mit Wasser verdünnt wurden. Durch Zugabe des 1×SDS-Probenpuffers kam es zur Denaturierung der Proteine. Das nun zähflüssige Lysat wurde aufgenommen und in ein Eppendorf Reaktionsgefäße überführt. Nach fünfminütigem Ultraschallen in einem Wasserbad wurden die Proben für 8 Minuten bei 95°C inkubiert und anschließend auf Eis abgekühlt. Bis zum Gebrauch wurden die Proben bei -20°C gelagert.

Tabelle 6: Bestandteile 2× SDS-Ladepuffer

100mM TRIS pH 6,8	→ 1 ml von 1M Stammlösung
4% SDS	→ 4 ml von 10%iger Stammlösung
0,2% Bromphenol-Blau	→ 0,02 g
20% Glycerol	→ 2 ml von 100%iger Stammlösung
Auf 10 ml Wasser auffüllen	
Im Wasserbad bei 42°C lösen	
+ 10% β -Mercaptoethanol frisch dazugeben	

3.4.2 Nachweis von Proteinen mit Hilfe des Western-Blots

Mit Hilfe des Western Blots können Proteine nach Übertragung auf eine Trägermembran durch anschließende Antikörperbindung nachgewiesen werden.

Vor dem eigentlichen Western Blot wird ein Proteingemisch mit Hilfe einer Gel-Elektrophoresetechnik in einer Trägermatrix (z.B. SDS-Page) entsprechend ihrer Größe, Ladung oder anderer Eigenschaften aufgetrennt. Beim anschließenden Blotten wird ein senkrecht zum Gel gerichtetes elektrisches Feld angelegt, so dass die Proteine aus dem Gel auf eine Membran (z.B. Nitrocellulose) wandern. An der Membranoberfläche bleiben sie aufgrund hydrophober Wechselwirkungen haften, wobei das Muster der elektrophoretischen Auftrennung erhalten bleibt. Die Proteinbanden können nun auf der Membran mittels spezifischer Antikörper identifiziert werden.

3.4.2.1 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese nach Laemmli

Durch die vertikale Plattenelektrophorese werden Proteine nach der Methode von Laemmli (1970) in diskontinuierlichen SDS-Polyacrylamidgelen analysiert. Das Gel setzt sich aus einem großporigen Sammelgel und einem kleinporigen Trenngel zusammen. Die Konzentration des Gels wird anhand der Größe der zu untersuchenden Proteine bestimmt. Als Elektrophoresepuffer dient ein Tris-Glycin-Puffer. Die Proteine bewegen sich zwischen den schneller wandernden Chlorid-Ionen des Sammelgelpuffers und den langsamer wandernden Glycin-Ionen des Elektrophoresepuffers und werden dadurch in engen Banden im Sammelgel fokussiert. Wandern die Proben in das Trenngel ein, welches zusätzlich zur geringeren Porengröße eine höhere Salzkonzentration und einen höheren pH-Wert besitzt, werden die Proteine entsprechend ihrer molekularen Größe getrennt. Mit Hilfe von Markern, die auf dem Gel aufgetragen werden, können die Molekulargewichte der Proteine ermittelt werden.

Zunächst wurde das Trenngel entsprechend Tabelle 7 hergestellt und zwischen zwei mit Ethanol gereinigten Glassplatten gegossen, die in einem Gießstand eingespannt waren. Das Trenngel wurde nach dem Gießen mit 700µl Butanol überschichtet, um einer Verdunstung entgegenzuwirken und einen glatten Geloberrand zu erzeugen, der durch den Kapillareffekt behindert wird. Nach vollständiger Aushärtung des Gels wurde das Butanol abgegossen und ein Plastikamm eingesetzt, der die Taschen für die Proben bildete. Danach wurde das Trenngel blasenfrei mit dem Sammelgel (siehe Tabelle 7) überschichtet.

Nach vollständiger Polymerisation des Sammelgels wurden die Gelhalter aus dem Gießstand entfernt und in eine Elektrophoresekammer (BioRad Laboratories GmbH, München, Deutschland) gestellt, die mit einem Laufpuffer aufgefüllt wurde. Der Laufpuffer setzte sich aus 80ml 5× Tris-Glycin, 4ml 10% SDS und 316ml Wasser zusammen. Das 5× Tris-Glycin wurde vorab aus 75,5g TRIS und 470ml Glycin, die auf 5 l Wasser aufgefüllt wurden, angesetzt und autoklaviert. Anschließend wurden die Kämme entfernt und 10µl der jeweiligen Probe mit Hilfe von Gelloader Pipettenspitzen (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) aufgetragen. Zusätzlich zu den Proben wurden auf jedem Gel 6µl des Markers Page Ruler Pot Ruler (Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland) aufgetragen. Die Elektrophorese wurde bei 100V durchgeführt, bis die Bromphenolblau-Bande am unteren Rand des Gels angekommen war.

Tabelle 7: Pipettierschema für Trenn- und Sammelgel

Komponenten	Trenngel (10%)	Sammelgel (5%)
H ₂ O	4,0 ml	1,4 ml
30% Acrylamid mix	3,3 ml	0,33 ml
1,5 M Tris (pH 8,8)	2,5 ml	
1,0 M Tris (pH 6,8)		0,25 ml
10% SDS	0,1 ml	0,02 ml
10% Ammonium persulfat	0,1 ml	0,02 ml
TEMED	0,004 ml	0,002 ml

3.4.2.2 Blotting

Nach der Elektrophorese wurden die Proteine auf eine Nitrocellulose Membran (Amersham Bioscience, Freiburg, Deutschland) transferiert. Zunächst wurde der Blotting Puffer, bestehend aus 100ml 5× Tris-Glycin, 100ml Methanol und 300ml Wasser, angesetzt. Anschließend wurde das Gel vorsichtig von den Glasscheiben gelöst, das Sammelgel abgetrennt und verworfen und das verbliebene Trenngel zusammen mit zurechtgeschnittenen Whatman®-Papier-Streifen (Whatman GmbH, Dassel Deutschland) und der Nitrocellulose Membran im Blotting Puffer äquilibriert. Drei Lagen Whatman®-Papier, die Nitrocellulose-Membran, das Gel und drei weitere Lagen Whatman®-Papier

wurden in der Blotting Kammer (Karl Roth, Karlsruhe, Deutschland) übereinander geschichtet. Dabei war darauf zu achten, dass die Filterpapiere, die Membran und das Gel exakt aufeinander lagen, so dass der Strom durch die gesamte Fläche des Blots fließen konnte. Eventuell auftretende Luftblasen wurden zur Gewährleistung eines erfolgreichen Transfers vorsichtig ausgestrichen. Der Elektrotransfer erfolgte bei 50A pro Gel für eine Stunde.

3.4.2.3 Blocking

Nach dem Transfer wurde die geblottete Membran 5 Minuten mit TBS-T gewaschen und anschließend mit dem Blocking Puffer, bestehend aus 5%igem Magermilchpulver in TBS-T, für eine Stunde inkubiert, um freie Bindungsstellen auf der Membran zu blockieren. Anschließend wurde der Erstantikörper mit dem Blocking Puffer auf den Blot gegeben und über Nacht bei 4°C inkubiert. Als Erstantikörper wurden die Phospho-p44/42 MAPK, die Phospho-p38 MAPK (beide Cell signalling, Boston, USA) und der β -Aktin Antikörper verwendet, welche in dem Blocking Puffer 1:2000, 1:1000 und 1:2000 verdünnt wurden. Am folgenden Tag wurde der Blot dreimal für je 5 Minuten mit TBS-T gewaschen und der Peroxidase-gekoppelte Sekundärantikörper, welcher gegen die Spezies des jeweiligen Erstantikörpers gerichtet war, nach vorheriger 1:2000-facher Verdünnung im Blocking Puffer, auf den Blot gegeben. Nach 1 ½-stündiger Inkubation bei Raumtemperatur folgten drei Waschvorgänge mit TBS-T für 10 Minuten. Zuletzt wurde die Membran für 5 Minuten mit dem ECL-Chemiluminescent-Reagent (Amersham Bioscience, Freiburg, Deutschland) inkubiert, der kurz vorher entsprechend der Herstellerangaben vorbereitet wurde. Dieses Reagenz aktiviert die an dem zweiten Antikörper gekoppelte Peroxidase, wodurch Licht der Wellenlänge 428nm ausgesendet wird. Danach wurde in der Dunkelkammer für 15-30 Minuten ein Film auf die Membran gelegt und dieser entwickelt.

4 Ergebnisse

4.1 TLR-Genexpression auf Keratinozyten

4.1.1 Untersuchungen an unstimulierten Zellen

Zunächst wurde an der unstimulierten Keratinozytenzelllinie PAM 212 die TLR-Expression charakterisiert. Die Zellen wurden bis zur 80-90%igen Konfluenz herangezogen. Es folgte die Isolierung der Gesamt-RNA und eine anschließende Reverse Transkription in cDNA. Die cDNA wurde mit Hilfe von Primern, die gegen die DNA-Sequenzen der TLRs 1-9 gerichtet waren, in der PCR amplifiziert. Anschließend erfolgte die elektrophoretische Auftrennung in einem Agarosegel. Als Kontrolle wurde die cDNA LPS-stimulierter Knochenmarksgenerierter dendritischer Zellen verwendet. Als Negativkontrolle diente Wasser und die RNA der PAM 212 Zellen.

Abbildung 1 zeigt, dass die Zellen die TLRs 1 und 4 deutlich, TLR 2 mäßig und TLR 6 schwach exprimieren. Die TLRs 3, 5, 7, 8 und 9 wurden, wie in Abbildung 2 erkennbar, nicht in den Zellen exprimiert.

Durch Vergleich der Banden mit dem Gene-Ruler konnte auf die relative Länge geschlossen werden. Darüber hinaus wurden die Banden mit der in der Datenbank <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> angegebenen Länge der cDNA verglichen.

Eine Untersuchung der TLR-Expression in unstimulierten HaCaT-Zellen erfolgte nicht, da die Expression der TLRs 2, 3, 4, 5 und 10 schon in der Literatur beschrieben war [170].

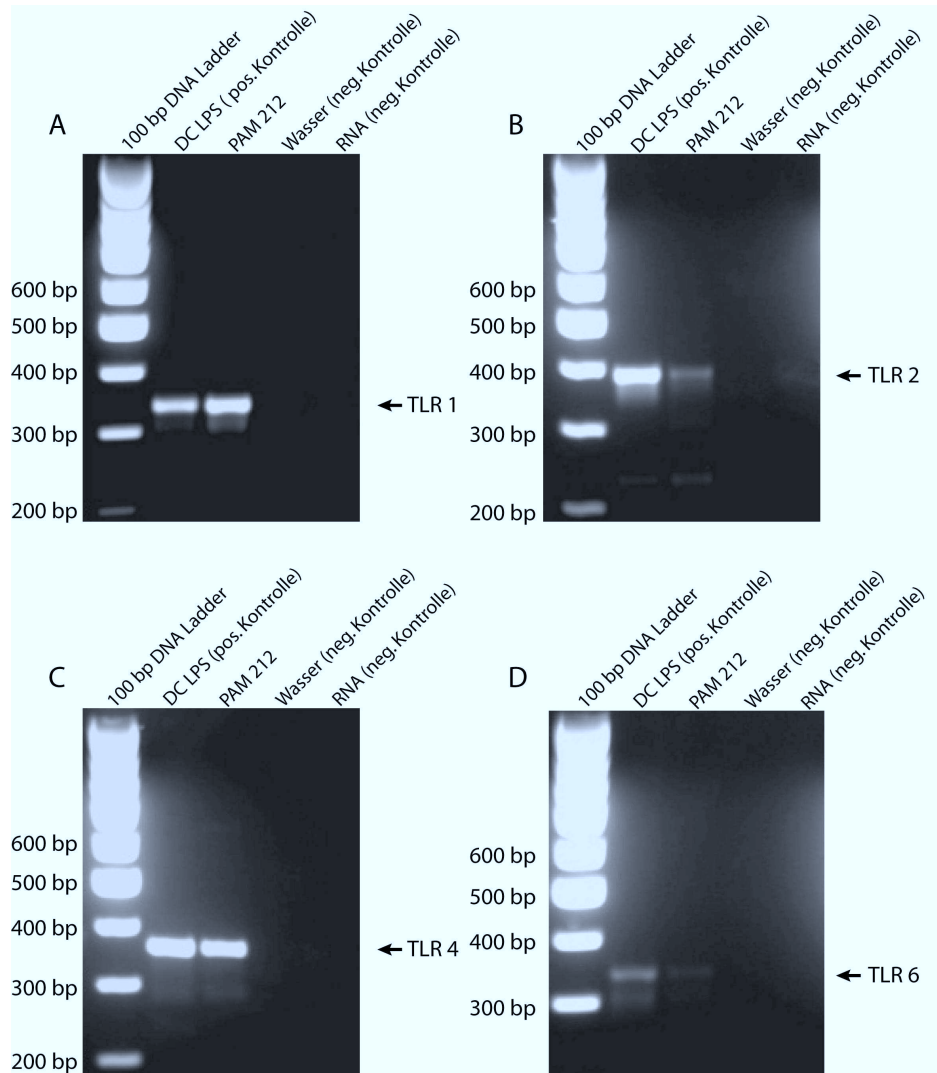


Abbildung 1. Expression von Toll-like Rezeptoren in muriner Keratinozytenzelllinie PAM 212.

Mittels RT-PCR wurden die DNA-Abschnitte der TLRs 1 (A), 2 (B), 4 (C) und 6 (D) amplifiziert und anschließend in einem Agarosegel aufgetrennt. Als Kontrolle wurde die cDNA LPS-stimulierter knochenmarksgenerierter dendritischer Zellen, als negative Kontrolle Wasser und die RNA der PAM 212 verwendet. Dreimalige Wiederholungen des Versuches zeigten ähnliche Ergebnisse.

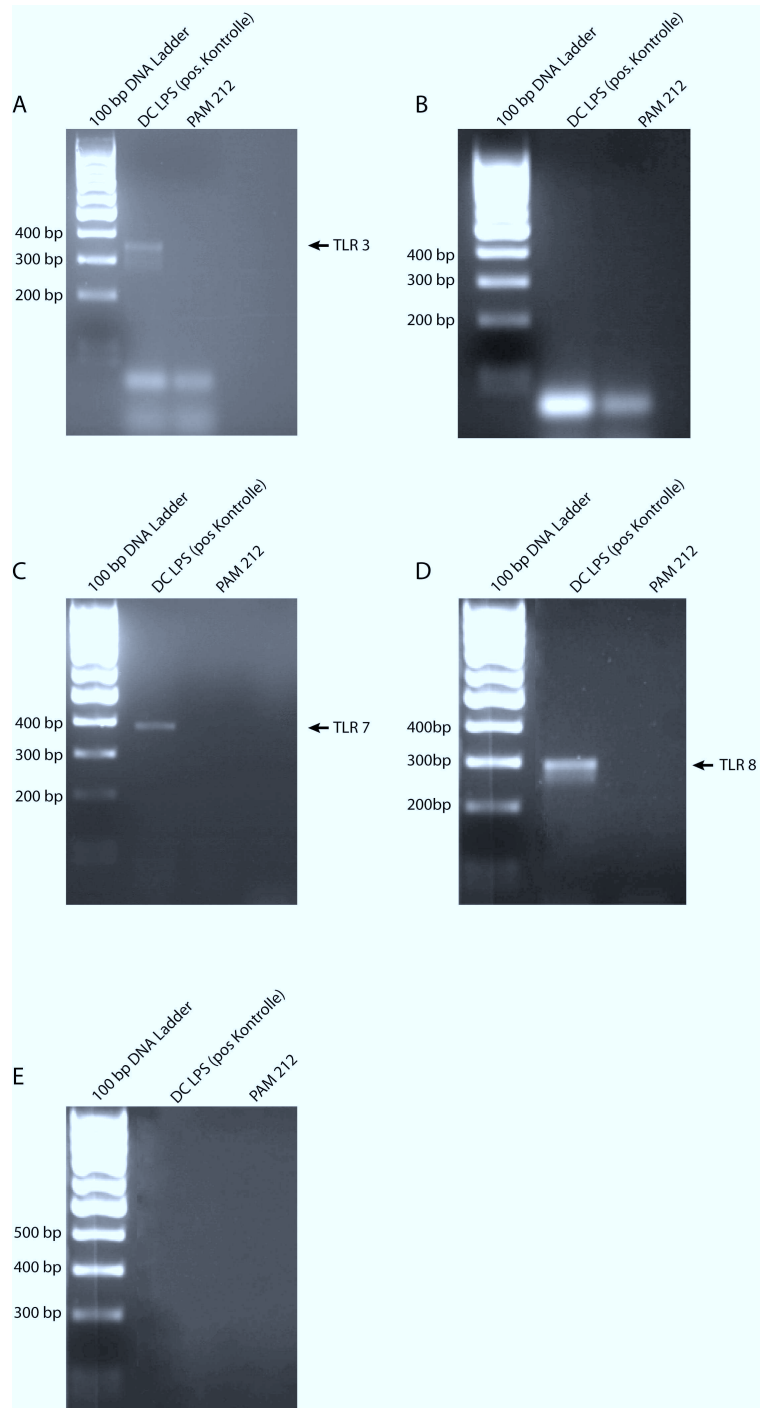


Abbildung 2. fehlende Expression der TLR 3, 5, 7, 8 und 9 in muriner Keratinozytenzelllinie PAM 212.

Die RNA der PAM 212 Zellen wurde nach der Transkription in cDNA mittels Primer, die gegen die DNA-Sequenzen der Toll-like Rezeptoren 3 (A), 5 (B), 7 (C), 8 (D) und 9 (E) gerichtet sind, amplifiziert und in einem Agarosegel aufgetrennt. Als Kontrollen dienten auch hier die cDNA LPS-stimulierter knochenmarksgenerierter dendritischer Zellen und die RNA der PAM 212 Zellen. Auch dieser Versuch wurde dreimal wiederholt und wies das gleiche Ergebnis auf.

4.1.2 Der Einfluss von Entzündungsstimuli auf die TLR 4 Expression

In einem zweiten Versuch wurde nach dem Einwirken von Entzündungsstimuli die Expression der TLR 4 mRNA in den PAM 212 Zellen quantitativ bestimmt. Die Zellen wurden hierfür mit LPS (500ng/ml) und IL-1 (10ng/ml) für sechs bzw. zwölf Stunden stimuliert. Als Kontrolle dienten unstimulierte Zellen. Nach RNA Präparation und reverser Transkription wurde die Genexpression der TLR 4 mRNA mittels real-time PCR bestimmt.

Wie in Abbildung 3 ersichtlich, war nach sechsständiger Stimulation festzustellen, dass IL-1 und LPS zu einer ca. 7-fach erhöhten Genexpression der TLR 4 mRNA führten. In Relation zur Kontrolle war nach zwölfständiger Stimulation keine erhöhte Genexpression mehr nachweisbar.

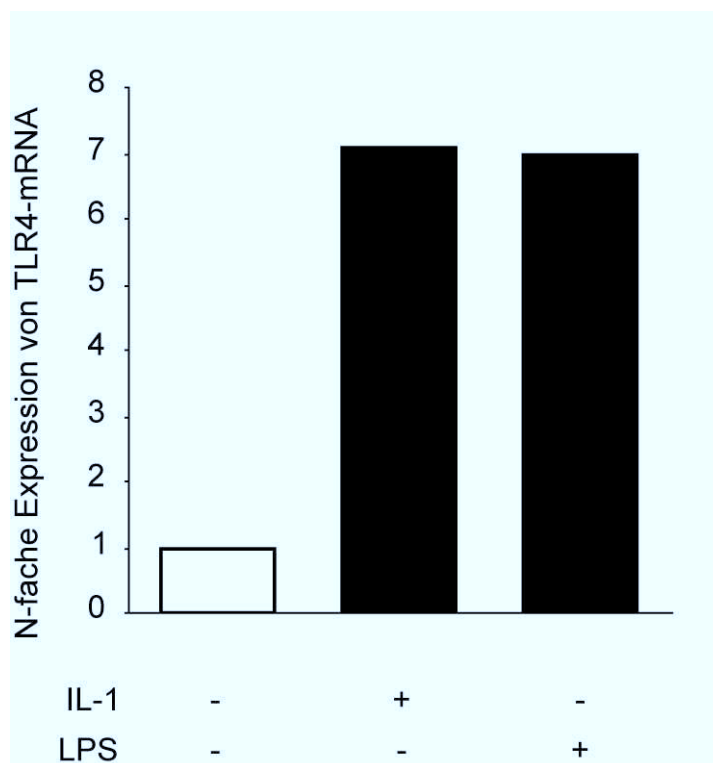


Abb 3: Expression von TLR 4 mRNA nach sechsständiger Stimulation mit IL-1 und LPS.

Nach sechsständiger Stimulation mit IL-1 bzw. LPS, anschließender RNA-Präparation und reverser Transkription wurde quantitativ in der real-time PCR die Expression der TLR 4 mRNA bestimmt. Zu beachten sei die unterschiedliche Skalierung. Das Ergebnis ließ sich in drei Wiederholungen des Versuches bestätigen.

4.2 Funktionelle Wirkung von TLRs

Um nun nicht nur die Expression der TLRs, sondern auch deren funktionelle Wirkung nachzuweisen, wurde in den folgenden Versuchen die Aktivität typischer Proteine der TLR Signalkaskade sowie die Expression proinflammatorischer Zytokine nach Stimulation mit TLR-Liganden bestimmt.

4.2.1 TLR-Liganden modulieren die Expression inflammatorischer Zytokine

Mit diesem Versuch wurde durch quantitative Bestimmung der Zytokinexpression (IL-8, IL-6 und CXCL-2) untersucht, ob eine TLR-vermittelte Entzündungsreaktion auf Zytokinebene nachweisbar ist.

4.2.1.1 Expression von Zytokinen in humanen HaCaT Zellen

In den HaCaT Zellen wurde die Expression der Zytokine IL-8 und IL-6 verifiziert. Da bereits die Expression der TLRs 2, 3, 4, 5 und 10 in HaCaT Zellen beschrieben wurde, dienten die Liganden IL-1 (10ng/ml), Flagellin (1µg/ml), LPS (500ng/ml), Pam₃Cys (5µg/ml) und Poly (I:C) (20µg/ml) als Entzündungsstimuli. Nach sechsstündiger Stimulation, RNA-Präparation und reverser Transkription erfolgte die quantitative Untersuchung der IL-6 und IL-8 Transkriptate mittels real-time PCR. Die Ergebnisse wurden zu einer unstimulierten Kontrolle in Relation gesetzt.

Abbildung 4 zeigt, dass alle Stimulantien, wenn auch unterschiedlich stark, zu einer erhöhten Expression von IL-6 mRNA in den HaCaT Zellen führen. Poly (I:C) stellte mit einer ca. 120-fach erhöhten Expression den stärksten induzierenden Liganden dar. Die Stimulationen mit IL-1, Flagellin und Pam₃Cys führten zu einer ca. 4- bis 5-fachen Erhöhung der Expression im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle. Die Inkubation mit LPS hingegen bewirkte nur einen mäßigen 1,6-fachen Anstieg der IL-6 Expression.

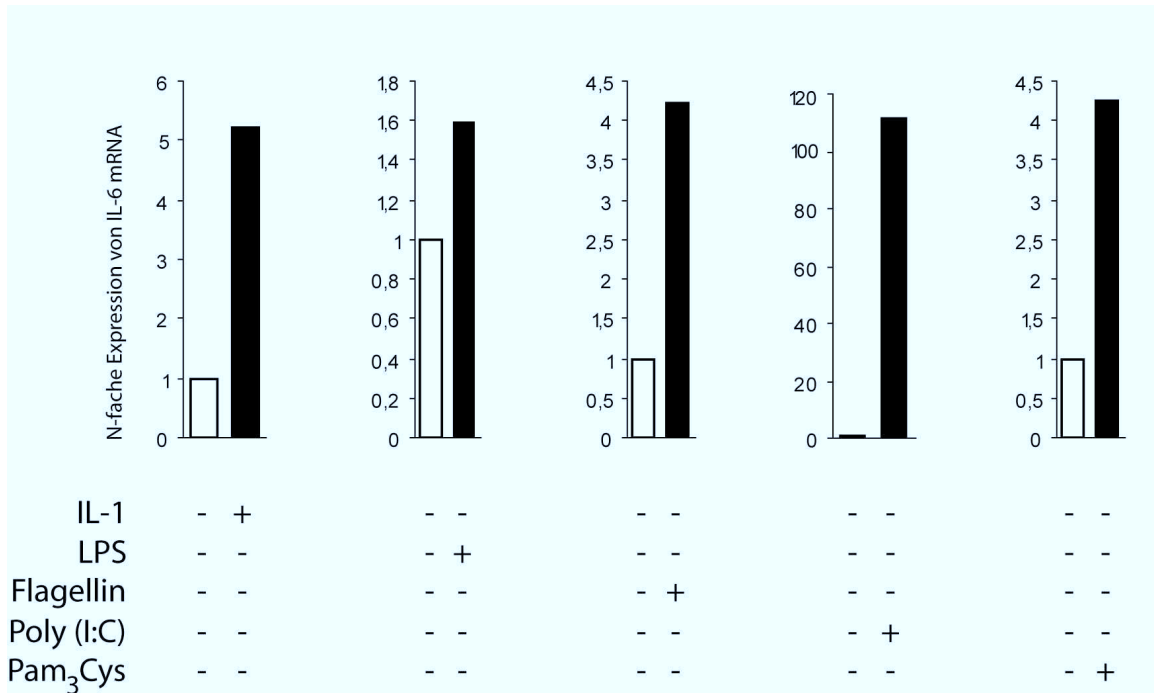


Abbildung 4: Expression von IL-6 mRNA nach Inkubation mit den Stimulantien in Relation zur unstimulierten Kontrolle.

Mittels real-time PCR wurde nach der Stimulation mit diversen Liganden die Expression von IL-6 mRNA in den HaCaT Zellen bestimmt. Die Versuche wurden in Duplikaten durchgeführt. Gezeigt ist ein exemplarischer Versuch von Dreien mit ähnlichem Ergebnis. Zu beachten sei die unterschiedliche Skalierung.

Auch bei Untersuchung der IL-8 mRNA (Abb. 5) fiel auf, dass alle Stimulantien induzierend auf die Genexpression wirkten. Es zeigte sich ein starker Anstieg (ca. 130-fach) im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle nach Stimulation mit IL-1. Poly (I:C) führte zu einer ca. 55-fachen und Flagellin zu einer ca. 42-fachen Erhöhung der IL-8 mRNA. Nach Inkubation mit Pam₃Cys kam es zu einer ca. 15-fach erhöhten Expression von IL-8 mRNA. Als schwächster Induktor stellte sich LPS mit einer ca. 1,7-fach erhöhten Expression heraus.

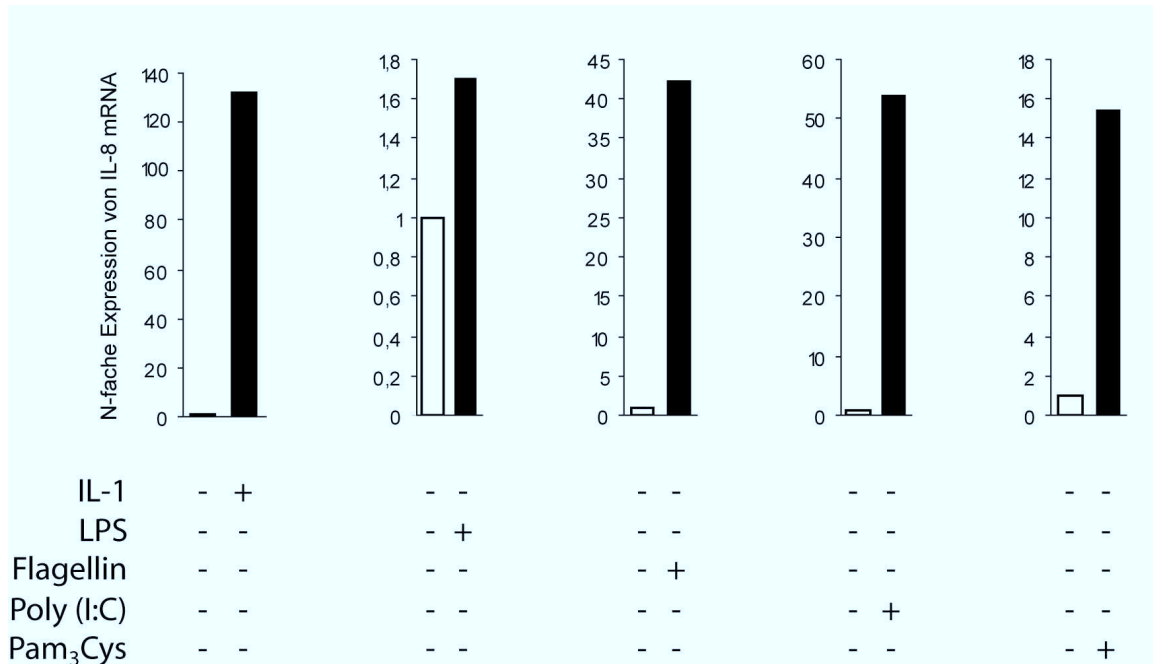


Abbildung 5: Expression von IL-8 mRNA nach Stimulation mit den Liganden im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle.

Nach der Stimulation mit den oben genannten Liganden erfolgte die quantitative Bestimmung der Expression von IL-8 mRNA in den HaCaT Zellen. Auch hier wurden die Ergebnisse in Duplikaten gemessen. Die Abbildung spiegelt drei Versuche mit ähnlichem Resultat wider. Zu beachten sei auch hier die unterschiedliche Skalierung.

4.2.1.2 Expression von Zytokinen in PAM 212 Zellen

In den PAM 212 Zellen wurde die Expression des Chemokins CXCL-2 (murines Gro- α Analogon) untersucht. Nach vorheriger sechsstündiger Stimulation mit IL-1 (10ng/ml), LPS (500ng/ml) und Pam₃Cys (5 μ g/ml) und anschließender reverser Transkription erfolgte die Amplifikation und quantitative Bestimmung der Transkriptate mittels real-time PCR.

Abbildung 6 zeigt, dass LPS eine etwa 5-fache Erhöhung der CXCL-2-mRNA Expression induzierte. Im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle führte Pam₃Cys zu einer ca. 4-fach erhöhten Expression von CXCL-2-mRNA. Nach Stimulation mit IL-1 kam es hingegen nur zur Verdopplung der CXCL-2 Expression.

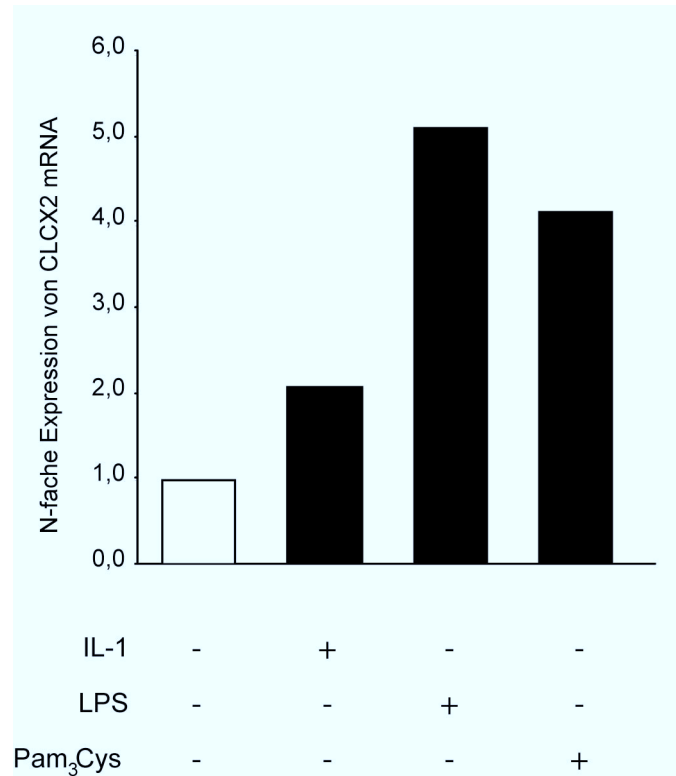


Abbildung 6: Expression von CXCL-2 mRNA in den PAM 212 Zellen

Nach sechsstündiger Stimulation mit IL-1, LPS bzw. Pam₃Cys, RNA Präparation und reverser Transkription erfolgte die quantitative Bestimmung der CXCL-2 mRNA in Duplikaten. Gezeigt ist ein exemplarischer Versuch von Zweien mit übereinstimmendem Ergebnis.

4.2.2 TLR-induzierte Aktivierung des Transkriptionsfaktors Nf-κB

In diesem Versuch wurde überprüft, ob nach Stimulation mit den TLR-spezifischen Liganden eine Nf-κB-Translokation in den Zellkern und damit eine Aktivierung des Transkriptionsfaktors stattfindet.

Die PAM 212 Zellen bzw. die HaCaT Zellen wurden mit LPS (500ng/ml), Flagellin (1µg/ml), Poly (I:C) (20µg/ml) und Pam₃Cys (5µg/ml) für 30 Minuten stimuliert. Als Positivkontrolle wurde jeweils ein well mit murinem bzw. humanem IL-1 (10ng/ml) inkubiert. Als Negativkontrolle dienten unstimulierte Zellen. Um eine spezifische Bindung des zweiten Antikörpers an den ersten nachzuweisen und eine Eigen-Fluoreszenz auszuschließen, wurden zwei wells nicht mit dem ersten bzw. dem ersten und zweiten Antikörper inkubiert. Der unter Kapitel 3.2.1 beschriebene Versuchsablauf wurde eingehalten. Durch den

Vergleich der Alexa Fluor® 488 Färbungen mit der Zellkernfärbung DAPI konnte die Lokalisation des Transkriptionsfaktors Nf-κB ermittelt werden.

Bei Untersuchung der PAM 212 Zellen (siehe Abbildung 7) wurde deutlich, dass abgesehen von IL-1 keiner der angewendeten Stimulantien eine Nf-κB-Translokation in den Zellkern induzieren konnte. Beim Vergleich der Färbungen war erkennbar, dass sich der Transkriptionsfaktor im Zytosol bzw. an der äußeren Membran des Nukleus befand.

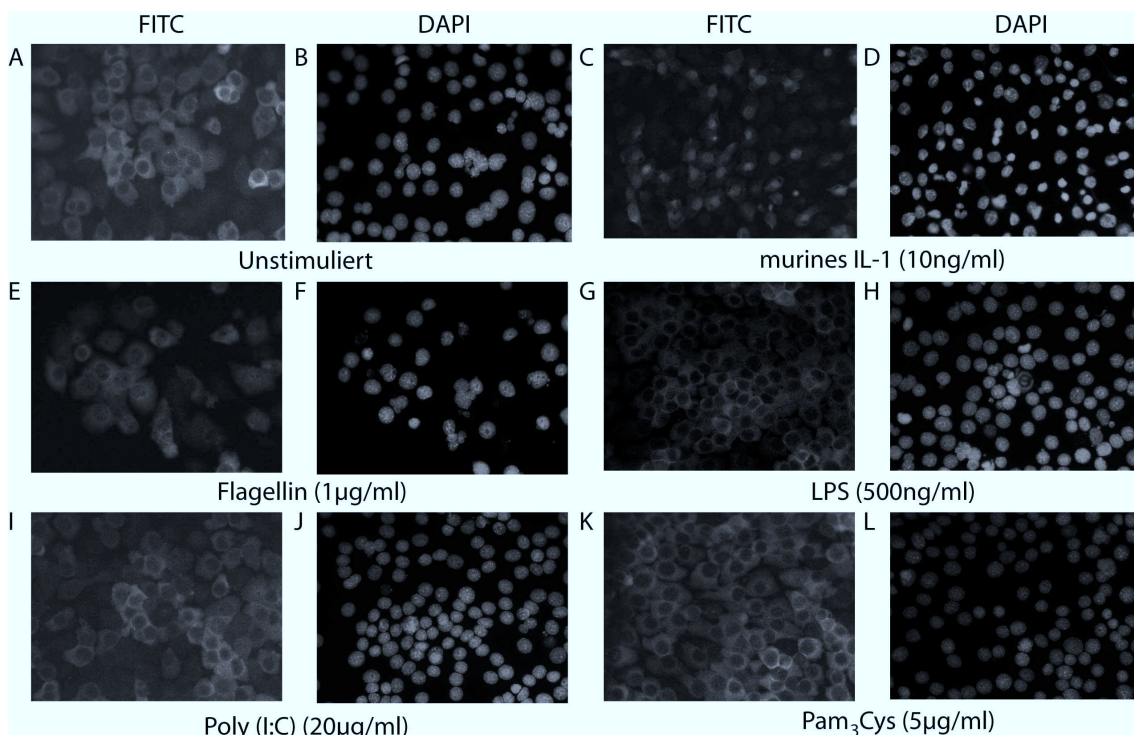


Abbildung 7: Immunhistologische Untersuchung der Nf-κB-Translokation nach der Stimulation mit TLR-spezifischen Liganden in der Keratinozytenzelllinie PAM 212.

Nach 30-minütiger Stimulation mit Flagellin (E, F), LPS (G, H), Poly I:C (I, J) und Pam₃Cys (K, L), wurden die Zellen mit Paraformaldehyd fixiert und mit Methanol permeabilisiert. Die Detektion von Nf-κB erfolgte über den Antikörper Nf-κB p65, welcher durch den FITC konjugierten Sekundärantikörper Alexa Fluor® 488 (A, C, E, G, I, K) gebunden wurde. Zur genauen Lokalisation des Zellkerns wurde eine Färbung mit DAPI (B, D, F, H, J, L) angefertigt. Als Negativkontrolle wurden unstimulierte (A, B), als Positivkontrolle mit IL-1 stimulierte Zellen (C, D) verwendet. Der Versuch wurde fünf Mal mit demselben Ergebnis wiederholt.

Hingegen war bei der Untersuchung der HaCaT-Zellen (Abbildung 8) nach Stimulation mit Flagellin eine klare Translokation von Nf- κ B ersichtlich. Alle weiteren Liganden induzierten jedoch auch in den HaCaT Zellen keine Translokation.

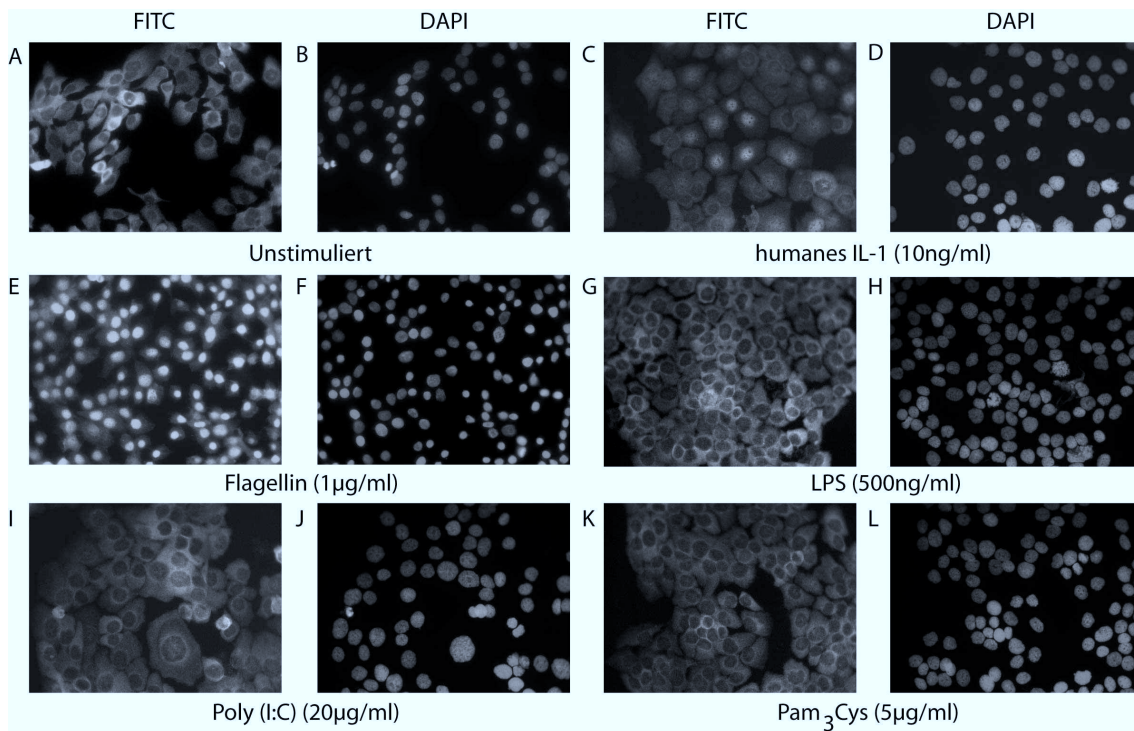


Abbildung 8: Nf- κ B-Translokation nach der Stimulation mit TLR-spezifischen Liganden in der Keratinozytenzelllinie HaCaT.

Nach 30-minütiger Stimulation mit Flagellin (E, F), LPS (G, H), Poly I:C (I, J) und Pam₃Cys (K, L), wurden die Zellen fixiert, permeabilisiert und mit dem Erstantikörper Nf- κ B p65 inkubiert. Dieser wurde durch den Zweitantikörper Alexa Fluor® 488 gebunden (A, C, E, G, I, K). Zur genauen Lokalisation des Nukleus wurde eine Zellkernfärbung mit DAPI (B, D, F, H, J, L) angefertigt. Als Negativkontrolle wurden unstimulierte (A, B), als Positivkontrolle mit IL-1 stimulierte Zellen (C, D) verwendet. Gezeigt ist ein exemplarischer Versuch von Dreien mit identischem Ergebnis.

4.2.3 TLR-Liganden aktivieren die MAP-Kinasen p38 und ERK 1/2

Um eine funktionelle Signaltransduktion von Toll-like Rezeptoren nachweisen zu können, wurden mit Hilfe des Western Blots die Aktivierungszustände der MAP-Kinasen p38 und ERK 1/2 untersucht.

Zunächst erfolgte die Untersuchung an den PAM 212 Zellen. Die Zellen wurden 24 Stunden nach der Aussaat für 30 Minuten mit LPS (500ng/ml), Flagellin (1µg/ml), Poly (I:C) (20µg/ml), Pam₃Cys (5µg/ml) und IL-1 (10ng/ml) stimuliert. Die Proteine wurden mit Hilfe der Hot Lysis Methode gewonnen, entsprechend der Methode nach Laemmli in einem SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine Nitrocellulosemembran transferiert. Die Detektion von ERK 1/2 und p38 erfolgte über Phospho-p44/42 MAPK und Phospho-p38 MAP Kinase (Cell Signaling Technology).

Wie in Abbildung 9 anhand der deutlichen Bande der unstimulierten Kontrolle ersichtlich, liegt in den PAM 212 Zellen eine Grundaktivität von ERK 1/2. Die Stimulationen mit LPS, Flagellin und Poly (I:C) scheinen diese Grundaktivität zu inhibieren. Pam₃Cys scheint leicht stimulierend auf die Aktivität der MAP-Kinasen ERK 1/2 zu wirken. Ebenso erhöht IL-1, wenn auch nur moderat, die Phosphorylierung von ERK 1/2 im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle.

Untersuchungen hinsichtlich einer möglichen TLR-induzierten Aktivierung von p38 lieferten keine Ergebnisse.

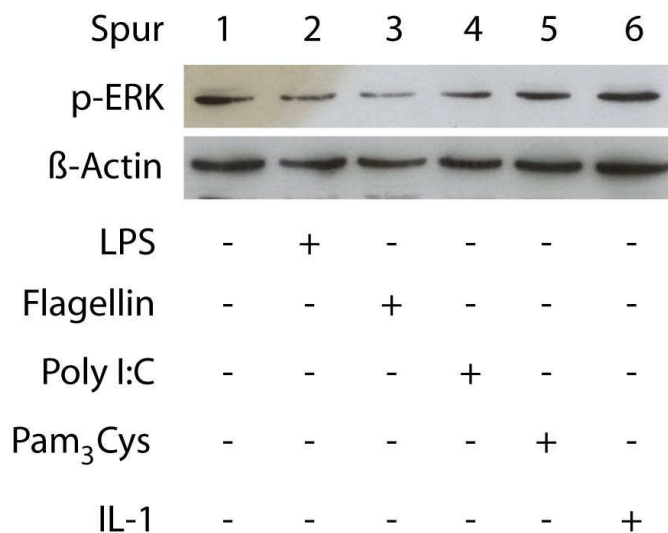


Abbildung 9. Protein Expression von ERK 1/2 in der Keratinozytenzelllinie PAM 212.

Die Zellen wurden für 30 Minuten mit den Liganden stimuliert. Die Detektion von ERK1/2 erfolgte über Phospho-p44/42 MAPK. Die Bestimmung von β-Actin wurde zur Überprüfung gleicher Proteingehalte durchgeführt. Der Versuch wurde ein zweites Mal wiederholt und zeigte ein ähnliches Ergebnis.

Im Anschluss wurden die HaCaT Zellen im Hinblick auf eine TLR-induzierte Aktivierung der MAP-Kinasen untersucht. Auch bei diesem Versuch wurden die Zellen mit LPS (500ng/ml), Flagellin (1µg/ml), Poly (I:C) (20µg/ml), Pam₃Cys (5µg/ml) und IL-1 (10ng/ml) für 30 Minuten stimuliert. Es wurde dem gleichen Versuchsablauf gefolgt wie bei den PAM 212 Zellen. Wie in Abbildung 10A zu erkennen ist, lag keine detektierbare Grundaktivität von p38 in den HaCaT Zellen vor. LPS, Poly (I:C) und Pam₃Cys führten nach 30-minütiger Stimulation nicht zur Phosphorylierung von p38. Flagellin und IL-1 hingegen schienen p38 zu aktivieren. Bei Untersuchung von ERK 1/2 (Abb. 10B) war eine leichte Grundaktivität in den HaCaT Zellen feststellbar. Die Stimulationen mit LPS und Poly (I:C) schienen die Aktivität nicht maßgeblich zu verändern. Pam₃Cys erzeugte eine leichte Erhöhung des Aktivierungsstatus von ERK 1/2. Ein deutlich erhöhter Phosphorylierungsstatus war nach Inkubation mit Flagellin und IL-1 erkennbar.

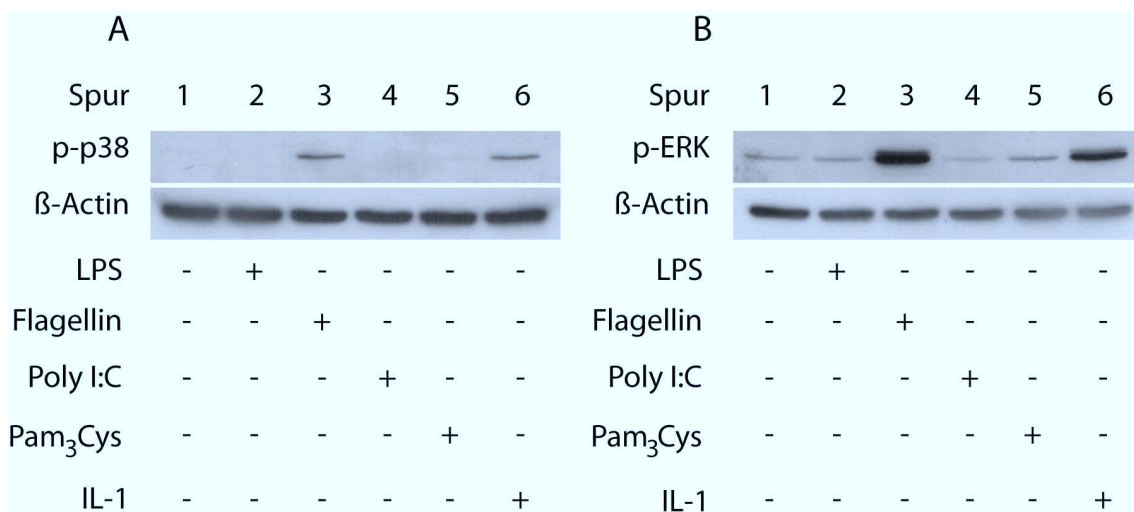


Abbildung 10. Liganden-induzierte Aktivierung von ERK 1/2 und p38 in der humanen Keratinozytenzelllinie HaCaT.

Die Stimulationsdauer mit den angegebenen Substanzen betrug 30 Minuten. Die aktivierten Proteine p38 (A) bzw. ERK 1/2 (B) wurden durch die Phospho-p38 MAP Kinase bzw. die Phospho-p44/42 MAPK gebunden. Um gleichmäßige Proteingehalte nachweisen zu können, erfolgte nach dem Strippen der Membran die Bestimmung von β-Aktin. Das dargestellte Ergebnis ließ sich nach dreimaliger Wiederholung des Versuches bestätigen.

Nachfolgend wurde eine zeitkinetische Untersuchung des Phosphorylierungsstatus von ERK 1/2 und p38 nach Stimulation mit LPS (500ng/ml), Pam₃Cys (5µg/ml) und Flagellin (1µg/ml) in den HaCaT Zellen durchgeführt (siehe Abb. 11). Die Stimulationszeiten betragen 30 Minuten, 60 Minuten, 120 Minuten, 180 Minuten und 6 Stunden. Auch hier wurden die Proteine mit der Hot Lysis Methode gewonnen, in einem SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und auf eine Nitrocellulose-Membran übertragen. Die Detektion von ERK 1/2 und p38 erfolgte abermals durch die Antikörper Phospho-p38 MAP Kinase bzw. Phospho-p44/42 MAPK.

Die Untersuchung ergab, dass LPS eine Phosphorylierung von p38 nach 180 Minuten und eine Aktivierung von ERK 1/2 nach 60 Minuten induzierte. Der Aktivierungsstatus blieb über die weitere Stimulationszeit relativ konstant. Nach Stimulation mit Pam₃Cys war eine verstärkte Aktivierung von p38 nach 180 Minuten sichtbar, die bis zum Maximum von 6 Stunden konstant blieb. Eine Phosphorylierung von ERK 1/2 war nach 120 Minuten zu verzeichnen und nahm bis zur maximalen Stimulationszeit stetig zu. Die Inkubation mit Flagellin zeigte hingegen einen abnehmenden Aktivierungszustand von ERK 1/2 und p38, wobei das Maximum der Aktivität bei 30-minütiger Stimulation lag. Nach 180 Minuten war kein Unterschied zur unstimulierten Kontrolle mehr sichtbar.

– Ergebnisse –

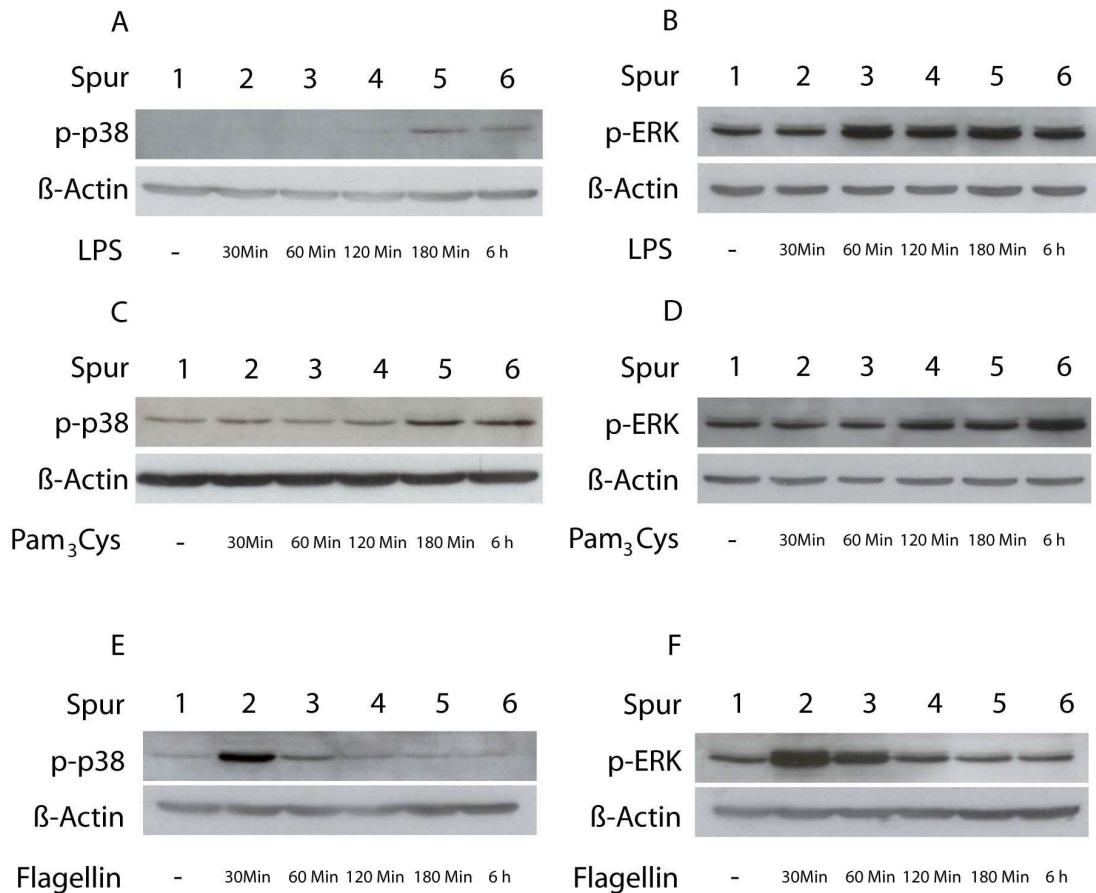


Abbildung 11. Zeitkinetische Untersuchung der Aktivierung von p38 bzw. ERK 1/2 in der Keratinozytenzelllinie HaCaT.

Die Zellen wurden entsprechend der Zeitangaben mit LPS (500ng/ml), Pam₃Cys (5µg/ml) und Flagellin (1µg/ml) stimuliert. Die Detektion von p38 bzw. ERK 1/2 erfolgte mittels der Antikörper Phospho-p38 MAP Kinase bzw. Phospho-p44/42 MAPK, die anschließend durch einen Peroxidase gekoppelten Antikörper gebunden wurden. Gezeigt ist ein exemplarisches Ergebnis von drei Versuchen.

4.2.4 Modulation der Liganden-induzierten Expression von IL-8 mRNA nach Inhibition von ERK 1/2 und p38 in den HaCaT Zellen

Da in den HaCaT Zellen die Flagellin-induzierte Aktivierung von ERK 1/2 und p38 in den vorangegangenen Versuchen nachgewiesen werden konnte, galt es nun den Einfluss der MAP-Kinasen auf die Zytokinexpression festzustellen.

Für diesen Versuch wurden die Zellen 30 Minuten vor der eigentlichen Stimulation mit dem ERK 1/2 Inhibitor PD 98059 bzw. dem p38 Inhibitor SB 203580 inkubiert. Nach anschließender sechsständiger Stimulation mit

Flagellin, RNA Präparation und reverser Transkription erfolgte die quantitative Bestimmung der IL-8 mRNA.

Auch in diesem Versuch (Abb. 12) war zu erkennen, dass Flagellin im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle zu einer deutlich erhöhten Expression von IL-8 mRNA führt. Durch Koinkubation mit den Inhibitor PD 98059 bzw. SB 203580 ließ sich die Flagellin-induzierte IL-8 Expression um ca. 20% bzw. 30% inhibieren. Die Koinkubation beider Inhibitoren mit Flagellin bewirkte eine um ca. 60% verminderte Expression von IL-8 mRNA. Somit scheinen die MAPK ERK 1/2 und p38 wesentlich an der Flagellin-induzierten Produktion von IL-8 beteiligt zu sein.

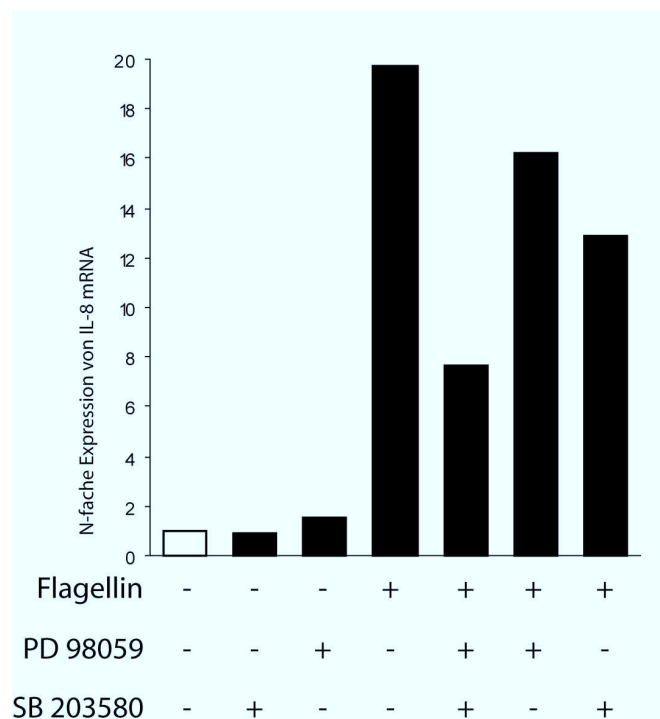


Abbildung 12: Inhibition der Flagellin-induzierten Expression von IL-8 mRNA durch die MAP-Kinasen Inhibitoren PD 98059 und SB 203580.

30 Minuten vor der Stimulation mit Flagellin wurden die HaCaT Zellen mit den Inhibitoren PD 98059 und SB 203580 inkubiert. Die quantitative Expression von IL-8 mRNA wurde in Duplikaten in der real-time PCR bestimmt. Gezeigt ist ein Versuch von Dreien mit ähnlichem Ergebnis.

4.3 Modulation der TLR-spezifischen Entzündungsreaktion durch die cAMP-Signalkaskade

Nachdem vorab die Expression und die Funktionalität der TLRs bestimmt wurde, galt es in den folgenden Versuchen den Einfluss der immunmodulierenden Substanz cAMP auf die TLR-vermittelte Entzündungsreaktion zu verifizieren. Die Wirkung von cAMP wurde durch das Analogon db-cAMP sowie den Adenylatzyklaseaktivator Forskolin immitiert.

4.3.1 db-cAMP und Forskolin beeinflussen die TLR-induzierte Zytokinexpression

Um den Einfluss von db-cAMP und Forskolin auf die TLR-induzierte Zytokinexpression zu untersuchen, wurden beide Zelllinien für 6 Stunden sowohl einzeln mit db-cAMP (1000 μ M), Forskolin (10 μ M) und diversen Liganden (LPS (500ng/ml), Flagellin (1 μ g/ml), Poly (I:C) (20 μ g/ml), Pam₃Cys (5 μ g/ml)) als auch in den Kombinationen aus db-cAMP bzw. Forskolin und den jeweiligen Liganden inkubiert. Nach RNA Präparation und reverser Transkription in cDNA erfolgte erneut die quantitative Bestimmung der IL-6 und IL-8 bzw. CXCL-2 und TLR 4 Transkriptate.

Bei Untersuchung der PAM 212 Zellen fiel auf, dass db-cAMP einen stimulatorischen Effekt sowohl auf die CXCL-2 als auch auf die TLR 4 Expression hat. Hingegen kam es nach Inkubation mit Forskolin zu einer verminderten Expression von CXCL-2 und TLR 4 im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle. Die Koinkubation mit den Liganden LPS und Pam₃Cys brachte hervor, dass db-cAMP und Forskolin eine inhibierende Wirkung auf die LPS-induzierte TLR 4 und die LPS- bzw. Pam₃Cys-vermittelte CXCL-2 Expression ausübten. Diese Ergebnisse können jedoch nicht als gesichert anerkannt werden, da die Versuche nicht hinreichend wiederholt worden sind. Sie sollen daher eher eine Tendenz aufzeigen.

Die Untersuchung der HaCaT Zellen ergab, dass Forskolin und db-cAMP keinen reproduzierbaren inhibitorischen oder stimulatorischen Einfluss auf die Expression von IL-6 und IL-8 mRNA in ruhenden HaCaTs haben. In

Kombination mit den Liganden (LPS, Poly (I:C), Flagellin und Pam₃Cys) zeigte sich allerdings, dass sowohl db-cAMP als auch Forskolin stimulierend auf die Liganden-induzierte IL-6 Expression wirken. Die TLR-vermittelte IL-8 Expression schien hingegen durch db-cAMP und Forskolin inhibiert zu werden. Die dargelegten Resultate spiegeln zwei übereinstimmende Ergebnisse von drei Versuchswiederholungen wider. Daher können auch diese Ergebnisse nicht als gesichert anerkannt werden und stellen nur Tendenzen dar. Lediglich bei der Koinkubation von Flagellin mit db-cAMP bzw. Forskolin konnte ein deutlich reproduzierbares Ergebnis ermittelt werden. So zeigten vier von fünf Versuchen (Abbildung 13), dass db-cAMP und Forskolin die Flagellin-induzierte Expression von IL-8 mRNA inhibieren.

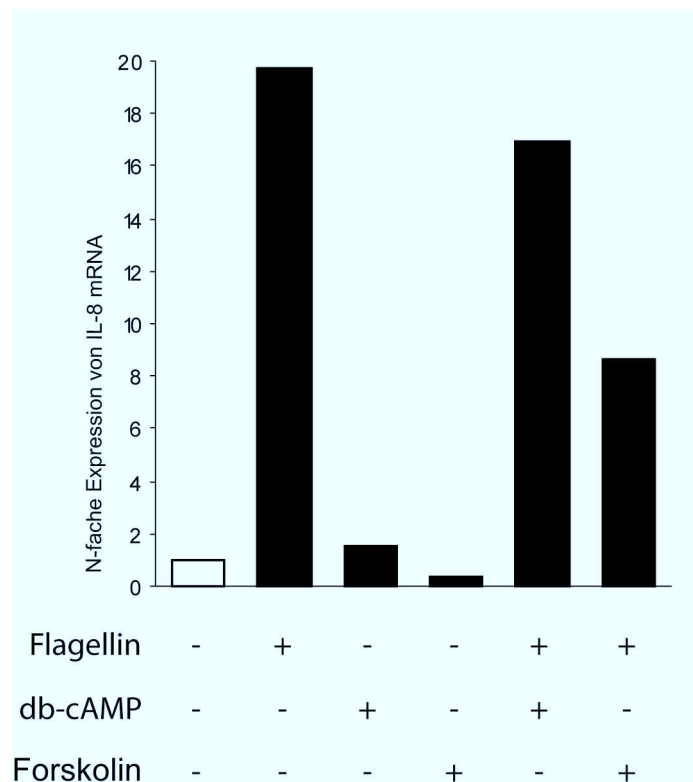


Abbildung 13: Inhibition der Flagellin-induzierten Expression von IL-8 mRNA durch db-cAMP und Forskolin.

Nach sechsständiger Stimulation mit Flagellin, db-cAMP und Forskolin wurde quantitativ die Expression von IL-8 mRNA mittels der real-time PCR bestimmt. Die Messungen erfolgten in Duplikaten. Gezeigt ist ein exemplarisches Ergebnis, welches sich in vier von fünf Versuchswiederholungen bestätigen ließ.

4.3.2 db-cAMP und Forskolin üben keine Wirkung auf die TLR-induzierte Nf-κB Translokation aus

Im Folgenden wurde mittels der indirekten Doppelimmunfluoreszenz untersucht, ob eine Modulation der TLR-spezifischen Aktivierung des Transkriptionsfaktors Nf-κB durch db-cAMP bzw. Forskolin möglich ist. Da eine TLR-induzierte Nf-κB-Translokation ausschließlich in den HaCaT Zellen und nur nach Stimulation mit dem Liganden Flagellin detektiert werden konnte, beschränkt sich der Versuch auf die humane Zelllinie und die Stimulation mit Flagellin. Die Zellen wurden sowohl einzeln mit Flagellin (1µg/ml), db-cAMP (1000µM) und Forskolin (µM), als auch in den beiden Kombinationen aus Flagellin und db-cAMP bzw. Flagellin und Forskolin inkubiert. Als Negativkontrolle dienten unstimulierte Zellen. Nach der Fixierung mit Paraformaldehyd und anschließender Permeabilisierung mit Methanol erfolgte die Detektion von Nf-κB über den Antikörper Nf-κB p65, welcher durch den FITC konjugierten Sekundärantikörper Alexa Fluor® 488 (A, C, E, G, I, K) gebunden wurde.

Wie in Abbildung 14 erkennbar, üben db-cAMP und Forskolin keinen Einfluss auf die Aktivität von Nf-κB aus. So ist im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle keine Lokalisationsänderung feststellbar. Deutlich verifizierbar ist wiederum die Translokation des Transkriptionsfaktors nach der Stimulation mit Flagellin. Eine Modulation der Flagellin-spezifischen Nf-κB-Aktivierung durch db-cAMP oder Forskolin ist jedoch nicht erkennbar, da auch nach Koinkubation von Flagellin mit db-cAMP und Forskolin der Transkriptionsfaktor im Zellkern lokalisiert und damit aktiviert blieb.

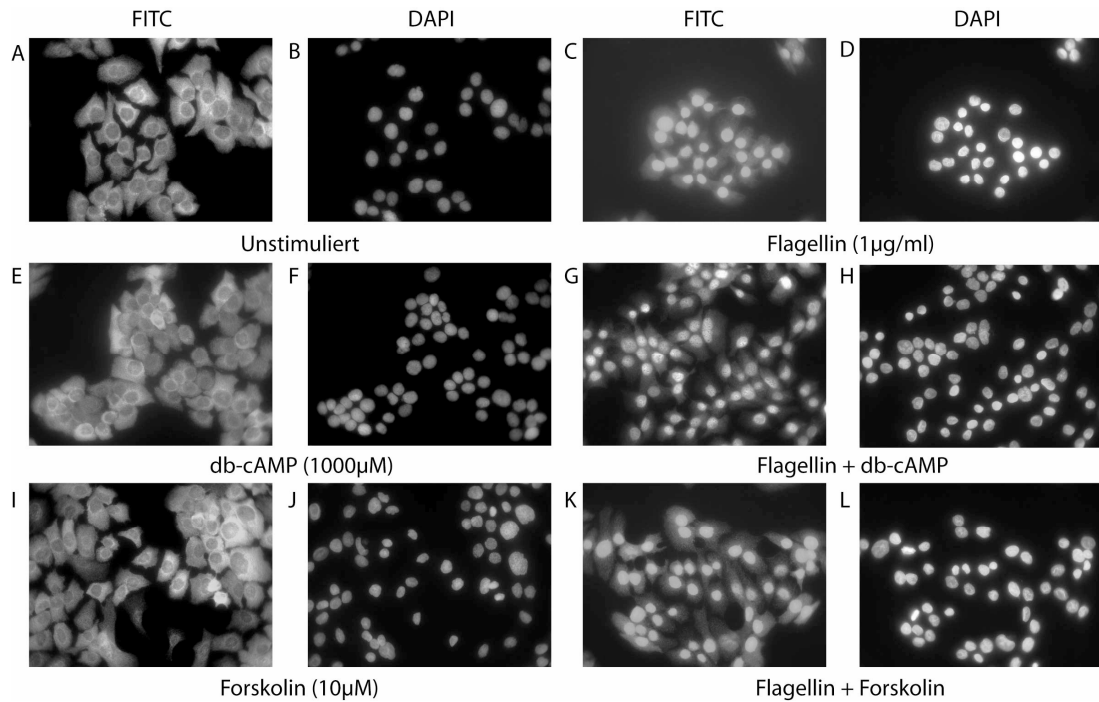


Abbildung 14: Wirkung von db-cAMP und Forskolin auf die Flagellin-induzierte Translokation von Nf-κB.

Nach 30-minütiger Stimulation mit Flagellin (C, D, G, H, K, L), db-cAMP (E, F, G, H) und Forskolin (I, J, K, L), Fixierung mit Paraformaldehyd und anschließender Permeabilisierung mit Methanol erfolgte die Detektion von Nf-κB über den Antikörper Nf-κB p65, welcher durch den FITC konjugierten Sekundärantikörper Alexa Fluor® 488 (A, C, E, G, I, K) gebunden wurde. Zur genauen Lokalisation des Zellkerns wurde eine Färbung mit DAPI (B, D, F, H, J, L) angefertigt. Als Negativkontrolle wurden unstimulierte (A, B) Zellen verwendet. Gezeigt ist ein exemplarisches Ergebnis von drei Versuchswiederholungen.

4.3.3 db-cAMP und Forskolin modulieren die TLR-induzierte Phosphorylierung von p38 und ERK 1/2

Ziel der folgenden Untersuchung war, den Einfluss von db-cAMP und Forskolin auf die TLR-spezifische Aktivierung der MAP-Kinasen zu verifizieren. Der Versuch wurde exemplarisch an den HaCaT Zellen durchgeführt und beschränkt sich auf die Flagellin-Stimulation. Hierfür wurden die Zellen mit Flagellin, db-cAMP und Forskolin sowie in den Kombinationen aus db-cAMP und Flagellin bzw. Forskolin und Flagellin für 30 Minuten stimuliert. Die Proteine wurden entsprechend vorangegangener Versuche mit der Hot Lysis Methode gewonnen, in einem SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und auf eine

Nitrocellulosemembran transferiert. Die aktivierten MAP-Kinasen p38 und ERK 1/2 wurden durch ihre spezifischen Antikörper detektiert.

Im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle zeigte sich, dass Forskolin zu einer erhöhten und db-cAMP zu einer verminderten Phosphorylierung von p38 und ERK 1/2 führten (Abbildung 15). Die Koinkubation von db-cAMP bzw. Forskolin mit Flagellin ergab, dass db-cAMP und Forskolin einen leicht inhibierenden Einfluss auf die Liganden-induzierte Aktivierung von p38 und ERK 1/2 ausüben.

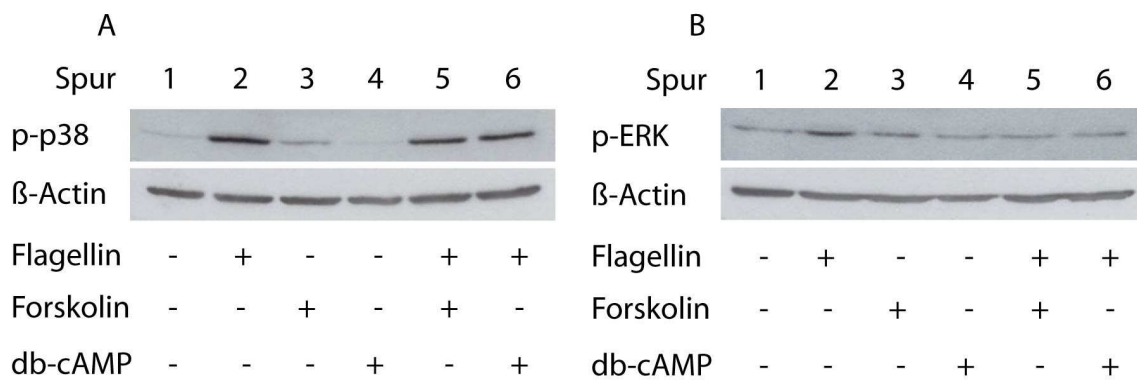


Abbildung 15: Modulation der Liganden-induzierten Aktivierung von ERK 1/2 bzw. p38 durch db-cAMP und Forskolin.

Nach 30-minütiger Stimulation mit Flagellin, Forskolin und db-cAMP, Präparation der Proteine entsprechend der Hot Lysis Methode, elektrophoretischer Auftrennung und Transferierung auf eine Nitrocellulosemembran wurden die aktivierten Proteine p38 (A) bzw. ERK 1/2 (B) durch die Antikörper Phospho-p38 MAP Kinase bzw. die Phospho-p44/42 MAPK detektiert. Um gleichmäßige Proteingehalte nachweisen zu können, erfolgte nach dem Strippen der Membran die Bestimmung von β-Aktin. Gezeigt ist ein Versuch von Dreien mit gleichem Resultat.

5 Diskussion

5.1 Keratinocyten als geeignetes Zellkulturmodell

Im Rahmen der Pathogen-assoziierten molekularen Mustererkennung (PAMP) wurden Mustererkennungsrezeptoren (PRRs) charakterisiert, die konservierte Strukturen von Erregern erkennen und dadurch eine Entzündungsreaktion einleiten können [221]. Hauptvertreter dieser PRRs bilden die Toll-like Rezeptoren. Um die Immunfunktion der Haut weiter aufzuklären, wurde in der vorliegenden Arbeit die Expression und Funktionalität von TLRs in der murinen Keratinozytenzelllinie PAM 212 sowie der humanen keratinozytären Zelllinie HaCaT verifiziert. Anschließend wurde untersucht, ob die TLRs mit dem immunmodulierenden POMC-System der Haut interagieren.

Da Keratinozyten aufgrund ihrer Lokalisation im Hautgewebe theoretisch allen hier verwendeten proinflammatorischen Stimuli (Zytokine und TLR-Liganden) *in vivo* zugänglich sind, stellen die beiden Zelllinien ein geeignetes *in vitro* Modell dar. Außerdem weisen die in Kultur gehaltenen Keratinozyten weitestgehend alle bekannten Zelleigenschaften auf, die auch für Keratinozyten in Hautmodellen nachgewiesen werden konnten [37].

5.2 TLR-Expression auf Keratinozyten

Da die Expression von TLRs in HaCaT Zellen bereits beschrieben wurde [170;198;266], galt es in dieser Arbeit, die TLR-Expression in der keratinozytären Zelllinie PAM 212 zu entschlüsseln. Mittels konventioneller PCR konnte gezeigt werden, dass PAM 212 Zellen die TLRs 1 und 4 deutlich, TLR 2 mäßig und TLR 6 schwach exprimieren. Im Vergleich zum Expressionsmuster humaner Keratinozyten [29;170;182;198;223], besitzen die PAM 212 Zellen somit eine eher geringe Bandbreite an TLRs.

Simuliert man einen Entzündungsprozess durch Stimulation mit LPS, einem Bestandteil der Zellwand Gram- negativer Bakterien, bzw. durch Inkubation mit dem Zytokin IL-1, so zeigen die PAM 212 Zellen nach sechsständiger Stimulation eine signifikante Erhöhung der TLR 4 Expression. Erstaunlicherweise näherte sich das Expressionsmuster nach zwölfständiger Inkubation wieder der unstimulierten Kontrolle an. Begon, Pivarcsi und Köllisch et al. führten ähnliche Experimente an Keratinozyten durch, die unsere Ergebnisse zum Teil belegen. In den einzelnen Versuchen wurden Keratinozyten mit LPS [170], TNF- α bzw. IFN- γ [29] oder mit LPS und IFN- γ [266] stimuliert und nach unterschiedlichen Zeitintervallen die Expression von TLR 4 mRNA bestimmt. Allen gemeinsam war, dass LPS stimulierend auf die Expression von TLR 4 mRNA wirkte, wobei der Zeitpunkt der maximalen mRNA Expression zwischen den Untersuchungen divergierte. Auch eine Reduktion der Expression konnte im Verlauf der einzelnen Stimulationszeiten festgestellt werden, wobei die Expression nicht, wie in unseren Versuchen, auf den Wert der unstimulierten Kontrolle abfiel [170;266]. Dennoch scheint ein derartig starkes Absinken der Genexpression möglich. Dafür sprechen die Untersuchungen von An et al., in denen eine vermehrte Expression von TLR 4 mRNA nach LPS-Stimulation in dendritischen Zellen festgestellt wurde, die ihr Maximum nach zwei Stunden erreichte, im Laufe der Stimulationszeit kontinuierlich abfiel und bereits nach sechs Stunden wieder dem Wert der unstimulierten Kontrolle entsprach. Eine Erklärung für diesen Abfall wird jedoch nicht gegeben, so dass weiterhin nach dem physiologischen Grund geforscht werden sollte.

5.3 Funktionelle Wirkung von TLRs

Um von einer wirksamen Immunabwehr ausgehen zu können, muss überprüft werden, ob die TLRs funktionell aktiv sind. Dazu wurde im Rahmen dieser Arbeit die Zytokinexpression nach Stimulation mit diversen TLR-Liganden als Zeichen einer effektiv ablaufenden Entzündungsreaktion bestimmt. Zur Klärung der Signaltransduktion wurde außerdem die Aktivität verschiedenster Proteine der TLR-Signalkaskade untersucht.

5.3.1 Phosphorylierung von MAP-Kinasen

Wie bereits in der Einleitung erwähnt, erfolgt die Aktivierung der MAP-Kinasen durch MAP-Kinasen-Kinasen (MAPKKs), die wiederum durch MAP-Kinasen-Kinasen-Kinasen (MAPKKKs) phosphoryliert werden. Die Gruppe der MAPKKKs umfasst 17 Proteine [374]. Untersuchungen haben ergeben, dass neben der in der Einleitung erläuterten MAPKKK TAK1 im Wesentlichen die MAPKKKs Tpl2 [75], MEKK1 [183], MEKK2 [373], MEKK3 [135] und ASK1 [215] an Immun- und Entzündungsreaktionen beteiligt sind, wobei der molekulare Aktivierungsmechanismus noch nicht gänzlich geklärt ist. Nachfolgende MAPKKs umfassen MEK1/2, MKK3 und MKK6 [296]. MAP-Kinasen können nachgeschaltete Substrate entweder direkt oder indirekt via MKs durch Phosphorylierung an Serin-/Threoninresten aktivieren oder inaktivieren [283]. MKs, deren Aktivierung im Entzündungsprozess bereits beschrieben wurde, umfassen die MSKs, MNKs, MKs und die RSKs.

Die MAP-Kinasen ERK 1/2 regulieren im Wesentlichen den Zellzyklus, die Zellproliferation und den Zelltod. Studien haben ergeben, dass ERK 1/2 auch in zahlreiche Immun- und Entzündungsprozesse involviert sind. So konnte festgestellt werden, dass ERK 1/2 an der LPS-induzierten TNF- α Sekretion [75;219] und der COX-2 Expression [78] beteiligt sind. Darüber hinaus wiesen ERK-1-defiziente Mäuse Defekte in der Thymozytenreifung und eine verminderte Expression von Alpha- und Beta-Ketten in T-Zell Rezeptoren auf [261]. Zudem konnte dem ERK 1/2-Signalweg eine entscheidende Rolle in der Aktivierung lymphozytärer IL-4 Rezeptoren, der Expression von IL-4 sowie der

Differenzierung naiver CD4⁺ T-Zellen zu CD4⁺ TH-2 Zellen eingeräumt werden [147;366].

Die MAP-Kinase p38 reguliert die Entzündungs- und Immunantwort der Zelle. Untersuchungen konnten zeigen, dass p38 an der Produktion multipler inflammatorischer Zytokine wie TNF- α , IL-1, IL-6 und IL-8 beteiligt ist [5;343]. Ferner ist p38 für die Induktion inflammatorischer Enzyme und Adhäsionsmoleküle, wie COX-2, iNOS [66] und VCAM-1 [264] verantwortlich und reguliert die Expression von Matrixmetalloproteinasen, wie MMP2, MMP9 und MMP13 [274;343]. Außerdem wird p38 durch Regulation der IL-2, IL-12 und IFN- γ Produktion eine entscheidende Rolle in der Aktivierung von T-Zellen und der Differenzierung von TH-1 Zellen zugeschrieben [201;276;361].

Um eine mögliche Beteiligung der MAP-Kinasen an dem TLR-vermittelten Entzündungsprozess aufzudecken, wurde mittels Western Blots der Phosphorylierungsstatus von p38 und ERK 1/2 nach Stimulation mit diversen TLR-Liganden untersucht. In den PAM 212 Zellen induzierte lediglich der TLR 1/2-spezifische Ligand Pam₃Cys die Phosphorylierung von ERK 1/2. Eine Aktivierung von p38 konnte nach 30-minütiger Stimulation mit den einzelnen Liganden nicht nachgewiesen werden. In den HaCaTs war hingegen sowohl eine Phosphorylierung von p38 als auch von ERK 1/2 nach Stimulation mit LPS, Pam₃Cys und Flagellin detektierbar, wobei eine deutliche Abhängigkeit von der Stimulationszeit ermittelt werden konnte. Lediglich Poly (I:C) schien weder p38 noch ERK 1/2 zu aktivieren.

Vor allem in Zellen des Immunsystems konnten bisherige Studien die Phosphorylierung und Aktivierung von p38 und ERK 1/2 nach Stimulation mit den TLR-spezifischen Liganden Peptidoglykan, Pam₃Cys, CpG DNA, Flagellin, Poly (I:C), LPS und R848 belegen [3;92;161;214;273;375]. Jedoch existieren derzeit nur wenige Untersuchungen, die eine TLR-vermittelte Aktivierung von MAP-Kinasen in Keratinozyten beschreiben. Nach heutigem Erkenntnisstand scheint eine TLR 2-, 4- und 6-spezifische Aktivierung der MAP-Kinasen in Keratinozyten möglich [96;184;191;213;225;235;291]. Unsere Versuche belegen darüber hinaus die TLR 1/2- und TLR 5-, nicht aber die TLR 3-vermittelte Phosphorylierung von p38 und ERK 1/2. Des Weiteren konnte,

unseren Ergebnissen entsprechend, eine Abhängigkeit zwischen dem Phosphorylierungsstatus von ERK 1/2 bzw. p38 und der Liganden-Stimulationszeit festgestellt werden. So war in den Untersuchungen von Matsubara et al. eine Peptidoglykan-induzierte Aktivierung von p38 und ERK 1/2 bereits nach dreiminütiger Stimulation sichtbar und stieg mit zunehmender Inkubationszeit an [213]. Diese frühzeitige Phosphorylierung der MAP-Kinasen spiegelt sich auch in den Forschungsergebnissen von Huanzhang et al. wider, in denen es nach 15 Minuten zu einer LPS-induzierten Aktivierung von p38 und ERK 1/2 in dendritischen Zellen kam. Demnach bleibt zu klären, weshalb in unseren Untersuchungen lediglich Flagellin nach 30-minütiger Stimulation, Pam₃Cys und LPS jedoch erst nach 1-3 Stunden zur Aktivierung von ERK 1/2 und p38 führten.

Welche Proteine neben der MAPKKK TAK1 und der MAPKK MKK3/MKK6 an der TLR-vermittelten Phosphorylierung von MAPK beteiligt sind, ist noch nicht gänzlich geklärt. Die TLR-spezifische Induktion der MAP-Kinase ERK 1/2 scheint nach heutigem Erkenntnisstand von der MAPKKK Tpl2 abhängig zu sein [26;78;199]. Wie bereits erwähnt, scheint Tpl2 via ERK 1/2 an der LPS-induzierten COX-2 Expression [78] und der TNF- α Produktion [75] beteiligt zu sein. Genauere Forschungen ergaben, dass Tpl2 den Transport des TNF- α Transkriptats vom Nukleus in das Zytoplasma reguliert [75]. Tpl2 ist im unstimulierten Zustand an p105, dem Vorläufer der Nf- κ B Untereinheit p50, gebunden, so dass die Phosphorylierung von p105 durch den IKK-Komplex Voraussetzung für eine mögliche Tpl2-Aktivierung ist [353]. Weitere Untersuchungen ergaben, dass die Aktivierung von Tpl2 in der TLR 7-vermittelten Signalkaskade von TRAF6 abhängig ist, wohingegen die Stimulation des TLRs 4 auch unabhängig von TRAF6 zur Aktivierung von Tpl2 führt [199]. MAPKKs, denen bisher eine Beteiligung an der TLR-spezifischen Aktivierung von ERK 1/2 eingeräumt wurden, umfassen die MEKs 1/2 und die MKKs 3/6 [25;167].

In die Signaltransduktion der TLR-vermittelten Aktivierung der MAP-Kinase p38 scheinen neben der MAPKKK TAK1 die MEKs 2/3 und ASK1 sowie die bereits beschriebenen MAPKKs MKK 3/6 involviert zu sein [135;215;373]. So konnte

festgestellt werden, dass die MEKK 2/3 in der LPS-induzierten Kaskade sowohl für die Aktivierung von p38 und Nf- κ B als auch für die Produktion von IL-6 unerlässlich sind [135]. Untersuchungen der MAPKKK ASK1 konnten zeigen, dass die MAPKKK die LPS-induzierte und p38-vermittelte Produktion von ROS-Molekülen und β -Defensinen reguliert [215;291].

5.3.2 Aktivierung von Nf- κ B

Nachfolgend wurde die Aktivität des Transkriptionsfaktors Nf- κ B untersucht, der unter anderem die Expression einer Vielzahl von Genen der körpereigenen Abwehr reguliert [155]. Der Transkriptionsfaktor, welcher im inaktiven Zustand gebunden an I κ B-Proteinen im Zytoplasma lokalisiert ist, wandert nach Aktivierung in den Nukleus, um die Transkription von Zielgenen einzuleiten [24;91;233]. Wie bereits in der Einleitung erwähnt, kann die Aktivierung von Nf- κ B in der TLR-vermittelten Kaskade über zwei Wege erfolgen. Die TLRs 1, 2, 5, 6, 7 und 9 aktivieren Nf- κ B über einen MyD88-abhängigen Weg, der TLR 3 nutzt eine MyD88-unabhängige Kaskade. Eine Sonderstellung nimmt der TLR 4 ein, der den Transkriptionsfaktor sowohl via MyD88 als auch unabhängig von MyD88 aktivieren kann [15;116;149;158;323].

In unseren Versuchen war festzustellen, dass es in den HaCaT Zellen lediglich nach Stimulation mit Flagellin und IL-1, in den PAM 212 sogar nur nach Inkubation mit IL-1 zu einer Translokation von p65 kam.

Voraussetzung für eine mögliche Nf- κ B-Translokation ist die Degradierung der Nf- κ B-Untereinheit von dem jeweiligen I κ B-Protein. Untersuchungen bezüglich einer TLR-spezifischen Degradierung von I κ B-Proteinen in Keratinozyten konnten eine deutliche Zeit- und Konzentrationsabhängigkeit aufdecken. In diesem Zusammenhang beträgt die kürzeste Stimulationszeit, die bisher in Keratinozyten getestet wurde, 30 Minuten [182;194]. Da die Degradierung von I κ B-Proteinen vor der Translokation stattfinden muss, ergibt sich als mögliche Ursache für die fehlende Aktivierung des Transkriptionsfaktors eine zu kurze Stimulationsdauer. Auch bei der unter Kapitel 4.2.3. genannten zeitkinetischen Untersuchung zur Aktivierung der MAP-Kinasen p38 und ERK 1/2 konnten die Liganden Pam₃Cys und LPS erst nach 120-minütiger bzw. 180-minütiger

Stimulation eine Phosphorylierung der MAP-Kinasen induzieren. Lediglich bei Stimulation mit Flagellin war nach 30 Minuten eine Aktivierung der MAP-Kinasen, ähnlich der Translokation von Nf- κ B, sichtbar. Darüber hinaus belegen zahlreiche Studien eine TLR 1/2-, 3-, 5-, 2/6-, 7-, 8- und 9-spezifische Aktivierung und Translokation von Nf- κ B nach längeren Stimulationszeiten [29;44;170;182;182;223;266;301].

Im Hinblick auf eine mögliche LPS-spezifische Aktivierung von Nf- κ B in Keratinozyten besteht jedoch Uneinigkeit. Die Ergebnisse variieren zwischen einer deutlichen [29;182], einer moderaten [266], bis hin zu einer fehlenden [170] LPS-induzierten Nf- κ B-Translokation. Möglicherweise beruhen diese stark divergierenden Ergebnisse auf einer fehlenden bzw. vorhandenen Expression des Glykoproteins MD-2 bzw. des Oberflächenproteins CD14. Auch hier liegen noch keine eindeutigen Versuchsergebnisse vor. Während einige Autoren die Expression von TLR 4 und CD14 in primären Keratinozyten und HaCaT Zellen feststellten [170;266;267;313], konnten andere weder TLR 4 noch CD14 in kultivierten Keratinozyten nachweisen [157]. Darüber hinaus konnte eine Abhängigkeit zwischen der CD14-Expression und dem Differenzierungsgrad der Keratinozyten ermittelt werden [267]. Köllisch et al. konnten, trotz vorhandener TLR 4 und CD14 Expression, keine Aktivierung durch LPS in HaCaT Zellen nachweisen und führten dies auf eine fehlende MD-2 Expression zurück [170]. Weitere Untersuchungen brachten hervor, dass die Koinkubation mit proinflammatorischen Zytokinen, wie IFN- γ und TNF- α , die LPS-spezifische Aktivierung des Transkriptionsfaktors Nf- κ B verstärkt [29;266]. Vermutlich liegt diesem additiven Effekt ein Mechanismus zum Schutz vor einer inadäquaten Auslösung einer Immunantwort zugrunde: IFN- γ und TNF- α werden vermehrt während einer Entzündungsreaktion bzw. bei der Wundheilung gebildet. Da die Haut durch die residente Keimflora auch in physiologischem Zustand ständig einer gewissen Population von Mikroorganismen ausgesetzt ist, die aufgrund der fehlenden Eintrittspforte keiner körpereigenen Abwehr bedarf, könnte der Organismus so eine unnötige Immunantwort verhindern.

5.3.3 Expression von Zytokinen

Als Zeichen einer effektiv ablaufenden Entzündungsreaktion kann die Sekretion von Zytokinen angesehen werden. Daher wurde im Rahmen dieser Arbeit die Expression der humanen Zytokine IL-6 und IL-8 sowie des murinen Gro- α -Analogons CXCL-2 nach Stimulation mit diversen TLR-Liganden sowie dem Zytokin IL-1 mittels real-time PCR bestimmt.

Die Zytokine CXCL-2 und IL-8 gehören zur Gruppe der Chemokine. Chemokine besitzen vier charakteristische Cysteine und lassen sich entsprechend ihrer Struktur in die drei Klassen CXC-, C-C- und XC-Chemokine unterteilen, wobei IL-8 und CXCL-2 zur ersten Klasse gezählt werden [258;282]. Die Nomenklatur der CXC-Chemokine basiert auf der Trennung der Cysteine durch eine beliebige Aminosäure (X). Sie sind in erster Linie für die chemotaktische Rekrutierung immunkompetenter Zellen verantwortlich, die entsprechend des Zytokingradienten in das entzündete Gewebe wandern [258;282]. Zudem besitzen sie aktivierende Eigenschaften auf die Zielzelle, beeinflussen die Adhärenz von Leukozyten an Endothelzellen und modulieren das Zellwachstum und die Angiogenese. So aktiviert IL-8 neutrophile Granulozyten, indem es über einen Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration die Freisetzung von Enzymen aus den primären und sekundären Granula bewirkt [350]. Zusätzlich induziert es die vermehrte Bildung von Sauerstoffradikalen in Neutrophilen und die Expression von Adhäsionsmolekülen auf Endothelzellen [70;97;137].

IL-6 ist ein äußerst pleiotropes Zytokin, das sowohl pro- als auch antiinflammatorisch wirken kann. Zellspezifische IL-6 Rezeptoren werden lediglich von T-Zellen, B-Zellen, Monozyten, Makrophagen, Hepatozyten und einigen Tumorzellen exprimiert [280]. Es existieren jedoch auch lösliche IL-6 Rezeptoren. Beide Rezeptorformen benötigen für die Signaltransduktion das Glykoprotein gp130, welches ubiquitär exprimiert wird. Dadurch wird sichergestellt, dass auch Zellen ohne membranständigen IL-6 Rezeptor adäquat und in gleichem Maße reagieren können [316;318]. IL-6 induziert als Wachstumsfaktor in der frühen Hämatopoese die Proliferation pluripotenter Stammzellen [140;168]. In Anwesenheit von Differenzierungsfaktoren kann IL-6 so die Reifung von Makrophagen oder Thrombozyten fördern [234]. Des

Weiteren induziert IL-6 die terminale Ausreifung aktivierter B-Zellen zu Antikörper sezernierenden Plasmazellen [123;240] und fördert in Anwesenheit von IL-2 die Differenzierung von T-Lymphozyten zu zytotoxischen T-Zellen [254;321]. Ist eine akute Entzündung vor Ort stark genug, um eine entsprechend hohe Konzentration an Zytokinen zu erreichen, gelangen diese in die Blutbahn und von dort an unterschiedliche Organe. IL-6 induziert so in der Leber die Bildung von Akutphase-Proteinen, die sowohl proinflammatorisch als auch inhibierend bzw. modulierend wirken, um eine Ausbreitung und eine damit verbundene systemische Entzündung zu verhindern [50;89;246]. Weiterhin wird beschrieben, dass IL-6 die ACTH-Synthese und damit die Bildung von antiinflammatorisch wirkenden Glucocorticoiden anregt [243].

In unseren Versuchen zeigte sich in den HaCaT Zellen eine vermehrte Expression von IL-6 und IL-8 nach Stimulation mit den Liganden Pam₃Cys, Poly (I:C), Flagellin und LPS, wobei die Liganden unterschiedlich stark induzierend auf die Expression wirkten. Poly (I:C) und IL-1 erwiesen sich als stärkste Induktoren. Auch die Stimulationen mit Flagellin und Pam₃Cys zeigten eine deutliche Erhöhung der Zytokinexpression. Lediglich die Inkubation mit LPS wies eine eher geringgradige Steigerung der Zytokinexpression auf. Exemplarisch wurde auch in den PAM 212 Zellen die Expression von CXCL-2 nach Stimulation mit Pam₃Cys und LPS quantitativ bestimmt, wobei auch in diesen Zellen beide Liganden zu einer vermehrten Expression führten.

Vergleicht man das Expressionsmuster der Zytokine IL-8 und IL-6, fällt auf, dass -abgesehen von der Stimulation mit Poly (I:C)- IL-8 stärker transkribiert wird als IL-6. Dies verwundert kaum, betrachtet man die zeitliche Dauer der Ligandenexposition. Das angeborene Immunsystem, das neben dendritischen Zellen und Mastzellen im Wesentlichen phagozytierende Makrophagen und neutrophile Granulozyten umfasst, muss innerhalb der ersten Stunden wirksam werden [221]. Daher steht zu Beginn einer Infektion die Rekrutierung phagozytierender Zellen im Vordergrund. Dennoch wird anhand des deutlich vorhandenen IL-6 Expressionsmusters sichtbar, dass weitere Abwehrmechanismen auch in Richtung der erworbenen Immunität eingeleitet werden.

Unsere Ergebnisse lassen sich durch zahlreiche Studien belegen, in denen Keratinozyten hinsichtlich einer möglichen TLR-vermittelten Expression und Freisetzung von IL-8 untersucht wurden. So konnte eine vermehrte TLR 1-, 2-, 3-, 5- und 9-spezifische Expression von IL-8 in Keratinozyten nachgewiesen werden [29;170;182;223;230;266]. Wie bereits in Kapitel 5.3.2 ausgeführt, besteht Uneinigkeit im Hinblick auf eine mögliche TLR 4-vermittelte Entzündungsreaktion, so dass auch die Ergebnisse bezüglich der LPS-induzierten IL-8 Expression divergieren. Darüber hinaus zeigt sich der stimulierende Effekt von TGF- α und IFN- γ , der bereits im Abschnitt 5.3.2 dargelegt wurde, auch in der TLR-spezifischen IL-8 Expression. Vergleiche hinsichtlich der Induktionsstärke der einzelnen Liganden belegen, dass Poly (I:C) der potenteste Ligand für die IL-8 Expression ist [29;170;182]. Weitere Untersuchungen brachten hervor, dass eine starke Abhängigkeit zwischen der induzierten Zytokinexpression und der Stimulationszeit bzw. der Ligandenkonzentration vorliegt [182].

Bis heute gibt es nur wenige Veröffentlichungen, die eine Expression des Zytokins IL-6 nach TLR-spezifischer Stimulation von Keratinozyten beschreiben. So beschränken sich die Ergebnisse derzeit auf eine mögliche TLR 2-vermittelte IL-6 Expression. Matsubara et al. ermittelten diesbezüglich eine deutliche Abhängigkeit zwischen der IL-6 Expression und der Stimulationskonzentration sowie der Inkubationszeit des TLR 2 Liganden Peptidoglykan (PGN) [213]. Dem gegenüber stehen die Untersuchungen von Li et al., in denen Keratinozyten mit PGN und dem TLR 2 Liganden Phospholipomannan stimuliert wurden und nach verschiedenen Zeitintervallen (1, 4 und 6 Stunden) die Expression von IL-6 quantitativ bestimmt wurde. Auch hier war bei beiden Stimulationen eine vermehrte Expression erkennbar, jedoch konnte keine Zeitabhängigkeit abgeleitet werden.

Studien belegen, dass die TLR-induzierte Expression von Zytokinen vor allem durch Nf- κ B, aber auch durch AP-1, einem Transkriptionsfaktor, der in erster Linie durch MAP-Kinasen aktiviert wird, reguliert wird [7;159;247;289]. Die Phosphorylierung von MAP-Kinasen führt zur selektiven Aktivierung verschiedener AP-1 Untereinheiten und Transkriptionsfaktoren, die mit AP-1

interagieren [146]. So belegen Untersuchungen an dendritischen Zellen, dass die Stimulation mit LPS zur Aktivierung von JunD und JunB [173], die Inkubation mit CpG-DNA zur Phosphorylierung von c-Jun und ATF2 [101] und die Stimulation mit Pam₃Cys zur Induktion von c-Fos führt [73]. Exemplarisch wurde auch in dieser Arbeit der Einfluss der MAP-Kinasen ERK 1/2 und p38 auf die TLR-spezifische IL-8 Expression untersucht. Hierfür wurden die HaCaTs 30 Minuten vor der Stimulation mit Flagellin mit dem ERK 1/2-Inhibitor PD 98059 bzw. dem p38-Inhibitor SB 203580 inkubiert. Unsere Ergebnisse bestätigen, dass auch die MAPK einen signifikanten Einfluss auf die TLR-spezifische IL-8 Expression ausüben. So konnte eine deutliche Inhibition der Flagellin-induzierten IL-8 Expression nach Koinkubation mit den Inhibitoren festgestellt werden.

Vergleicht man das Expressionsmuster der Zytokine mit der Aktivität von p38, ERK 1/2 und Nf- κ B, bleiben dennoch einige Fragen hinsichtlich der Signaltransduktion offen.

Fraglich ist, über welche Signalkaskade die Poly (I:C)-vermittelte IL-8 und IL-6 Expression in den HaCaT Zellen verläuft, da weder eine Aktivierung von p38 oder ERK 1/2 noch von Nf- κ B nachgewiesen werden konnte. Eine Möglichkeit birgt der Transkriptionsfaktor IRF-3, der in der TLR 3 Signalkaskade in der Regel via TRIF, TRAF3/TRAF6, TBK1 und IKK-i aktiviert wird. Erst kürzlich wurde von einer zusätzlichen TRIF-unabhängigen TLR 3-vermittelten Aktivierung von IRF-3 berichtet. So konnte nach Stimulation des Rezeptors eine Rekrutierung der Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K) und eine nachfolgende Aktivierung des Proteins AKT nachgewiesen werden, das letztlich IRF-3 phosphorylierte [287]. Ferner wird von einer sekundären TLR 3-induzierten Expression inflammatorischer Zytokine berichtet. So war festzustellen, dass die TLR 3-vermittelte Produktion von IFN- α und IFN- β zur Aktivierung des JAK-STAT-Weges führte [64], über den die Synthese zahlreicher proinflammatorischer Zytokine eingeleitet wurde [330]. Letztlich besteht auch die Möglichkeit, dass die Poly (I:C)-induzierte Zytokin Expression nicht durch TLR 3 sondern durch andere Rezeptoren oder Proteine vermittelt wird. Denkbar erscheint hier eine Aktivierung der Proteinkinase PKR, deren *trans-*

Autophosphorylierung bereits eine Beteiligung an der Poly (I:C)-induzierten TNF- α Produktion eingeräumt wurde [58;227]. Daneben wird von einer Poly (I:C)-induzierten Aktivierung der Proteine retinoic-acid-inducible Protein I (RIG-I) und Melanoma differentiation associated gene 5 (MDA5) berichtet [14;153;371], auf deren Transduktionskaskade kurz eingegangen werden soll, da er Parallelen zum TLR 3 Signalweg aufweist. Beide Proteine sind homolog aufgebaut und beinhalten eine CARD-Domäne und eine DExD/H box Helicase Domäne [371]. Über die CARD-Domäne binden sie das Adaptorprotein IPS-1 [163;305]. Anschließend assoziiert IPS-1 einerseits mit TRAF3 [285], woraufhin TBK1 und IKK-i aktiviert werden, die wiederum IRF-3 und IRF-7 phosphorylieren [82;263;307]. Auf der anderen Seite interagiert IPS-1 mit FADD und RIP1, wodurch die Caspasen -8 und -10 aktiviert werden, die den Transkriptionsfaktor Nf- κ B phosphorylieren [22;320;371]. Über diese Signalwege kann somit auch eine TLR 3-unabhängige Expression von Zytokinen erfolgen.

Betrachtet man die TLR 4- und CXCL-2-Expression in den PAM 212 Zellen, bleibt auch zu klären, ob ein LPS-induzierter-, p38-, ERK- und Nf- κ B-unabhängiger Signalweg zur Induktion der Rezeptor- und Zytokinexpression existiert. Forschungen ergaben, dass TLR 4 neben Nf- κ B und AP-1 auch den Transkriptionsfaktor IRF-5 aktiviert. Die Signaltransduktion zur Aktivierung von IRF-5 scheint nach heutigen Erkenntnissen über einen MyD88-abhängigen Weg zu erfolgen [322]. Der Transkriptionsfaktor transloziert nach TLR-Stimulation in den Nukleus und bindet an ISRE-Motiven in Promotor Regionen proinflammatorischer Zytokin-Gene [322]. Des Weiteren ist eine Aktivierung des JAK-STAT Weges möglich. Untersuchungen an Makrophagen stellte diesbezüglich eine schnelle Phosphorylierung von STAT-1 nach Stimulation mit LPS fest [172]. In STAT-1 defizienten Zellen war zudem die LPS-induzierte Expression von iNOS und IFN-induzierbarer Gene, wie IP 10, stark beeinträchtigt [130]. Auch die bereits erwähnte indirekte Aktivierung des JAK-STAT Weges kann durch TLR 4 vermittelt werden [88;337].

So wird deutlich, dass TLRs zur Einleitung einer Entzündungsreaktion eine Vielzahl an Signaltransduktionswegen nutzen können.

5.4 Modulation der TLR-vermittelten Entzündungsantwort

Die Haut verfügt durch die Bildung von POMC-Derivaten (α -MSH, β -MSH, γ -MSH, ACTH und POMC) über einen Mechanismus zur Eindämmung einer Entzündungsreaktion. POMC-Derivate entfalten ihre Wirkung, indem sie die Adenylatzyklase aktivieren und so den intrazellulären cAMP-Spiegel in der Zielzelle erhöhen. Um eine etwaige Modulation der TLR-vermittelten Entzündungsreaktion durch POMC-Derivate zu untersuchen, wurde in der vorliegenden Arbeit die Wirkung des cAMP Analogons db-cAMP und des Adenylatzyklase Aktivators Forskolin auf den TLR-induzierten Aktivierungszustand von Nf- κ B, p38 und ERK 1/2 sowie auf die Rezeptor-vermittelte Expression von IL-6, IL-8, CXCL-2 und TLR 4 bestimmt.

Bisher veröffentlichte Ergebnisse belegen, dass Substanzen, die zu einer intrazellulären Erhöhung des cAMP-Spiegels führen, die TLR-vermittelte Entzündungsreaktion modulieren können [86;93;103;105;122;134;152;156;189;207;265;278;297;300;348;354]. Dabei scheint es irrelevant zu sein, welche Substanz Anwendung findet. Die bisher untersuchten Systeme bzw. Substanzen umfassen das Eicosanoid Prostaglandin E₂ [86;122;348;354], den Adenosin-Rezeptor und dessen Aktivierung durch Adenosin oder ATP [156;188;207;265;297], Bakterien bzw. deren Bestandteile wie Porphyromonas gingivalis [103;352] oder das Adenylatzyklase-Toxin (CyaA) von Bordetella pertussi [122], das Adipokin Adiponectin [134], das Pflanzenextrakt Warifteine [278], das Neuropeptid CGRP [105] sowie synthetische Stoffe wie 8-Br.-cAMP [86], das Phosphoceramid-Analogon-1 PCERA-1 [93] oder die von uns angewendeten Stimulantien db-cAMP und Forskolin [152;156].

Allen bisherigen Veröffentlichungen gemeinsam ist die Entfaltung einer antiinflammatorischen und immunprotektiven Wirkung. Dementsprechend konnte einerseits eine Inhibition der TLR-vermittelten Expression proinflammatorisch wirkender Zytokine, Chemokine und Oberflächenmoleküle, wie TNF- α [86;93;103;105;134;156;188;207;265], IL-12 [86;122;297], IL-8 [300], MCP-1 [156], CCL4 [105], MIP-1 α [348] und CD95L [354] nachgewiesen werden, andererseits wirkte cAMP induzierend auf die TLR-spezifische

Expression des antiinflammatorischen Zytokins IL-10 [86;93;103;122;134;156;348]. Ferner konnte eine cAMP-vermittelte Minderung der Proliferation und Antikörpersekretion von B-Zellen eruiert werden [278]. Kontroverse Ergebnisse existieren jedoch im Hinblick auf eine Modulation der IL-6 Synthese. Diesbezüglich konnte sowohl eine Reduktion [301] als auch eine Steigerung der IL-6 Expression [188] durch cAMP nachgewiesen wurde. Möglicherweise spiegeln diese divergierenden Ergebnisse die Pleiotropie des Zytokins wieder, das sowohl eine pro- als auch antiinflammatorische Wirkung entfalten kann.

Unsere Untersuchungen deuten ebenfalls darauf hin, dass eine Modulation der TLR-induzierten Zytokinexpression stattfinden kann. So führte die Koinkubation von Pam₃Cys und LPS mit db-cAMP bzw. Forskolin zu einer Reduktion der CXCL-2 Expression in den PAM 212 Zellen. Auch die LPS-induzierte TLR 4 Expression konnte in den PAM 212 Zellen durch die Substanzen inhibiert werden. Die HaCaTs zeigten eine vermehrte IL-6 und eine verminderte IL-8 Expression nach Koinkubation von LPS, Pam₃Cys, Flagellin, und Poly (I:C) mit db-cAMP bzw. Forskolin.

Unklar und nicht eindeutig belegt ist allerdings, ob die immunmodulierende Wirkung zellspezifisch ist, welche der Toll-like Rezeptoren durch cAMP regulierbar sind und vor allem wie cAMP seine modulierende Wirkung entfaltet bzw. an welcher Stelle es in die TLR-spezifische Signalkaskade eingreift.

Um eine etwaige Zellspezifität belegen zu können, bedarf es weiterer Untersuchungen. Bisher veröffentlichte Ergebnisse bezüglich einer Modulation der TLR-spezifischen Entzündungsantwort beziehen sich in erster Linie auf Zellen des Immunsystems. Diese umfassen Monozyten [156;188], Makrophagen [93;103;134;207;265;348;352], B-Lymphozyten [278] und antigenpräsentierende Zellen [86;105;122;189;297;348;354]. Darüber hinaus wird von einer Modulation der TLR-Antwort in Tumorzellen des Pankreas berichtet [152]. Abgesehen von unseren Ergebnissen existieren derzeit keine weiteren Untersuchungen zu dieser Thematik in Keratinozyten.

Ferner besteht Klärungsbedarf, ob sich die antiinflammatorische Wirkung von cAMP auf alle TLRs anwenden lässt. Bis dato konnte eine Modulation der TLR

1/2- [105;156;188;265;278], TLR 2/6- [156;188], TLR 4- [86;93;105;122;156;207;265;278;354] und TLR 9-spezifischen [105;207;265] Signalkaskade durch cAMP ermittelt werden. Strittig ist allerdings, ob die Signalkaskaden der TLRs 3, 5, 7 und 8 durch cAMP inhibiert werden können. Derzeit existieren sowohl verifizierende [93;105] als auch widerlegende [156;265] Studien zu dieser Thematik. Unsere Ergebnisse lassen darauf schließen, dass auch die TLR 3- und 5-spezifische Signalkaskade durch cAMP moduliert werden kann.

Überdies ist die Signaltransduktion von cAMP nicht vollständig geklärt. Zunächst scheint die Erhöhung des intrazellulären cAMP-Spiegels von der Aktivität der Adenylatzyklase abhängig zu sein, die zelluläres ATP in cAMP umwandelt [122]. cAMP fungiert als second-messenger der Zelle und kann auf unterschiedliche Proteine einwirken. Bekannt ist die Aktivierung der Proteinkinase A (PKA) durch cAMP. So setzen einige Autoren einer möglichen Immunmodulation die Aktivierung der PKA voraus [86;103;105;207;354]. Der weitere Signaltransduktionsweg scheint davon abhängig zu sein, ob die Zielobjekte für cAMP pro- oder antiinflammatorisch wirkende Moleküle sind.

Ob und wie eine Modulation der TLR-vermittelten Aktivierung von NF- κ B durch cAMP stattfindet, wird kontrovers diskutiert. So belegen einige Studien, dass cAMP die TLR-induzierte Expression NF- κ B-abhängiger proinflammatorischer Zytokine und Mediatoren inhibiert. Einigkeit besteht dahingehend, dass der inhibierende Effekt nicht auf die Aktivität der IKK-Proteine [152;348] zurückzuführen ist. In diesem Zusammenhang wird vielmehr eine verminderte Translokation und DNA-Affinität des Transkriptionsfaktors [103;207;278], eine Unterdrückung der I κ B- [207] und p105- Phosphorylierung [348] bzw. eine vermehrte Genexpression von I κ B-Proteinen [152] beschrieben. Auf der anderen Seite widerlegen einige Autoren die Modulation der TLR-spezifischen NF- κ B Aktivierung durch cAMP [86;105;265]. Sie führen die Reduktion der TLR-vermittelten Expression proinflammatorischer Zytokine auf eine Inhibition von IRF-1 [86;122], IRF-8 [122] oder c-Jun [86] bzw. auf eine vermehrte Expression des Transkriptionssuppressors ICER [105] zurück.

Des Weiteren wurde untersucht, ob cAMP die TLR-induzierte NF- κ B-abhängige Expression antiinflammatorischer Zytokine beeinflusst. Hickey et al. stellten in diesem Kontext fest, dass cAMP zu einer vermehrten NF- κ B-induzierten IL-10 Produktion führt [122]. Demgegenüber stehen Untersuchungen, die zeigen, dass die IL-10 Expression nicht durch NF- κ B, sondern durch den Transkriptionsfaktor CREB reguliert wird, wobei auch eine Modulation der CREB-abhängigen Zytokinexpression durch cAMP ermittelt werden konnte [86;134;348]. In unseren Versuchen war keine Modulation der TLR-vermittelten NF- κ B Aktivierung durch db-cAMP oder Forskolin sichtbar, wobei sich die Ergebnisse lediglich auf die Flagellin-induzierte Signalkaskade beschränken. Zudem ist umstritten, ob cAMP die TLR-induzierte Aktivität von MAP-Kinasen beeinflusst. Bis heute existieren einige Studien, die eine Modulation der TLR-induzierten Phosphorylierung von JNK, ERK 1/2 und p38 nachweisen [86;93;105;122;278;348]. So konnte cAMP eine entscheidende Rolle in der p38- und ERK 1/2-vermittelten Expression von IL-10 eingeräumt werden [93;122]. Ferner berichten Rocha et al., dass die cAMP-abhängige Inhibition der TLR-spezifischen Phosphorylierung von ERK 1/2 zu einer verminderten Proliferation und Immunglobulinsekretion von B-Lymphozyten führt [278]. Unsere Forschungen deuten ebenfalls darauf hin, dass eine Modulation der TLR-vermittelten Phosphorylierung durch cAMP stattfindet. So konnten wir zeigen, dass db-cAMP und Forskolin die Flagellin-induzierte Phosphorylierung von p38 und ERK 1/2 geringgradig inhibieren.

5.5 Abschluss und Ausblick

Unsere Ergebnisse belegen somit die Expression und Funktionalität des TLR Systems in Keratinozyten der Haut, wenngleich es weiterer Untersuchungen bezüglich des Signaltransduktionsweges bedarf. Folglich findet bereits in der Haut, welche als Grenzorgan zur Umwelt fungiert, die erste Abwehr gegen Pathogene statt, um den Gesamtorganismus vor exogenen Noxen zu schützen und einer systemischen Infektion entgegenzuwirken.

Die Bedeutung dieses Systems spiegelt sich besonders deutlich am Krankheitsbild der atopischen Dermatitis wider, in der es häufig zu Superinfektionen mit bakteriellen und viralen Pathogenen kommt [133;249;256;275]. Untersuchungen deckten diesbezüglich Polymorphismen im TLR 2 [200] und TLR 9 Gen [250] sowie eine verminderte Expression und Synthese antimikrobieller Peptide auf [133;249;256;275]. Daher wird vermutet, dass die fehlende Immunantwort auf *S. aureus* und Herpes simplex Viren bei Atopikern auf die genetischen Veränderungen in TLR-Genen zurückzuführen ist.

Bedeutsam bleibt allerdings, dass die initiale TLR-vermittelte Immunantwort dem Entzündungsstimulus entsprechend reguliert und begrenzt wird, um eine überschießende Immunreaktion bzw. die Entwicklung und Aufrechterhaltung lang andauernder Entzündungsprozesse zu verhindern. So belegen derzeitige Studien, dass TLRs neben der Auslösung einer Immunantwort auch eine tragende Rolle in der Pathogenese und -physiologie inflammatorischer Erkrankungen wie Morbus Crohn [49;138], rheumatoider Arthritis [304] und Atherosklerose [165] einnehmen. Auch innerhalb der Haut kann den TLRs eine Beteiligung an der Ausbildung und Aufrechterhaltung dermalen Erkrankungen eingeräumt werden. So scheinen TLRs an der Pathogenese der multifaktoriell bedingten Acne vulgaris beteiligt zu sein. Diese wird zurückgeführt auf eine Androgen bedingte Volumenzunahme der Talgdrüsen, eine vermehrte Lipidsynthese, eine überschießende Proliferation von Epithelzellen und Bakterien in tiefen Anteilen des Haarfollikelinfundibulums, die schließlich in eine Entzündung münden [338]. Studien zeigten, dass die Aktivierung der TLRs 2 und 4 durch das Propionibakterium *acnes* zu einer vermehrten Expression von

IL-8 und hBD2 führen [242]. Das Chemokin IL-8 und das humane β -Defensin hBD2 rekrutieren immunkompetente Zellen und induzieren so die Entzündungsreaktion in der Acne vulgaris [19;248;367]. Dem Chemokin IL-8 wird neben seiner potenten chemotaktischen Fähigkeit eine tragende Rolle bei der Induktion der Keratinozytenproliferation in der Acne vulgaris zugeordnet [229;242]. Auch in die Pathophysiologie der Psoriasis scheinen TLRs involviert zu sein. Die Psoriasis ist eine entzündliche Dermatose, deren Ursache noch nicht gänzlich geklärt ist. Psoriatische Herde zeichnen sich histologisch durch eine Hyperproliferation schlecht differenzierter Keratinozyten sowie einer starken Infiltration von TH-1-Zellen aus [176;345]. Untersuchungen haben ergeben, dass die TLRs 1, 2, 4, 5 und 9 in psoriatischer Haut vermehrt exprimiert werden [20;29;63;230;306]. Zudem konnte gezeigt werden, dass TGF- α , welches in großer Zahl in psoriatischen Plaques nachweisbar ist, sowohl die Expression der TLRs 5 und 9 als auch die Produktion TLR-induzierter Zytokine und β -Defensine erhöht [230]. Interessanterweise konnte nach Applikation des TLR 7 Liganden Imiquimod die Entstehung bzw. ein Wachstum psoriatischer Herde festgestellt werden [83]. Studien deckten weiter auf, dass Cathelicidin (LL-37), ein antimikrobielles Peptid, welches in großen Mengen in psoriatischen Herden exprimiert wird, nicht stimulativer wirkende DNA zu potenten TLR 9 Aktivatoren umwandeln kann [181].

Daraus leitet sich ab, dass die Begrenzung bzw. Unterdrückung einer überschießenden (TLR-vermittelten) Immunreaktion von fundamentaler Bedeutung für den Erhalt der Hauthomöostase ist. Eine wesentliche Rolle beim Erhalt des Gleichgewichts im menschlichen Körper spielt das POMC-Peptid α -MSH. In mehreren *in vivo* Modellen konnte seine potente antiinflammatorische Wirkung auf unterschiedliche experimentell induzierte, entzündliche Erkrankungen, wie Kontaktdermatitis, Vasculitits, Arthritis, Uveitis, Retinitis, Asthma bronchiale, Pankreatitis, Hepatitis und Colitis, gezeigt werden [42]. Unsere Ergebnisse deuten darauf hin, dass cAMP-induzierende Peptide, wie z.B. α -MSH, auch auf eine überschießende TLR-spezifische Entzündungsreaktion in der Epidermis immunmodulierend wirken können.

Weitere Studien sind jedoch notwendig, um den genauen molekularen Interaktionsmechanismus aufzudecken und seine klinische Relevanz im Kontext der Haut weiter zu überprüfen.

6 Literaturverzeichnis

1. **Abdel-Malek,Z.A.**, Melanocortin receptors: their functions and regulation by physiological agonists and antagonists. *Cell Mol.Life Sci.* 2001. **58**: 434-441.
2. **Adachi,S., Nakano,T., Vliagoftis,H., and Metcalfe,D.D.**, Receptor-mediated modulation of murine mast cell function by α -melanocyte-stimulating hormone. *J.Immunol.* 1999. **163**: 3363-3368.
3. **Adhikary,G., Sun,Y., and Pearlman,E.**, C-Jun NH2 terminal kinase (JNK) is an essential mediator of Toll-like receptor 2-induced corneal inflammation. *J.Leukoc.Biol.* 2008. **83**: 991-997.
4. **Aebischer,I., Stampfli,M.R., Zurcher,A., Miescher,S., Urwyler,A., Frey,B., Luger,T., White,R.R., and Stadler,B.M.**, Neuropeptides are potent modulators of human in vitro immunoglobulin E synthesis. *Eur.J.Immunol.* 1994. **24**: 1908-1913.
5. **Ajizian,S.J., English,B.K., and Meals,E.A.**, Specific inhibitors of p38 and extracellular signal-regulated kinase mitogen-activated protein kinase pathways block inducible nitric oxide synthase and tumor necrosis factor accumulation in murine macrophages stimulated with lipopolysaccharide and interferon-gamma. *J.Infect.Dis.* 1999. **179**: 939-944.
6. **Akashi,S., Shimazu,R., Ogata,H., Nagai,Y., Takeda,K., Kimoto,M., and Miyake,K.**, Cutting edge: cell surface expression and lipopolysaccharide signaling via the toll-like receptor 4-MD-2 complex on mouse peritoneal macrophages. *J.Immunol.* 2000. **164**: 3471-3475.
7. **Akira,S. and Takeda,K.**, Toll-like receptor signalling. *Nat.Rev.Immunol.* 2004. **4**: 499-511.
8. **Akira,S., Takeda,K., and Kaisho,T.**, Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. *Nat.Immunol.* 2001. **2**: 675-680.
9. **Akira,S., Uematsu,S., and Takeuchi,O.**, Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* 2006. **124**: 783-801.

10. **Alexopoulou,L., Holt,A.C., Medzhitov,R., and Flavell,R.A.,** Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3. *Nature* 2001. **413**: 732-738.
11. **Alexopoulou,L., Thomas,V., Schnare,M., Lobet,Y., Anguita,J., Schoen,R.T., Medzhitov,R., Fikrig,E., and Flavell,R.A.,** Hyporesponsiveness to vaccination with *Borrelia burgdorferi* OspA in humans and in. *Nat.Med.* 2002. **8**: 878-884.
12. **Aliprantis,A.O., Yang,R.B., Mark,M.R., Suggett,S., Devaux,B., Radolf,J.D., Klimpel,G.R., Godowski,P., and Zychlinsky,A.,** Cell activation and apoptosis by bacterial lipoproteins through toll-like receptor-2. *Science* 1999. **285**: 736-739.
13. **Anderson,K.V., Jurgens,G., and Nusslein-Volhard,C.,** Establishment of dorsal-ventral polarity in the *Drosophila* embryo: genetic studies on the role of the Toll gene product. *Cell* 1985. **42**: 779-789.
14. **Andrejeva,J., Childs,K.S., Young,D.F., Carlos,T.S., Stock,N., Goodbourn,S., and Randall,R.E.,** The V proteins of paramyxoviruses bind the IFN-inducible RNA helicase, mda-5, and inhibit its activation of the IFN-beta promoter. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 2004. **101**: 17264-17269.
15. **Armant,M.A. and Fenton,M.J.,** Toll-like receptors: a family of pattern-recognition receptors in mammals. *Genome Biol.* 2002. **3**: REVIEWS3011.
16. **Artuc,M., Grutzkau,A., Luger,T., and Henz,B.M.,** Expression of MC1- and MC5-receptors on the human mast cell line HMC-1. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 1999. **885**: 364-367.
17. **Asea,A., Rehli,M., Kabingu,E., Boch,J.A., Bare,O., Auron,P.E., Stevenson,M.A., and Calderwood,S.K.,** Novel signal transduction pathway utilized by extracellular HSP70: role of toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4. *J.Biol.Chem.* 2002. **277**: 15028-15034.
18. **Austen,B.M., Smyth,D.G., and Snell,C.R.,** gamma endorphin, alpha endorphin and Met-enkephalin are formed extracellularly from lipotropin C fragment. *Nature* 1977. **269**: 619-621.

19. **Baggiolini,M. and Loetscher,P.**, Chemokines in inflammation and immunity. *Immunol.Today* 2000. **21**: 418-420.
20. **Baker,B.S., Ovigne,J.M., Powles,A.V., Corcoran,S., and Fry,L.**, Normal keratinocytes express Toll-like receptors (TLRs) 1, 2 and 5: modulation of TLR expression in chronic plaque psoriasis. *Br.J.Dermatol.* 2003. **148**: 670-679.
21. **Balachandran,S., Roberts,P.C., Brown,L.E., Truong,H., Pattnaik,A.K., Archer,D.R., and Barber,G.N.**, Essential role for the dsRNA-dependent protein kinase PKR in innate immunity to viral infection. *Immunity.* 2000. **13**: 129-141.
22. **Balachandran,S., Thomas,E., and Barber,G.N.**, A FADD-dependent innate immune mechanism in mammalian cells. *Nature* 2004. **432**: 401-405.
23. **Baldi,L., Brown,K., Franzoso,G., and Siebenlist,U.**, Critical role for lysines 21 and 22 in signal-induced, ubiquitin-mediated proteolysis of I kappa B-alpha. *J.Biol.Chem.* 1996. **271**: 376-379.
24. **Baldwin,A.S., Jr.**, The NF-kappa B and I kappa B proteins: new discoveries and insights. *Annu.Rev.Immunol.* 1996. **14**: 649-683.
25. **Banerjee,A. and Gerondakis,S.**, Coordinating TLR-activated signaling pathways in cells of the immune system. *Immunol.Cell Biol.* 2007. **85**: 420-424.
26. **Banerjee,A., Gugasyan,R., McMahon,M., and Gerondakis,S.**, Diverse Toll-like receptors utilize Tpl2 to activate extracellular signal-regulated kinase (ERK) in hemopoietic cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 2006. **103**: 3274-3279.
27. **Barkett,M. and Gilmore,T.D.**, Control of apoptosis by Rel/NF-kappaB transcription factors. *Oncogene* 1999. **18**: 6910-6924.
28. **Becher,E., Mahnke,K., Brzoska,T., Kalden,D.H., Grabbe,S., and Luger,T.A.**, Human peripheral blood-derived dendritic cells express functional melanocortin receptor MC-1R. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 1999. **885**: 188-195.

29. **Begon,E., Michel,L., Flageul,B., Beaudoin,I., Jean-Louis,F., Bachelez,H., Dubertret,L., and Musette,P.,** Expression, subcellular localization and cytokinic modulation of Toll-like receptors (TLRs) in normal human keratinocytes: TLR2 up-regulation in psoriatic skin. *Eur.J.Dermatol.* 2007. **17**: 497-506.
30. **Benjannet,S., Rondeau,N., Day,R., Chretien,M., and Seidah,N.G.,** PC1 and PC2 are proprotein convertases capable of cleaving proopiomelanocortin at distinct pairs of basic residues. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1991. **88**: 3564-3568.
31. **Beutler,B., Jiang,Z., Georgel,P., Crozat,K., Croker,B., Rutschmann,S., Du,X., and Hoebe,K.,** Genetic analysis of host resistance: Toll-like receptor signaling and immunity at large. *Annu.Rev.Immunol.* 2006. **24**: 353-389.
32. **Bhardwaj,R., Becher,E., Mahnke,K., Hartmeyer,M., Schwarz,T., Scholzen,T., and Luger,T.A.,** Evidence for the differential expression of the functional α -melanocyte-stimulating hormone receptor MC-1 on human monocytes. *J.Immunol.* 1997. **158**: 3378-3384.
33. **Bhardwaj,R.S., Schwarz,A., Becher,E., Mahnke,K., Aragane,Y., Schwarz,T., and Luger,T.A.,** Proopiomelanocortin-derived peptides induce IL-10 production in human monocytes. *J.Immunol.* 1996. **156**: 2517-2521.
34. **Böhm,M., Eickelmann,M., Li,Z., Schneider,S.W., Oji,V., Diederichs,S., Barsh,G.S., Vogt,A., Stieler,K., Blume-Peytavi,U., and Luger,T.A.,** Detection of functionally active melanocortin receptors and evidence for an immunoregulatory activity of alpha-melanocyte-stimulating hormone in human dermal papilla cells. *Endocrinology* 2005. **146**: 4635-4646.
35. **Böhm,M., Metze,D., Schulte,U., Becher,E., Luger,T.A., and Brzoska,T.,** Detection of melanocortin-1 receptor antigenicity on human skin cells in culture and in situ. *Exp.Dermatol.* 1999. **8**: 453-461.
36. **Böhm,M., Schiller,M., Ständer,S., Seltmann,H., Li,Z., Brzoska,T., Metze,D., Schioth,H.B., Skottner,A., Seiffert,K., Zouboulis,C.C., and Luger,T.A.,** Evidence for expression of melanocortin-1 receptor in human sebocytes in vitro and in situ. *J.Invest Dermatol.* 2002. **118**: 533-539.

37. **Boukamp,P., Petrussevska,R.T., Breitkreutz,D., Hornung,J., Markham,A., and Fusenig,N.E.**, Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line. *J.Cell Biol.* 1988. **106**: 761-771.

38. **Brightbill,H.D., Libraty,D.H., Krutzik,S.R., Yang,R.B., Belisle,J.T., Bleharski,J.R., Maitland,M., Norgard,M.V., Plevy,S.E., Smale,S.T., Brennan,P.J., Bloom,B.R., Godowski,P.J., and Modlin,R.L.**, Host defense mechanisms triggered by microbial lipoproteins through toll-like receptors. *Science* 1999. **285**: 732-736.

39. **Brown,K., Gerstberger,S., Carlson,L., Franzoso,G., and Siebenlist,U.**, Control of I kappa B-alpha proteolysis by site-specific, signal-induced phosphorylation. *Science* 1995. **267**: 1485-1488.

40. **Brown,K.D., Claudio,E., and Siebenlist,U.**, The roles of the classical and alternative nuclear factor-kappaB pathways: potential implications for autoimmunity and rheumatoid arthritis. *Arthritis Res.Ther.* 2008. **10**: 212.

41. **Brzoska,T., Kalden,D.H., Scholzen,T., and Luger,T.A.**, Molecular basis of the α -MSH/IL-1 antagonism. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 1999. **885**: 230-238.

42. **Brzoska,T., Luger,T.A., Maaser,C., Abels,C., and Bohm,M.**, Alpha-melanocyte-stimulating hormone and related tripeptides: biochemistry, antiinflammatory and protective effects in vitro and in vivo, and future perspectives for the treatment of immune-mediated inflammatory diseases. *Endocr.Rev.* 2008. **29**: 581-602.

43. **Brzoska,T., Scholzen,T., Becher,E., and Luger,T.A.**, Effect of UV Light on the production of proopiomelanocortin-derived peptides and melanocortins receptors in the skin. In **Altmeyer,P., Hoffmann,K., and Stücker,M.** (Eds.) *Skin cancer and UV radiation*. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg 1997, pp 227-237.

44. **Buchau,A.S., Schaubert,J., Hultsch,T., Stuetz,A., and Gallo,R.L.**, Pimecrolimus enhances TLR2/6-induced expression of antimicrobial peptides in keratinocytes. *J.Invest Dermatol.* 2008. **128**: 2646-2654.

45. **Burns,R.P., Jr., Ferbel,B., Tomai,M., Miller,R., and Gaspari,A.A.**, The imidazoquinolines, imiquimod and R-848, induce functional, but not phenotypic, maturation of human epidermal Langerhans' cells. *Clin.Immunol.* 2000. **94**: 13-23.

46. **Butcher,E.C.**, Leukocyte-endothelial cell recognition: three (or more) steps to specificity and diversity. *Cell* 1991. **67**: 1033-1036.
47. **Byrd-Leifer,C.A., Block,E.F., Takeda,K., Akira,S., and Ding,A.**, The role of MyD88 and TLR4 in the LPS-mimetic activity of Taxol. *Eur.J.Immunol.* 2001. **31**: 2448-2457.
48. **Campos,M.A., Almeida,I.C., Takeuchi,O., Akira,S., Valente,E.P., Procopio,D.O., Travassos,L.R., Smith,J.A., Golenbock,D.T., and Gazzinelli,R.T.**, Activation of Toll-like receptor-2 by glycosylphosphatidylinositol anchors from a protozoan parasite. *J.Immunol.* 2001. **167**: 416-423.
49. **Cario,E. and Podolsky,D.K.**, Differential alteration in intestinal epithelial cell expression of toll-like receptor 3 (TLR3) and TLR4 in inflammatory bowel disease. *Infect.Immun.* 2000. **68**: 7010-7017.
50. **Castell,J.V., Gomez-Lechon,M.J., David,M., Hirano,T., Kishimoto,T., and Heinrich,P.C.**, Recombinant human interleukin-6 (IL-6/BSF-2/HSF) regulates the synthesis of acute phase proteins in human hepatocytes. *FEBS Lett.* 1988. **232**: 347-350.
51. **Catania,A. and Lipton,J.M.**, α -Melanocyte-stimulating hormone in the modulation of host reactions. *Endocr.Rev.* 1993. **14**: 564-576.
52. **Catania,A., Rajora,N., Capsoni,F., Minonzio,F., Star,R.A., and Lipton,J.M.**, The neuropeptide alpha-MSH has specific receptors on neutrophils and reduces chemotaxis in vitro. *Peptides* 1996. **17**: 675-679.
53. **Chakraborty,A.K., Funasaka,Y., Slominski,A., Ermak,G., Hwang,J., Pawelek,J.M., and Ichihashi,M.**, Production and release of proopiomelanocortin (POMC) derived peptides by human melanocytes and keratinocytes in culture: regulation by ultraviolet B. *Biochim.Biophys.Acta* 1996. **1313**: 130-138.
54. **Chen,Z., Gibson,T.B., Robinson,F., Silvestro,L., Pearson,G., Xu,B., Wright,A., Vanderbilt,C., and Cobb,M.H.**, MAP kinases. *Chem.Rev.* 2001. **101**: 2449-2476.
55. **Chen,Z., Hagler,J., Palombella,V.J., Melandri,F., Scherer,D., Ballard,D., and Maniatis,T.**, Signal-induced site-specific

- phosphorylation targets I kappa B alpha to the ubiquitin-proteasome pathway. *Genes Dev.* 1995. **9**: 1586-1597.
56. **Chen,Z.J.**, Ubiquitin signalling in the NF-kappaB pathway. *Nat.Cell Biol.* 2005. **7**: 758-765.
57. **Chhajlani,V. and Wikberg,J.E.**, Molecular cloning and expression of the human melanocyte stimulating hormone receptor cDNA. *FEBS Lett.* 1992. **309**: 417-420.
58. **Chu,W.M., Ostertag,D., Li,Z.W., Chang,L., Chen,Y., Hu,Y., Williams,B., Perrault,J., and Karin,M.**, JNK2 and IKKbeta are required for activating the innate response to viral infection. *Immunity.* 1999. **11**: 721-731.
59. **Chuang,T. and Ulevitch,R.J.**, Identification of hTLR10: a novel human Toll-like receptor preferentially expressed in immune cells. *Biochim.Biophys.Acta* 2001. **1518**: 157-161.
60. **Chuang,T.H. and Ulevitch,R.J.**, Cloning and characterization of a sub-family of human toll-like receptors: hTLR7, hTLR8 and hTLR9. *Eur.Cytokine Netw.* 2000. **11**: 372-378.
61. **Cone,R.D., Lu,D., Koppula,S., Vage,D.I., Klungland,H., Boston,B., Chen,W., Orth,D.N., Pouton,C., and Kesterson,R.A.**, The melanocortin receptors: agonists, antagonists, and the hormonal control of pigmentation. *Recent Prog.Horm.Res.* 1996. **51**: 287-317.
62. **Crews,C.M., Alessandrini,A., and Erikson,R.L.**, The primary structure of MEK, a protein kinase that phosphorylates the ERK gene product. *Science* 1992. **258**: 478-480.
63. **Curry,J.L., Qin,J.Z., Bonish,B., Carrick,R., Bacon,P., Panella,J., Robinson,J., and Nickoloff,B.J.**, Innate immune-related receptors in normal and psoriatic skin. *Arch.Pathol.Lab Med.* 2003. **127**: 178-186.
64. **Dai,X., Sayama,K., Tohyama,M., Shirakata,Y., Yang,L., Hirakawa,S., Tokumar,S., and Hashimoto,K.**, The NF-kappaB, p38 MAPK and STAT1 pathways differentially regulate the dsRNA-mediated innate immune responses of epidermal keratinocytes. *Int.Immunol.* 2008. **20**: 901-909.

65. **Dan,I., Watanabe,N.M., and Kusumi,A.,** The Ste20 group kinases as regulators of MAP kinase cascades. *Trends Cell Biol.* 2001. **11**: 220-230.
66. **Dean,J.L., Brook,M., Clark,A.R., and Saklatvala,J.,** p38 mitogen-activated protein kinase regulates cyclooxygenase-2 mRNA stability and transcription in lipopolysaccharide-treated human monocytes. *J.Biol.Chem.* 1999. **274**: 264-269.
67. **DeBold,C.R., Nicholson,W.E., and Orth,D.N.,** Immunoreactive proopiomelanocortin (POMC) peptides and POMC-like messenger ribonucleic acid are present in many rat nonpituitary tissues. *Endocrinology* 1988. **122**: 2648-2657.
68. **Deng,L., Wang,C., Spencer,E., Yang,L., Braun,A., You,J., Slaughter,C., Pickart,C., and Chen,Z.J.,** Activation of the I κ B kinase complex by TRAF6 requires a dimeric ubiquitin-conjugating enzyme complex and a unique polyubiquitin chain. *Cell* 2000. **103**: 351-361.
69. **Dent,P., Haser,W., Haystead,T.A., Vincent,L.A., Roberts,T.M., and Sturgill,T.W.,** Activation of mitogen-activated protein kinase kinase by v-Raf in NIH 3T3 cells and in vitro. *Science* 1992. **257**: 1404-1407.
70. **Detmers,P.A., Lo,S.K., Olsen-Egbert,E., Walz,A., Baggiolini,M., and Cohn,Z.A.,** Neutrophil-activating protein 1/interleukin 8 stimulates the binding activity of the leukocyte adhesion receptor CD11b/CD18 on human neutrophils. *J.Exp.Med.* 1990. **171**: 1155-1162.
71. **DiDonato,J., Mercurio,F., Rosette,C., Wu-Li,J., Suyang,H., Ghosh,S., and Karin,M.,** Mapping of the inducible I κ B phosphorylation sites that signal its ubiquitination and degradation. *Mol.Cell Biol.* 1996. **16**: 1295-1304.
72. **Diebold,S.S., Kaisho,T., Hemmi,H., Akira,S., and Reis e Sousa,** Innate antiviral responses by means of TLR7-mediated recognition of single-stranded RNA. *Science* 2004. **303**: 1529-1531.
73. **Dillon,S., Agrawal,A., Van,D.T., Landreth,G., McCauley,L., Koh,A., Maliszewski,C., Akira,S., and Pulendran,B.,** A Toll-like receptor 2 ligand stimulates Th2 responses in vivo, via induction of extracellular signal-regulated kinase mitogen-activated protein kinase and c-Fos in dendritic cells. *J.Immunol.* 2004. **172**: 4733-4743.

74. **Du,X., Poltorak,A., Wei,Y., and Beutler,B.,** Three novel mammalian toll-like receptors: gene structure, expression, and evolution. *Eur.Cytokine Netw.* 2000. **11**: 362-371.
75. **Dumitru,C.D., Ceci,J.D., Tsatsanis,C., Kontoyiannis,D., Stamatakis,K., Lin,J.H., Patriotis,C., Jenkins,N.A., Copeland,N.G., Kollias,G., and Tsihchlis,P.N.,** TNF-alpha induction by LPS is regulated posttranscriptionally via a Tpl2/ERK-dependent pathway. *Cell* 2000. **103**: 1071-1083.
76. **Eaves-Pyles,T.D., Wong,H.R., Odoms,K., and Pyles,R.B.,** Salmonella flagellin-dependent proinflammatory responses are localized to the conserved amino and carboxyl regions of the protein. *J.Immunol.* 2001. **167**: 7009-7016.
77. **Eipper,B.A. and Mains,R.E.,** Structure and biosynthesis of pro-adrenocorticotropin/endorphin and related peptides. *Endocr.Rev.* 1980. **1**: 1-27.
78. **Eliopoulos,A.G., Dumitru,C.D., Wang,C.C., Cho,J., and Tsihchlis,P.N.,** Induction of COX-2 by LPS in macrophages is regulated by Tpl2-dependent CREB activation signals. *EMBO J.* 2002. **21**: 4831-4840.
79. **Equils,O., Madak,Z., Liu,C., Michelsen,K.S., Bulut,Y., and Lu,D.,** Rac1 and Toll-IL-1 receptor domain-containing adapter protein mediate Toll-like receptor 4 induction of HIV-long terminal repeat. *J.Immunol.* 2004. **172**: 7642-7646.
80. **Errede,B., Cade,R.M., Yashar,B.M., Kamada,Y., Levin,D.E., Irie,K., and Matsumoto,K.,** Dynamics and organization of MAP kinase signal pathways. *Mol.Reprod.Dev.* 1995. **42**: 477-485.
81. **Farooqui,J.Z., Medrano,E.E., bdel-Malek,Z., and Nordlund,J.,** The expression of proopiomelanocortin and various POMC-derived peptides in mouse and human skin. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 1993. **680**: 508-510.
82. **Fitzgerald,K.A., McWhirter,S.M., Faia,K.L., Rowe,D.C., Latz,E., Golenbock,D.T., Coyle,A.J., Liao,S.M., and Maniatis,T.,** IKKepsilon and TBK1 are essential components of the IRF3 signaling pathway. *Nat.Immunol.* 2003. **4**: 491-496.

83. **Fitzgerald,K.A. and O'Neill,L.A.**, The role of the interleukin-1/Toll-like receptor superfamily in inflammation and host defence. *Microbes.Infect.* 2000. **2**: 933-943.
84. **Fitzgerald,K.A., Palsson-McDermott,E.M., Bowie,A.G., Jefferies,C.A., Mansell,A.S., Brady,G., Brint,E., Dunne,A., Gray,P., Harte,M.T., McMurray,D., Smith,D.E., Sims,J.E., Bird,T.A., and O'Neill,L.A.**, Mal (MyD88-adaptor-like) is required for Toll-like receptor-4 signal transduction. *Nature* 2001. **413**: 78-83.
85. **Force,T., Bonventre,J.V., Heidecker,G., Rapp,U., Avruch,J., and Kyriakis,J.M.**, Enzymatic characteristics of the c-Raf-1 protein kinase. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1994. **91**: 1270-1274.
86. **Galgani,M., De,R., V, De,S.S., Leonardi,A., D'Oro,U., Napolitani,G., Masci,A.M., Zappacosta,S., and Racioppi,L.**, Cyclic AMP modulates the functional plasticity of immature dendritic cells by inhibiting Src-like kinases through protein kinase A-mediated signaling. *J.Biol.Chem.* 2004. **279**: 32507-32514.
87. **Gantz,I., Miwa,H., Konda,Y., Shimoto,Y., Tashiro,T., Watson,S.J., DelValle,J., and Yamada,T.**, Molecular cloning, expression, and gene localization of a fourth melanocortin receptor. *J.Biol.Chem.* 1993. **268**: 15174-15179.
88. **Gao,J.J., Filla,M.B., Fultz,M.J., Vogel,S.N., Russell,S.W., and Murphy,W.J.**, Autocrine/paracrine IFN- α mediates the lipopolysaccharide-induced activation of transcription factor Stat1 α in mouse macrophages: pivotal role of Stat1 α in induction of the inducible nitric oxide synthase gene. *J.Immunol.* 1998. **161**: 4803-4810.
89. **Geiger,T., Andus,T., Klapproth,J., Hirano,T., Kishimoto,T., and Heinrich,P.C.**, Induction of rat acute-phase proteins by interleukin 6 in vivo. *Eur.J.Immunol.* 1988. **18**: 717-721.
90. **Genedani,S., Bernardi,M., Baldini,M.G., and Bertolini,A.**, Influence of CRF and α -MSH on the migration of human monocytes in vitro. *Neuropeptides* 1992. **23**: 99-102.
91. **Ghosh,S., May,M.J., and Kopp,E.B.**, NF- κ B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses. *Annu.Rev.Immunol.* 1998. **16**: 225-260.

92. **Gohda,J., Matsumura,T., and Inoue,J.**, Cutting edge: TNFR-associated factor (TRAF) 6 is essential for MyD88-dependent pathway but not toll/IL-1 receptor domain-containing adaptor-inducing IFN-beta (TRIF)-dependent pathway in TLR signaling. *J.Immunol.* 2004. **173**: 2913-2917.
93. **Goldsmith,M., Avni,D., Ernst,O., Glucksam,Y., Levy-Rimler,G., Meijler,M.M., and Zor,T.**, Synergistic IL-10 induction by LPS and the ceramide-1-phosphate analog PCERA-1 is mediated by the cAMP and p38 MAP kinase pathways. *Mol.Immunol.* 2009. **46**: 1979-1987.
94. **Gorden,K.B., Gorski,K.S., Gibson,S.J., Kedi,R.M., Kieper,W.C., Qiu,X., Tomai,M.A., Alkan,S.S., and Vasilakos,J.P.**, Synthetic TLR agonists reveal functional differences between human TLR7 and TLR8. *J.Immunol.* 2005. **174**: 1259-1268.
95. **Grabbe,S., Bhardwaj,R.S., Mahnke,K., Simon,M.M., Schwarz,T., and Luger,T.A.**, α -Melanocyte-stimulating hormone induces hapten-specific tolerance in mice. *J.Immunol.* 1996. **156**: 473-478.
96. **Grange,P.A., Raingeaud,J., Calvez,V., and Dupin,N.**, Nicotinamide inhibits Propionibacterium acnes-induced IL-8 production in keratinocytes through the NF-kappaB and MAPK pathways. *J.Dermatol.Sci.* 2009. **56**: 106-112.
97. **Graves,D.T. and Jiang,Y.**, Chemokines, a family of chemotactic cytokines. *Crit Rev.Oral Biol.Med.* 1995. **6**: 109-118.
98. **Grutzkau,A., Henz,B.M., Kirchhof,L., Luger,T., and Artuc,M.**, α -Melanocyte stimulating hormone acts as a selective inducer of secretory functions in human mast cells. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 2000. **278**: 14-19.
99. **Gustin,M.C., Albertyn,J., Alexander,M., and Davenport,K.**, MAP kinase pathways in the yeast Saccharomyces cerevisiae. *Microbiol.Mol.Biol.Rev.* 1998. **62**: 1264-1300.
100. **Habich,C., Baumgart,K., Kolb,H., and Burkart,V.**, The receptor for heat shock protein 60 on macrophages is saturable, specific, and distinct from receptors for other heat shock proteins. *J.Immunol.* 2002. **168**: 569-576.

101. **Hacker,H., Mischak,H., Miethke,T., Liptay,S., Schmid,R., Sparwasser,T., Heeg,K., Lipford,G.B., and Wagner,H.,** CpG-DNA-specific activation of antigen-presenting cells requires stress kinase activity and is preceded by non-specific endocytosis and endosomal maturation. *EMBO J.* 1998. **17**: 6230-6240.
102. **Hacker,H., Redecke,V., Blagoev,B., Kratchmarova,I., Hsu,L.C., Wang,G.G., Kamps,M.P., Raz,E., Wagner,H., Hacker,G., Mann,M., and Karin,M.,** Specificity in Toll-like receptor signalling through distinct effector functions of TRAF3 and TRAF6. *Nature* 2006. **439**: 204-207.
103. **Hajishengallis,G., Wang,M., Liang,S., Triantafilou,M., and Triantafilou,K.,** Pathogen induction of CXCR4/TLR2 cross-talk impairs host defense function. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 2008. **105**: 13532-13537.
104. **Hartmeyer,M., Scholzen,T., Becher,E., Bhardwaj,R.S., Schwarz,T., and Luger,T.A.,** Human dermal microvascular endothelial cells express the melanocortin receptor type 1 and produce increased levels of IL-8 upon stimulation with α -melanocyte-stimulating hormone. *J.Immunol.* 1997. **159**: 1930-1937.
105. **Harzenetter,M.D., Novotny,A.R., Gais,P., Molina,C.A., Altmayr,F., and Holzmann,B.,** Negative regulation of TLR responses by the neuropeptide CGRP is mediated by the transcriptional repressor ICER. *J.Immunol.* 2007. **179**: 607-615.
106. **Hashimoto,C., Hudson,K.L., and Anderson,K.V.,** The Toll gene of *Drosophila*, required for dorsal-ventral embryonic polarity, appears to encode a transmembrane protein. *Cell* 1988. **52**: 269-279.
107. **Hatada,E.N., Naumann,M., and Scheidereit,C.,** Common structural constituents confer I kappa B activity to NF-kappa B p105 and I kappa B/MAD-3. *EMBO J.* 1993. **12**: 2781-2788.
108. **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.,** The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5. *Nature* 2001. **410**: 1099-1103.
109. **Haycock,J.W., Wagner,M., Morandini,R., Ghanem,G., Rennie,I.G., and Mac,N.S.,** α -melanocyte-stimulating hormone inhibits NF-kappaB

- activation in human melanocytes and melanoma cells. *J. Invest Dermatol.* 1999. **113**: 560-566.
110. **Haycock, J.W., Wagner, M., Morandini, R., Ghanem, G., Rennie, I.G., and MacNeil, S.,** α -MSH immunomodulation acts via rel/NF- κ B in cutaneous and ocular melanocytes and in melanoma cells. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1999. **885**: 396-399.
111. **Haynes, L.M., Moore, D.D., Kurt-Jones, E.A., Finberg, R.W., Anderson, L.J., and Tripp, R.A.,** Involvement of toll-like receptor 4 in innate immunity to respiratory syncytial virus. *J. Virol.* 2001. **75**: 10730-10737.
112. **Haziot, A., Ferrero, E., Kontgen, F., Hijiya, N., Yamamoto, S., Silver, J., Stewart, C.L., and Goyert, S.M.,** Resistance to endotoxin shock and reduced dissemination of gram-negative bacteria in CD14-deficient mice. *Immunity.* 1996. **4**: 407-414.
113. **Hedley, S.J., Gawkrödger, D.J., Weetman, A.P., Morandini, R., Boeynaems, J.M., Ghanem, G., and Neil, S.M.,** α -Melanocyte-stimulating hormone inhibits TNF- α stimulated intercellular adhesion molecule-1 expression in normal cutaneous human melanocytes and in melanoma cell lines. *Br. J. Dermatol.* 1998. **138**: 536-543.
114. **Heil, F., Ahmad-Nejad, P., Hemmi, H., Hochrein, H., Ampenberger, F., Gellert, T., Dietrich, H., Lipford, G., Takeda, K., Akira, S., Wagner, H., and Bauer, S.,** The Toll-like receptor 7 (TLR7)-specific stimulus loxoribine uncovers a strong relationship within the TLR7, 8 and 9 subfamily. *Eur. J. Immunol.* 2003. **33**: 2987-2997.
115. **Heil, F., Hemmi, H., Hochrein, H., Ampenberger, F., Kirschning, C., Akira, S., Lipford, G., Wagner, H., and Bauer, S.,** Species-specific recognition of single-stranded RNA via toll-like receptor 7 and 8. *Science* 2004. **303**: 1526-1529.
116. **Heine, H. and Lien, E.,** Toll-like receptors and their function in innate and adaptive immunity. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 2003. **130**: 180-192.
117. **Heissmeyer, V., Krappmann, D., Hatada, E.N., and Scheidereit, C.,** Shared pathways of I κ B kinase-induced SCF(betaTrCP)-mediated ubiquitination and degradation for the NF-kappaB precursor p105 and I κ Balpha. *Mol. Cell Biol.* 2001. **21**: 1024-1035.

118. **Heissmeyer,V., Krappmann,D., Wulczyn,F.G., and Scheidereit,C.,** NF-kappaB p105 is a target of IkappaB kinases and controls signal induction of Bcl-3-p50 complexes. *EMBO J.* 1999. **18**: 4766-4778.
119. **Hemmi,H., Kaisho,T., Takeuchi,O., Sato,S., Sanjo,H., Hoshino,K., Horiuchi,T., Tomizawa,H., Takeda,K., and Akira,S.,** Small anti-viral compounds activate immune cells via the TLR7 MyD88-dependent signaling pathway. *Nat.Immunol.* 2002. **3**: 196-200.
120. **Hemmi,H., Takeuchi,O., Kawai,T., Kaisho,T., Sato,S., Sanjo,H., Matsumoto,M., Hoshino,K., Wagner,H., Takeda,K., and Akira,S.,** A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature* 2000. **408**: 740-745.
121. **Hemmi,H., Takeuchi,O., Sato,S., Yamamoto,M., Kaisho,T., Sanjo,H., Kawai,T., Hoshino,K., Takeda,K., and Akira,S.,** The roles of two IkappaB kinase-related kinases in lipopolysaccharide and double stranded RNA signaling and viral infection. *J.Exp.Med.* 2004. **199**: 1641-1650.
122. **Hickey,F.B., Brereton,C.F., and Mills,K.H.,** Adenylate cyclase toxin of Bordetella pertussis inhibits TLR-induced IRF-1 and IRF-8 activation and IL-12 production and enhances IL-10 through MAPK activation in dendritic cells. *J.Leukoc.Biol.* 2008. **84**: 234-243.
123. **Hirano,T., Taga,T., Nakano,N., Yasukawa,K., Kashiwamura,S., Shimizu,K., Nakajima,K., Pyun,K.H., and Kishimoto,T.,** Purification to homogeneity and characterization of human B-cell differentiation factor (BCDF or BSFp-2). *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1985. **82**: 5490-5494.
124. **Hirschfeld,M., Kirschning,C.J., Schwandner,R., Wesche,H., Weis,J.H., Wooten,R.M., and Weis,J.J.,** Cutting edge: inflammatory signaling by Borrelia burgdorferi lipoproteins is mediated by toll-like receptor 2. *J.Immunol.* 1999. **163**: 2382-2386.
125. **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.,** Signaling by toll-like receptor 2 and 4 agonists results in differential gene expression in murine macrophages. *Infect.Immun.* 2001. **69**: 1477-1482.
126. **Hoebe,K., Du,X., Georgel,P., Janssen,E., Tabet,K., Kim,S.O., Goode,J., Lin,P., Mann,N., Mudd,S., Crozat,K., Sovath,S., Han,J., and**

- Beutler,B.**, Identification of Lps2 as a key transducer of MyD88-independent TIR signalling. *Nature* 2003. **424**: 743-748.
127. **Honda,K., Yanai,H., Mizutani,T., Negishi,H., Shimada,N., Suzuki,N., Ohba,Y., Takaoka,A., Yeh,W.C., and Taniguchi,T.**, Role of a transductional-transcriptional processor complex involving MyD88 and IRF-7 in Toll-like receptor signaling. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 2004. **101**: 15416-15421.
128. **Honda,K., Yanai,H., Negishi,H., Asagiri,M., Sato,M., Mizutani,T., Shimada,N., Ohba,Y., Takaoka,A., Yoshida,N., and Taniguchi,T.**, IRF-7 is the master regulator of type-I interferon-dependent immune responses. *Nature* 2005. **434**: 772-777.
129. **Horng,T., Barton,G.M., Flavell,R.A., and Medzhitov,R.**, The adaptor molecule TIRAP provides signalling specificity for Toll-like receptors. *Nature* 2002. **420**: 329-333.
130. **Hoshino,K., Kaisho,T., Iwabe,T., Takeuchi,O., and Akira,S.**, Differential involvement of IFN-beta in Toll-like receptor-stimulated dendritic cell activation. *Int.Immunol.* 2002. **14**: 1225-1231.
131. **Hoshino,K., Sugiyama,T., Matsumoto,M., Tanaka,T., Saito,M., Hemmi,H., Ohara,O., Akira,S., and Kaisho,T.**, IkappaB kinase-alpha is critical for interferon-alpha production induced by Toll-like receptors 7 and 9. *Nature* 2006. **440**: 949-953.
132. **Hoshino,K., Takeuchi,O., Kawai,T., Sanjo,H., Ogawa,T., Takeda,Y., Takeda,K., and Akira,S.**, Cutting edge: Toll-like receptor 4 (TLR4)-deficient mice are hyporesponsive to lipopolysaccharide: evidence for TLR4 as the Lps gene product. *J.Immunol.* 1999. **162**: 3749-3752.
133. **Howell,M.D., Gallo,R.L., Boguniewicz,M., Jones,J.F., Wong,C., Streib,J.E., and Leung,D.Y.**, Cytokine milieu of atopic dermatitis skin subverts the innate immune response to vaccinia virus. *Immunity.* 2006. **24**: 341-348.
134. **Huang,H., Park,P.H., McMullen,M.R., and Nagy,L.E.**, Mechanisms for the anti-inflammatory effects of adiponectin in macrophages. *J.Gastroenterol.Hepatol.* 2008. **23 Suppl 1**: S50-S53.

135. **Huang,Q., Yang,J., Lin,Y., Walker,C., Cheng,J., Liu,Z.G., and Su,B.,** Differential regulation of interleukin 1 receptor and Toll-like receptor signaling by MEKK3. *Nat.Immunol.* 2004. **5**: 98-103.
136. **Huang,Q.H., Entwistle,M.L., Alvaro,J.D., Duman,R.S., Hruby,V.J., and Tatro,J.B.,** Antipyretic role of endogenous melanocortins mediated by central melanocortin receptors during endotoxin-induced fever. *J.Neurosci.* 1997. **17**: 3343-3351.
137. **Huber,A.R., Kunkel,S.L., Todd,R.F., III, and Weiss,S.J.,** Regulation of transendothelial neutrophil migration by endogenous interleukin-8. *Science* 1991. **254**: 99-102.
138. **Hugot,J.P., Chamaillard,M., Zouali,H., Lesage,S., Cezard,J.P., Belaiche,J., Almer,S., Tysk,C., O'Morain,C.A., Gassull,M., Binder,V., Finkel,Y., Cortot,A., Modigliani,R., Laurent-Puig,P., Gower-Rousseau,C., Macry,J., Colombel,J.F., Sahbatou,M., and Thomas,G.,** Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* 2001. **411**: 599-603.
139. **Ichiyama,T., Sakai,T., Catania,A., Barsh,G.S., Furukawa,S., and Lipton,J.M.,** Inhibition of peripheral NF- κ B activation by central action of α -melanocyte-stimulating hormone. *J.Neuroimmunol.* 1999. **99**: 211-217.
140. **Ikebuchi,K., Wong,G.G., Clark,S.C., Ihle,J.N., Hirai,Y., and Ogawa,M.,** Interleukin 6 enhancement of interleukin 3-dependent proliferation of multipotential hemopoietic progenitors. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1987. **84**: 9035-9039.
141. **Ito,T., Ito,N., Bettermann,A., Tokura,Y., Takigawa,M., and Paus,R.,** Collapse and restoration of MHC class-I-dependent immune privilege: exploiting the human hair follicle as a model. *Am.J.Pathol.* 2004. **164**: 623-634.
142. **Janeway,C.A., Jr. and Medzhitov,R.,** Innate immune recognition. *Annu.Rev.Immunol.* 2002. **20**: 197-216.
143. **Jiang,J., Sharma,S.D., Hruby,V.J., Bentley,D.L., Fink,J.L., and Hadley,M.E.,** Human epidermal melanocyte and keratinocyte melanocortin receptors: visualization by melanotropic peptide conjugated microspheres (latex beads). *Pigment Cell Res.* 1996. **9**: 240-247.

144. **Jiang,Q., Akashi,S., Miyake,K., and Petty,H.R.**, Lipopolysaccharide induces physical proximity between CD14 and toll-like receptor 4 (TLR4) prior to nuclear translocation of NF-kappa B. *J.Immunol.* 2000. **165**: 3541-3544.
145. **Johnson,G.B., Brunn,G.J., Kodaira,Y., and Platt,J.L.**, Receptor-mediated monitoring of tissue well-being via detection of soluble heparan sulfate by Toll-like receptor 4. *J.Immunol.* 2002. **168**: 5233-5239.
146. **Johnson,G.L. and Lapadat,R.**, Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases. *Science* 2002. **298**: 1911-1912.
147. **Jorritsma,P.J., Brogdon,J.L., and Bottomly,K.**, Role of TCR-induced extracellular signal-regulated kinase activation in the regulation of early IL-4 expression in naive CD4+ T cells. *J.Immunol.* 2003. **170**: 2427-2434.
148. **Jurk,M., Heil,F., Vollmer,J., Schetter,C., Krieg,A.M., Wagner,H., Lipford,G., and Bauer,S.**, Human TLR7 or TLR8 independently confer responsiveness to the antiviral compound R-848. *Nat.Immunol.* 2002. **3**: 499.
149. **Kaisho,T. and Akira,S.**, Toll-like receptors as adjuvant receptors. *Biochim.Biophys.Acta* 2002. **1589**: 1-13.
150. **Kaisho,T., Takeuchi,O., Kawai,T., Hoshino,K., and Akira,S.**, Endotoxin-induced maturation of MyD88-deficient dendritic cells. *J.Immunol.* 2001. **166**: 5688-5694.
151. **Kalden,D.H., Scholzen,T., Brzoska,T., and Luger,T.A.**, Mechanisms of the antiinflammatory effects of α -MSH. Role of transcription factor NF- κ B and adhesion molecule expression. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 1999. **885**: 254-261.
152. **Kamthong,P.J. and Wu,M.**, Inhibitor of nuclear factor-kappaB induction by cAMP antagonizes interleukin-1-induced human macrophage-colony-stimulating-factor expression. *Biochem.J.* 2001. **356**: 525-530.
153. **Kang,D.C., Gopalkrishnan,R.V., Wu,Q., Jankowsky,E., Pyle,A.M., and Fisher,P.B.**, mda-5: An interferon-inducible putative RNA helicase with double-stranded RNA-dependent ATPase activity and melanoma

- growth-suppressive properties. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 2002. **99**: 637-642.
154. **Karin,M.**, How NF-kappaB is activated: the role of the IkappaB kinase (IKK) complex. *Oncogene* 1999. **18**: 6867-6874.
155. **Karin,M. and Ben Neriah,Y.**, Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF-[kappa]B activity. *Annu.Rev.Immunol.* 2000. **18**: 621-663.
156. **Kaufmann,A., Musset,B., Limberg,S.H., Renigunta,V., Sus,R., Dalpke,A.H., Heeg,K.M., Robaye,B., and Hanley,P.J.**, "Host tissue damage" signal ATP promotes non-directional migration and negatively regulates toll-like receptor signaling in human monocytes. *J.Biol.Chem.* 2005. **280**: 32459-32467.
157. **Kawai,K., Shimura,H., Minagawa,M., Ito,A., Tomiyama,K., and Ito,M.**, Expression of functional Toll-like receptor 2 on human epidermal keratinocytes. *J.Dermatol.Sci.* 2002. **30**: 185-194.
158. **Kawai,T. and Akira,S.**, Toll-like receptor downstream signaling. *Arthritis Res.Ther.* 2005. **7**: 12-19.
159. **Kawai,T. and Akira,S.**, Innate immune recognition of viral infection. *Nat.Immunol.* 2006. **7**: 131-137.
160. **Kawai,T. and Akira,S.**, Pathogen recognition with Toll-like receptors. *Curr.Opin.Immunol.* 2005. **17**: 338-344.
161. **Kawai,T. and Akira,S.**, TLR signaling. *Cell Death.Differ.* 2006. **13**: 816-825.
162. **Kawai,T., Sato,S., Ishii,K.J., Coban,C., Hemmi,H., Yamamoto,M., Terai,K., Matsuda,M., Inoue,J., Uematsu,S., Takeuchi,O., and Akira,S.**, Interferon-alpha induction through Toll-like receptors involves a direct interaction of IRF7 with MyD88 and TRAF6. *Nat.Immunol.* 2004. **5**: 1061-1068.
163. **Kawai,T., Takahashi,K., Sato,S., Coban,C., Kumar,H., Kato,H., Ishii,K.J., Takeuchi,O., and Akira,S.**, IPS-1, an adaptor triggering RIG-I- and Mda5-mediated type I interferon induction. *Nat.Immunol.* 2005. **6**: 981-988.

164. **Kawasaki,K., Akashi,S., Shimazu,R., Yoshida,T., Miyake,K., and Nishijima,M.**, Mouse toll-like receptor 4.MD-2 complex mediates lipopolysaccharide-mimetic signal transduction by Taxol. *J.Biol.Chem.* 2000. **275**: 2251-2254.
165. **Kiechl,S., Lorenz,E., Reindl,M., Wiedermann,C.J., Oberhollenzer,F., Bonora,E., Willeit,J., and Schwartz,D.A.**, Toll-like receptor 4 polymorphisms and atherogenesis. *N.Engl.J.Med.* 2002. **347**: 185-192.
166. **Kobayashi,K., Hernandez,L.D., Galan,J.E., Janeway,C.A., Jr., Medzhitov,R., and Flavell,R.A.**, IRAK-M is a negative regulator of Toll-like receptor signaling. *Cell* 2002. **110**: 191-202.
167. **Kogut,M.H., Genovese,K.J., and He,H.**, Flagellin and lipopolysaccharide stimulate the MEK-ERK signaling pathway in chicken heterophils through differential activation of the small GTPases, Ras and Rap1. *Mol.Immunol.* 2007. **44**: 1729-1736.
168. **Koike,K., Nakahata,T., Takagi,M., Kobayashi,T., Ishiguro,A., Tsuji,K., Naganuma,K., Okano,A., Akiyama,Y., and Akabane,T.**, Synergism of BSF-2/interleukin 6 and interleukin 3 on development of multipotential hemopoietic progenitors in serum-free culture. *J.Exp.Med.* 1988. **168**: 879-890.
169. **Kolch,W.**, Meaningful relationships: the regulation of the Ras/Raf/MEK/ERK pathway by protein interactions. *Biochem.J.* 2000. **351 Pt 2**: 289-305.
170. **Kollisch,G., Kalali,B.N., Voelcker,V., Wallich,R., Behrendt,H., Ring,J., Bauer,S., Jakob,T., Mempel,M., and Ollert,M.**, Various members of the Toll-like receptor family contribute to the innate immune response of human epidermal keratinocytes. *Immunology* 2005. **114**: 531-541.
171. **Kosako,H., Gotoh,Y., Matsuda,S., Ishikawa,M., and Nishida,E.**, Xenopus MAP kinase activator is a serine/threonine/tyrosine kinase activated by threonine phosphorylation. *EMBO J.* 1992. **11**: 2903-2908.
172. **Kovarik,P., Stoiber,D., Novy,M., and Decker,T.**, Stat1 combines signals derived from IFN-gamma and LPS receptors during macrophage activation. *EMBO J.* 1998. **17**: 3660-3668.

173. **Krappmann,D., Wegener,E., Sunami,Y., Esen,M., Thiel,A., Mordmuller,B., and Scheidereit,C.,** The IkappaB kinase complex and NF-kappaB act as master regulators of lipopolysaccharide-induced gene expression and control subordinate activation of AP-1. *Mol.Cell Biol.* 2004. **24**: 6488-6500.
174. **Krieger,D.T. and Liotta,A.S.,** Pituitary hormones in brain: where, how, and why? *Science* 1979. **205**: 366-372.
175. **Krishnan,J., Selvarajoo,K., Tsuchiya,M., Lee,G., and Choi,S.,** Toll-like receptor signal transduction. *Exp.Mol.Med.* 2007. **39**: 421-438.
176. **Kupper,T.S. and Fuhlbrigge,R.C.,** Immune surveillance in the skin: mechanisms and clinical consequences. *Nat.Rev.Immunol.* 2004. **4**: 211-222.
177. **Kyriakis,J.M., App,H., Zhang,X.F., Banerjee,P., Brautigan,D.L., Rapp,U.R., and Avruch,J.,** Raf-1 activates MAP kinase-kinase. *Nature* 1992. **358**: 417-421.
178. **Kyriakis,J.M. and Avruch,J.,** Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation. *Physiol Rev.* 2001. **81**: 807-869.
179. **Labbe,O., Desarnaud,F., Eggerickx,D., Vassart,G., and Parmentier,M.,** Molecular cloning of a mouse melanocortin 5 receptor gene widely expressed in peripheral tissues. *Biochemistry* 1994. **33**: 4543-4549.
180. **Lamothe,B., Besse,A., Campos,A.D., Webster,W.K., Wu,H., and Darnay,B.G.,** Site-specific Lys-63-linked tumor necrosis factor receptor-associated factor 6 auto-ubiquitination is a critical determinant of I kappa B kinase activation. *J.Biol.Chem.* 2007. **282**: 4102-4112.
181. **Lande,R., Gregorio,J., Facchinetti,V., Chatterjee,B., Wang,Y.H., Homey,B., Cao,W., Wang,Y.H., Su,B., Nestle,F.O., Zal,T., Mellman,I., Schroder,J.M., Liu,Y.J., and Gilliet,M.,** Plasmacytoid dendritic cells sense self-DNA coupled with antimicrobial peptide. *Nature* 2007. **449**: 564-569.
182. **Lebre,M.C., van der Aar,A.M., van,B.L., van Capel,T.M., Schuitemaker,J.H., Kapsenberg,M.L., and de Jong,E.C.,** Human

- keratinocytes express functional Toll-like receptor 3, 4, 5, and 9. *J. Invest Dermatol.* 2007. **127**: 331-341.
183. **Lee, F.S., Hagler, J., Chen, Z.J., and Maniatis, T.**, Activation of the I κ B α kinase complex by MEK1, a kinase of the JNK pathway. *Cell* 1997. **88**: 213-222.
184. **Lee, H.M., Yuk, J.M., Shin, D.M., Yang, C.S., Kim, K.K., Choi, D.K., Liang, Z.L., Kim, J.M., Jeon, B.H., Kim, C.D., Lee, J.H., and Jo, E.K.**, Apurinic/aprimidinic endonuclease 1 is a key modulator of keratinocyte inflammatory responses. *J. Immunol.* 2009. **183**: 6839-6848.
185. **Lee, J., Chuang, T.H., Redecke, V., She, L., Pitha, P.M., Carson, D.A., Raz, E., and Cottam, H.B.**, Molecular basis for the immunostimulatory activity of guanine nucleoside analogs: activation of Toll-like receptor 7. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 2003. **100**: 6646-6651.
186. **Lehner, M.D., Morath, S., Michelsen, K.S., Schumann, R.R., and Hartung, T.**, Induction of cross-tolerance by lipopolysaccharide and highly purified lipoteichoic acid via different Toll-like receptors independent of paracrine mediators. *J. Immunol.* 2001. **166**: 5161-5167.
187. **Lemaitre, B., Nicolas, E., Michaut, L., Reichhart, J.M., and Hoffmann, J.A.**, The dorsoventral regulatory gene cassette spatzle/Toll/cactus controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell* 1996. **86**: 973-983.
188. **Levy, O., Coughlin, M., Cronstein, B.N., Roy, R.M., Desai, A., and Wessels, M.R.**, The adenosine system selectively inhibits TLR-mediated TNF- α production in the human newborn. *J. Immunol.* 2006. **177**: 1956-1966.
189. **Levy, O., Zarembek, K.A., Roy, R.M., Cywes, C., Godowski, P.J., and Wessels, M.R.**, Selective impairment of TLR-mediated innate immunity in human newborns: neonatal blood plasma reduces monocyte TNF- α induction by bacterial lipopeptides, lipopolysaccharide, and imiquimod, but preserves the response to R-848. *J. Immunol.* 2004. **173**: 4627-4634.
190. **Lewis, T.S., Shapiro, P.S., and Ahn, N.G.**, Signal transduction through MAP kinase cascades. *Adv. Cancer Res.* 1998. **74**: 49-139.

191. **Li,M., Chen,Q., Shen,Y., and Liu,W.,** Candida albicans phospholipomannan triggers inflammatory responses of human keratinocytes through Toll-like receptor 2. *Exp.Dermatol.* 2009. **18:** 603-610.
192. **Li,S., Strelow,A., Fontana,E.J., and Wesche,H.,** IRAK-4: a novel member of the IRAK family with the properties of an IRAK-kinase. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 2002. **99:** 5567-5572.
193. **Lien,E., Sellati,T.J., Yoshimura,A., Flo,T.H., Rawadi,G., Finberg,R.W., Carroll,J.D., Espevik,T., Ingalls,R.R., Radolf,J.D., and Golenbock,D.T.,** Toll-like receptor 2 functions as a pattern recognition receptor for diverse bacterial products. *J.Biol.Chem.* 1999. **274:** 33419-33425.
194. **Lim,D.M., Narasimhan,S., Michaylira,C.Z., and Wang,M.L.,** TLR3-mediated NF- κ B signaling in human esophageal epithelial cells. *Am.J.Physiol Gastrointest.Liver Physiol* 2009. **297:** G1172-G1180.
195. **Liou,H.C., Nolan,G.P., Ghosh,S., Fujita,T., and Baltimore,D.,** The NF-kappa B p50 precursor, p105, contains an internal I kappa B-like inhibitor that preferentially inhibits p50. *EMBO J.* 1992. **11:** 3003-3009.
196. **Liou,H.C., Sha,W.C., Scott,M.L., and Baltimore,D.,** Sequential induction of NF-kappa B/Rel family proteins during B-cell terminal differentiation. *Mol.Cell Biol.* 1994. **14:** 5349-5359.
197. **Lipton,J.M., Catania,A., and Delgado,R.,** Peptide modulation of inflammatory processes within the brain. *Neuroimmunomodulation.* 1998. **5:** 178-183.
198. **Liu,S.J., Zhang,C.P., Zhou,W.Q., Chen,M., and Lin,L.,** [Expression of toll-like receptors in human epidermal keratinocytes]. *Zhongguo Yi.Xue.Ke.Xue.Yuan Xue.Bao.* 2008. **30:** 296-300.
199. **Loniewski,K.J., Patial,S., and Parameswaran,N.,** Sensitivity of. *Mol.Immunol.* 2007. **44:** 3715-3723.
200. **Lorenz,E., Mira,J.P., Cornish,K.L., Arbour,N.C., and Schwartz,D.A.,** A novel polymorphism in the toll-like receptor 2 gene and its potential association with staphylococcal infection. *Infect.Immun.* 2000. **68:** 6398-6401.

201. **Lu,H.T., Yang,D.D., Wysk,M., Gatti,E., Mellman,I., Davis,R.J., and Flavell,R.A.,** Defective IL-12 production in mitogen-activated protein (MAP) kinase kinase 3 (Mkk3)-deficient mice. *EMBO J.* 1999. **18**: 1845-1857.

202. **Luger,T.A., Bhardwaj,R.S., Grabbe,S., and Schwarz,T.,** Regulation of the immune response by epidermal cytokines and neurohormones. *J.Dermatol.Sci.* 1996. **13**: 5-10.

203. **Luger,T.A., Brzoska,T., Scholzen,T.E., Kalden,D.H., Sunderkotter,C., Armstrong,C., and Ansel,J.,** The role of α -MSH as a modulator of cutaneous inflammation. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 2000. **917**: 232-238.

204. **Luger,T.A., Scholzen,T., Brzoska,T., Becher,E., Slominski,A., and Paus,R.,** Cutaneous immunomodulation and coordination of skin stress responses by α -melanocyte-stimulating hormone. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 1998. **840**: 381-394.

205. **Luger,T.A., Scholzen,T., and Grabbe,S.,** The role of α -melanocyte-stimulating hormone in cutaneous biology. *J.Investig.Dermatol.Symp.Proc.* 1997. **2**: 87-93.

206. **Luger,T.A., Scholzen,T.E., Brzoska,T., and Böhm,M.,** New insights into the functions of alpha-MSH and related peptides in the immune system. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 2003. **994**: 133-140.

207. **Lukashev,D., Ohta,A., Apasov,S., Chen,J.F., and Sitkovsky,M.,** Cutting edge: Physiologic attenuation of proinflammatory transcription by the Gs protein-coupled A2A adenosine receptor in vivo. *J.Immunol.* 2004. **173**: 21-24.

208. **Maaser,C., Kannengiesser,K., and Kucharzik,T.,** Role of the melanocortin system in inflammation. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 2006. **1072**: 123-134.

209. **Mains,R.E. and Eipper,B.A.,** Biosynthesis of adrenocorticotrophic hormone in mouse pituitary tumor cells. *J.Biol.Chem.* 1976. **251**: 4115-4120.

210. **Manna,S.K. and Aggarwal,B.B.**, α -Melanocyte-stimulating hormone inhibits the nuclear transcription factor NF- κ B activation induced by various inflammatory agents. *J.Immunol.* 1998. **161**: 2873-2880.
211. **Manna,S.K., Sarkar,A., and Sreenivasan,Y.**, Alpha-melanocyte-stimulating hormone down-regulates CXC receptors through activation of neutrophil elastase. *Eur.J.Immunol.* 2006. **36**: 754-769.
212. **Massari,P., Henneke,P., Ho,Y., Latz,E., Golenbock,D.T., and Wetzler,L.M.**, Cutting edge: Immune stimulation by neisserial porins is toll-like receptor 2 and MyD88 dependent. *J.Immunol.* 2002. **168**: 1533-1537.
213. **Matsubara,M., Harada,D., Manabe,H., and Hasegawa,K.**, Staphylococcus aureus peptidoglycan stimulates granulocyte macrophage colony-stimulating factor production from human epidermal keratinocytes via mitogen-activated protein kinases. *FEBS Lett.* 2004. **566**: 195-200.
214. **Matsui,K., Wirotasangthong,M., and Nishikawa,A.**, Analysis of signaling pathways involved in peptidoglycan-induced RANTES production from murine Langerhans cells. *Int.Arch.Allergy Immunol.* 2009. **149**: 167-172.
215. **Matsuzawa,A., Saegusa,K., Noguchi,T., Sadamitsu,C., Nishitoh,H., Nagai,S., Koyasu,S., Matsumoto,K., Takeda,K., and Ichijo,H.**, ROS-dependent activation of the TRAF6-ASK1-p38 pathway is selectively required for TLR4-mediated innate immunity. *Nat.Immunol.* 2005. **6**: 587-592.
216. **May,M.J. and Ghosh,S.**, Signal transduction through NF-kappa B. *Immunol.Today* 1998. **19**: 80-88.
217. **McGettrick,A.F. and O'Neill,L.A.**, The expanding family of MyD88-like adaptors in Toll-like receptor signal transduction. *Mol.Immunol.* 2004. **41**: 577-582.
218. **Means,T.K., Lien,E., Yoshimura,A., Wang,S., Golenbock,D.T., and Fenton,M.J.**, The CD14 ligands lipoarabinomannan and lipopolysaccharide differ in their requirement for Toll-like receptors. *J.Immunol.* 1999. **163**: 6748-6755.

219. **Medzhitov,R.**, Toll-like receptors and innate immunity. *Nat.Rev.Immunol.* 2001. **1**: 135-145.
220. **Medzhitov,R. and Janeway,C., Jr.**, Innate immune recognition: mechanisms and pathways. *Immunol.Rev.* 2000. **173**: 89-97.
221. **Medzhitov,R., Preston-Hurlburt,P., and Janeway,C.A., Jr.**, A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* 1997. **388**: 394-397.
222. **Medzhitov,R., Preston-Hurlburt,P., Kopp,E., Stadlen,A., Chen,C., Ghosh,S., and Janeway,C.A., Jr.**, MyD88 is an adaptor protein in the hToll/IL-1 receptor family signaling pathways. *Mol.Cell* 1998. **2**: 253-258.
223. **Mempel,M., Voelcker,V., Kollisch,G., Plank,C., Rad,R., Gerhard,M., Schnopp,C., Fraunberger,P., Walli,A.K., Ring,J., Abeck,D., and Ollert,M.**, Toll-like receptor expression in human keratinocytes: nuclear factor kappaB controlled gene activation by Staphylococcus aureus is toll-like receptor 2 but not toll-like receptor 4 or platelet activating factor receptor dependent. *J.Invest Dermatol.* 2003. **121**: 1389-1396.
224. **Meng,X., Khanuja,B.S., and Ip,Y.T.**, Toll receptor-mediated Drosophila immune response requires Dif, an NF-kappaB factor. *Genes Dev.* 1999. **13**: 792-797.
225. **Menzies,B.E. and Kenoyer,A.**, Signal transduction and nuclear responses in Staphylococcus aureus-induced expression of human beta-defensin 3 in skin keratinocytes. *Infect.Immun.* 2006. **74**: 6847-6854.
226. **Mercurio,F. and Manning,A.M.**, NF-kappaB as a primary regulator of the stress response. *Oncogene* 1999. **18**: 6163-6171.
227. **Meusel,T.R., Kehoe,K.E., and Imani,F.**, Protein kinase R regulates double-stranded RNA induction of TNF-alpha but not IL-1 beta mRNA in human epithelial cells. *J.Immunol.* 2002. **168**: 6429-6435.
228. **Meylan,E., Burns,K., Hofmann,K., Blancheteau,V., Martinon,F., Kelliher,M., and Tschopp,J.**, RIP1 is an essential mediator of Toll-like receptor 3-induced NF-kappa B activation. *Nat.Immunol.* 2004. **5**: 503-507.

229. **Michel,G., Kemeny,L., Peter,R.U., Beetz,A., Ried,C., Arenberger,P., and Ruzicka,T.,** Interleukin-8 receptor-mediated chemotaxis of normal human epidermal cells. *FEBS Lett.* 1992. **305**: 241-243.
230. **Miller,L.S., Sorensen,O.E., Liu,P.T., Jalian,H.R., Eshtiaghpour,D., Behmanesh,B.E., Chung,W., Starner,T.D., Kim,J., Sieling,P.A., Ganz,T., and Modlin,R.L.,** TGF-alpha regulates TLR expression and function on epidermal keratinocytes. *J.Immunol.* 2005. **174**: 6137-6143.
231. **Miyake,K.,** Innate immune sensing of pathogens and danger signals by cell surface Toll-like receptors. *Semin.Immunol.* 2007. **19**: 3-10.
232. **Miyake,K., Yamashita,Y., Ogata,M., Sudo,T., and Kimoto,M.,** RP105, a novel B cell surface molecule implicated in B cell activation, is a member of the leucine-rich repeat protein family. *J.Immunol.* 1995. **154**: 3333-3340.
233. **Miyamoto,S. and Verma,I.M.,** Rel/NF-kappa B/I kappa B story. *Adv.Cancer Res.* 1995. **66**: 255-292.
234. **Miyaura,C., Onozaki,K., Akiyama,Y., Taniyama,T., Hirano,T., Kishimoto,T., and Suda,T.,** Recombinant human interleukin 6 (B-cell stimulatory factor 2) is a potent inducer of differentiation of mouse myeloid leukemia cells (M1). *FEBS Lett.* 1988. **234**: 17-21.
235. **Moeinpour,F., Choudhry,M.A., Kawasaki,T., Timares,L., Schwacha,M.G., Bland,K.I., and Chaudry,I.H.,** 17 Beta-estradiol normalizes Toll receptor 4, mitogen activated protein kinases and inflammatory response in epidermal keratinocytes following trauma-hemorrhage. *Mol.Immunol.* 2007. **44**: 3317-3323.
236. **Moore,K.J., Andersson,L.P., Ingalls,R.R., Monks,B.G., Li,R., Arnaout,M.A., Golenbock,D.T., and Freeman,M.W.,** Divergent response to LPS and bacteria in CD14-deficient murine macrophages. *J.Immunol.* 2000. **165**: 4272-4280.
237. **Mountjoy,K.G.,** The human melanocyte stimulating hormone receptor has evolved to become "super-sensitive" to melanocortin peptides. *Mol.Cell Endocrinol.* 1994. **102**: R7-11.

238. **Mountjoy,K.G., Robbins,L.S., Mortrud,M.T., and Cone,R.D.**, The cloning of a family of genes that encode the melanocortin receptors. *Science* 1992. **257**: 1248-1251.
239. **Moynagh,P.N.**, TLR signalling and activation of IRFs: revisiting old friends from the NF-kappaB pathway. *Trends Immunol.* 2005. **26**: 469-476.
240. **Muraguchi,A., Kishimoto,T., Miki,Y., Kuritani,T., Kaieda,T., Yoshizaki,K., and Yamamura,Y.**, T cell-replacing factor- (TRF) induced IgG secretion in a human B blastoid cell line and demonstration of acceptors for TRF. *J.Immunol.* 1981. **127**: 412-416.
241. **Muzio,M., Ni,J., Feng,P., and Dixit,V.M.**, IRAK (Pelle) family member IRAK-2 and MyD88 as proximal mediators of IL-1 signaling. *Science* 1997. **278**: 1612-1615.
242. **Nagy,I., Pivarcsi,A., Koreck,A., Szell,M., Urban,E., and Kemeny,L.**, Distinct strains of *Propionibacterium acnes* induce selective human beta-defensin-2 and interleukin-8 expression in human keratinocytes through toll-like receptors. *J.Invest Dermatol.* 2005. **124**: 931-938.
243. **Naitoh,Y., Fukata,J., Tominaga,T., Nakai,Y., Tamai,S., Mori,K., and Imura,H.**, Interleukin-6 stimulates the secretion of adrenocorticotrophic hormone in conscious, freely-moving rats. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 1988. **155**: 1459-1463.
244. **Netea,M.G., van der,G.C., Van der Meer,J.W., and Kullberg,B.J.**, Toll-like receptors and the host defense against microbial pathogens: bringing specificity to the innate-immune system. *J.Leukoc.Biol.* 2004. **75**: 749-755.
245. **Nicolaou,A., Estdale,S.E., Tzatsali,M., Herrero,D.P., and Thody,A.J.**, Prostaglandin production by melanocytic cells and the effect of alpha-melanocyte stimulating hormone. *FEBS Lett.* 2004. **570**: 223-226.
246. **Nijsten,M.W., de Groot,E.R., ten Duis,H.J., Klasen,H.J., Hack,C.E., and Aarden,L.A.**, Serum levels of interleukin-6 and acute phase responses. *Lancet* 1987. **2**: 921.
247. **Ninomiya-Tsuji,J., Kishimoto,K., Hiyama,A., Inoue,J., Cao,Z., and Matsumoto,K.**, The kinase TAK1 can activate the NIK-I kappaB as well

- as the MAP kinase cascade in the IL-1 signalling pathway. *Nature* 1999. **398**: 252-256.
248. **Niyonsaba,F., Ogawa,H., and Nagaoka,I.**, Human beta-defensin-2 functions as a chemotactic agent for tumour necrosis factor-alpha-treated human neutrophils. *Immunology* 2004. **111**: 273-281.
249. **Nomura,I., Goleva,E., Howell,M.D., Hamid,Q.A., Ong,P.Y., Hall,C.F., Darst,M.A., Gao,B., Boguniewicz,M., Travers,J.B., and Leung,D.Y.**, Cytokine milieu of atopic dermatitis, as compared to psoriasis, skin prevents induction of innate immune response genes. *J.Immunol.* 2003. **171**: 3262-3269.
250. **Novak,N., Yu,C.F., Bussmann,C., Maintz,L., Peng,W.M., Hart,J., Hagemann,T., az-Lacava,A., Baurecht,H.J., Klopp,N., Wagenpfeil,S., Behrendt,H., Bieber,T., Ring,J., Illig,T., and Weidinger,S.**, Putative association of a TLR9 promoter polymorphism with atopic eczema. *Allergy* 2007. **62**: 766-772.
251. **Oganesyan,G., Saha,S.K., Guo,B., He,J.Q., Shahangian,A., Zarnegar,B., Perry,A., and Cheng,G.**, Critical role of TRAF3 in the Toll-like receptor-dependent and -independent antiviral response. *Nature* 2006. **439**: 208-211.
252. **Ogata,H., Su,I., Miyake,K., Nagai,Y., Akashi,S., Mecklenbrauker,I., Rajewsky,K., Kimoto,M., and Tarakhovsky,A.**, The toll-like receptor protein RP105 regulates lipopolysaccharide signaling in B cells. *J.Exp.Med.* 2000. **192**: 23-29.
253. **Ohashi,K., Burkart,V., Flohe,S., and Kolb,H.**, Cutting edge: heat shock protein 60 is a putative endogenous ligand of the toll-like receptor-4 complex. *J.Immunol.* 2000. **164**: 558-561.
254. **Okada,M., Kitahara,M., Kishimoto,S., Matsuda,T., Hirano,T., and Kishimoto,T.**, IL-6/BSF-2 functions as a killer helper factor in the in vitro induction of cytotoxic T cells. *J.Immunol.* 1988. **141**: 1543-1549.
255. **Okamura,Y., Watari,M., Jerud,E.S., Young,D.W., Ishizaka,S.T., Rose,J., Chow,J.C., and Strauss,J.F., III**, The extra domain A of fibronectin activates Toll-like receptor 4. *J.Biol.Chem.* 2001. **276**: 10229-10233.

256. **Ong,P.Y., Ohtake,T., Brandt,C., Strickland,I., Boguniewicz,M., Ganz,T., Gallo,R.L., and Leung,D.Y.**, Endogenous antimicrobial peptides and skin infections in atopic dermatitis. *N.Engl.J.Med.* 2002. **347**: 1151-1160.
257. **Opitz,B., Schroder,N.W., Spreitzer,I., Michelsen,K.S., Kirschning,C.J., Hallatschek,W., Zahringer,U., Hartung,T., Gobel,U.B., and Schumann,R.R.**, Toll-like receptor-2 mediates *Treponema glycolipid* and lipoteichoic acid-induced NF-kappaB translocation. *J.Biol.Chem.* 2001. **276**: 22041-22047.
258. **Oppenheim,J.J., Zachariae,C.O., Mukaida,N., and Matsushima,K.**, Properties of the novel proinflammatory supergene "intercrine" cytokine family. *Annu.Rev.Immunol.* 1991. **9**: 617-648.
259. **Oshiumi,H., Sasai,M., Shida,K., Fujita,T., Matsumoto,M., and Seya,T.**, TIR-containing adapter molecule (TICAM)-2, a bridging adapter recruiting to toll-like receptor 4 TICAM-1 that induces interferon-beta. *J.Biol.Chem.* 2003. **278**: 49751-49762.
260. **Ozinsky,A., Underhill,D.M., Fontenot,J.D., Hajjar,A.M., Smith,K.D., Wilson,C.B., Schroeder,L., and Aderem,A.**, The repertoire for pattern recognition of pathogens by the innate immune system is defined by cooperation between toll-like receptors. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 2000. **97**: 13766-13771.
261. **Pages,G., Guerin,S., Grall,D., Bonino,F., Smith,A., Anjuere,F., Auberger,P., and Pouyssegur,J.**, Defective thymocyte maturation in p44 MAP kinase (Erk 1) knockout mice. *Science* 1999. **286**: 1374-1377.
262. **Pearson,G., Robinson,F., Beers,G.T., Xu,B.E., Karandikar,M., Berman,K., and Cobb,M.H.**, Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. *Endocr.Rev.* 2001. **22**: 153-183.
263. **Perry,A.K., Chow,E.K., Goodnough,J.B., Yeh,W.C., and Cheng,G.**, Differential requirement for TANK-binding kinase-1 in type I interferon responses to toll-like receptor activation and viral infection. *J.Exp.Med.* 2004. **199**: 1651-1658.
264. **Pietersma,A., Tilly,B.C., Gaestel,M., de,J.N., Lee,J.C., Koster,J.F., and Sluiter,W.**, p38 mitogen activated protein kinase regulates

- endothelial VCAM-1 expression at the post-transcriptional level. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 1997. **230**: 44-48.
265. **Pinhal-Enfield,G., Ramanathan,M., Hasko,G., Vogel,S.N., Salzman,A.L., Boons,G.J., and Leibovich,S.J.,** An angiogenic switch in macrophages involving synergy between Toll-like receptors 2, 4, 7, and 9 and adenosine A(2A) receptors. *Am.J.Pathol.* 2003. **163**: 711-721.
266. **Pivarcsi,A., Bodai,L., Rethi,B., Kenderessy-Szabo,A., Koreck,A., Szell,M., Beer,Z., Bata-Csorgoo,Z., Magocsi,M., Rajnavolgyi,E., Dobozy,A., and Kemeny,L.,** Expression and function of Toll-like receptors 2 and 4 in human keratinocytes. *Int.Immunol.* 2003. **15**: 721-730.
267. **Pivarcsi,A., Koreck,A., Bodai,L., Szell,M., Szeg,C., Belso,N., Kenderessy-Szabo,A., Bata-Csorgo,Z., Dobozy,A., and Kemeny,L.,** Differentiation-regulated expression of Toll-like receptors 2 and 4 in HaCaT keratinocytes. *Arch.Dermatol.Res.* 2004. **296**: 120-124.
268. **Poltorak,A., He,X., Smirnova,I., Liu,M.Y., Van Huffel,C., Du,X., Birdwell,D., Alejos,E., Silva,M., Galanos,C., Freudenberg,M., Ricciardi-Castagnoli,P., Layton,B., and Beutler,B.,** Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. *Science* 1998. **282**: 2085-2088.
269. **Pritchard,L.E., Turnbull,A.V., and White,A.,** Pro-opiomelanocortin processing in the hypothalamus: impact on melanocortin signalling and obesity. *J.Endocrinol.* 2002. **172**: 411-421.
270. **Rajora,N., Ceriani,G., Catania,A., Star,R.A., Murphy,M.T., and Lipton,J.M.,** α -MSH production, receptors, and influence on neopterin in a human monocyte/macrophage cell line. *J.Leukoc.Biol.* 1996. **59**: 248-253.
271. **Rassa,J.C., Meyers,J.L., Zhang,Y., Kudaravalli,R., and Ross,S.R.,** Murine retroviruses activate B cells via interaction with toll-like receptor 4. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 2002. **99**: 2281-2286.
272. **renzana-Seisdedos,F., Turpin,P., Rodriguez,M., Thomas,D., Hay,R.T., Virelizier,J.L., and Dargemont,C.,** Nuclear localization of I kappa B alpha promotes active transport of NF-kappa B from the nucleus to the cytoplasm. *J.Cell Sci.* 1997. **110 (Pt 3)**: 369-378.

273. **Rhee,S.H., Im,E., Riegler,M., Kokkotou,E., O'brien,M., and Pothoulakis,C.,** Pathophysiological role of Toll-like receptor 5 engagement by bacterial flagellin in colonic inflammation. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 2005. **102**: 13610-13615.
274. **Ridley,S.H., Sarsfield,S.J., Lee,J.C., Bigg,H.F., Cawston,T.E., Taylor,D.J., DeWitt,D.L., and Saklatvala,J.,** Actions of IL-1 are selectively controlled by p38 mitogen-activated protein kinase: regulation of prostaglandin H synthase-2, metalloproteinases, and IL-6 at different levels. *J.Immunol.* 1997. **158**: 3165-3173.
275. **Rieg,S., Steffen,H., Seeber,S., Humeny,A., Kalbacher,H., Dietz,K., Garbe,C., and Schittek,B.,** Deficiency of dermcidin-derived antimicrobial peptides in sweat of patients with atopic dermatitis correlates with an impaired innate defense of human skin in vivo. *J.Immunol.* 2005. **174**: 8003-8010.
276. **Rincon,M., Enslin,H., Raugeaud,J., Recht,M., Zapton,T., Su,M.S., Penix,L.A., Davis,R.J., and Flavell,R.A.,** Interferon-gamma expression by Th1 effector T cells mediated by the p38 MAP kinase signaling pathway. *EMBO J.* 1998. **17**: 2817-2829.
277. **Robertson,B., Dostal,K., and Daynes,R.A.,** Neuropeptide regulation of inflammatory and immunologic responses. The capacity of alpha-melanocyte-stimulating hormone to inhibit tumor necrosis factor and IL-1-inducible biologic responses. *J.Immunol.* 1988. **140**: 4300-4307.
278. **Rocha,J.D., cote-Ricardo,D., Redner,P., Lopes,U.G., Barbosa-Filho,J.M., Piuvezam,M.R., Arruda,L.B., and Maria Torres,P.L.,** Inhibitory effect of the alkaloid warifteine purified from *Cissampelos sympodialis* on B lymphocyte function in vitro and in vivo. *Planta Med.* 2010. **76**: 325-330.
279. **Rock,F.L., Hardiman,G., Timans,J.C., Kastelein,R.A., and Bazan,J.F.,** A family of human receptors structurally related to *Drosophila* Toll. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1998. **95**: 588-593.
280. **Rose-John,S., Scheller,J., Elson,G., and Jones,S.A.,** Interleukin-6 biology is coordinated by membrane-bound and soluble receptors: role in inflammation and cancer. *J.Leukoc.Biol.* 2006. **80**: 227-236.

281. **Roselli-Reh fuss,L., Mountjoy,K.G., Robbins,L.S., Mortrud,M.T., Low,M.J., Tatro,J.B., Entwistle,M.L., Simerly,R.B., and Cone,R.D.,** Identification of a receptor for gamma melanotropin and other proopiomelanocortin peptides in the hypothalamus and limbic system. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1993. **90**: 8856-8860.
282. **Rossi,D. and Zlotnik,A.,** The biology of chemokines and their receptors. *Annu.Rev.Immunol.* 2000. **18**: 217-242.
283. **Roux,P.P. and Blenis,J.,** ERK and p38 MAPK-activated protein kinases: a family of protein kinases with diverse biological functions. *Microbiol.Mol.Biol.Rev.* 2004. **68**: 320-344.
284. **Rutschmann,S., Jung,A.C., Hetru,C., Reichhart,J.M., Hoffmann,J.A., and Ferrandon,D.,** The Rel protein DIF mediates the antifungal but not the antibacterial host defense in *Drosophila*. *Immunity.* 2000. **12**: 569-580.
285. **Saha,S.K., Pietras,E.M., He,J.Q., Kang,J.R., Liu,S.Y., Oganessian,G., Shahangian,A., Zarnegar,B., Shiba,T.L., Wang,Y., and Cheng,G.,** Regulation of antiviral responses by a direct and specific interaction between TRAF3 and Cardif. *EMBO J.* 2006. **25**: 3257-3263.
286. **Salmeron,A., Ahmad,T.B., Carlile,G.W., Pappin,D., Narsimhan,R.P., and Ley,S.C.,** Activation of MEK-1 and SEK-1 by Tpl-2 proto-oncoprotein, a novel MAP kinase kinase kinase. *EMBO J.* 1996. **15**: 817-826.
287. **Sarkar,S.N., Peters,K.L., Elco,C.P., Sakamoto,S., Pal,S., and Sen,G.C.,** Novel roles of TLR3 tyrosine phosphorylation and PI3 kinase in double-stranded RNA signaling. *Nat.Struct.Mol.Biol.* 2004. **11**: 1060-1067.
288. **Sarosdy,M.F.,** Bropiramine in bladder cancer: clinical studies. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 1993. **685**: 301-308.
289. **Sato,S., Sanjo,H., Takeda,K., Ninomiya-Tsuji,J., Yamamoto,M., Kawai,T., Matsumoto,K., Takeuchi,O., and Akira,S.,** Essential function for the kinase TAK1 in innate and adaptive immune responses. *Nat.Immunol.* 2005. **6**: 1087-1095.

290. **Sato,S., Sugiyama,M., Yamamoto,M., Watanabe,Y., Kawai,T., Takeda,K., and Akira,S.,** Toll/IL-1 receptor domain-containing adaptor inducing IFN-beta (TRIF) associates with TNF receptor-associated factor 6 and TANK-binding kinase 1, and activates two distinct transcription factors, NF-kappa B and IFN-regulatory factor-3, in the Toll-like receptor signaling. *J.Immunol.* 2003. **171**: 4304-4310.
291. **Sayama,K., Komatsuzawa,H., Yamasaki,K., Shirakata,Y., Hanakawa,Y., Ouhara,K., Tokumaru,S., Dai,X., Tohyama,M., Ten,D.P., Sugai,M., Ichijo,H., and Hashimoto,K.,** New mechanisms of skin innate immunity: ASK1-mediated keratinocyte differentiation regulates the expression of beta-defensins, LL37, and TLR2. *Eur.J.Immunol.* 2005. **35**: 1886-1895.
292. **Schauer,E., Trautinger,F., Kock,A., Schwarz,A., Bhardwaj,R., Simon,M., Ansel,J.C., Schwarz,T., and Luger,T.A.,** Proopiomelanocortin-derived peptides are synthesized and released by human keratinocytes. *J.Clin.Invest* 1994. **93**: 2258-2262.
293. **Scherer,D.C., Brockman,J.A., Chen,Z., Maniatis,T., and Ballard,D.W.,** Signal-induced degradation of I kappa B alpha requires site-specific ubiquitination. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1995. **92**: 11259-11263.
294. **Schiller,M., Metze,D., Luger,T.A., Grabbe,S., and Gunzer,M.,** Immune response modifiers--mode of action. *Exp.Dermatol.* 2006. **15**: 331-341.
295. **Schiller,M., Raghunath,M., Kubitscheck,U., Scholzen,T.E., Fisbeck,T., Metze,D., Luger,T.A., and Böhm,M.,** Human dermal fibroblasts express prohormone convertases 1 and 2 and produce proopiomelanocortin-derived peptides. *J.Invest Dermatol.* 2001. **117**: 227-235.
296. **Schindler,J.F., Monahan,J.B., and Smith,W.G.,** p38 pathway kinases as anti-inflammatory drug targets. *J.Dent.Res.* 2007. **86**: 800-811.
297. **Schnurr,M., Toy,T., Shin,A., Wagner,M., Cebon,J., and Maraskovsky,E.,** Extracellular nucleotide signaling by P2 receptors inhibits IL-12 and enhances IL-23 expression in human dendritic cells: a novel role for the cAMP pathway. *Blood* 2005. **105**: 1582-1589.
298. **Scholzen,T.E., Brzoska,T., Kalden,D.H., Hartmeyer,M., Luger,T.A., Armstrong,C.A., and Ansel,J.C.,** Expression of proopiomelanocortin

- peptides and prohormone convertases by human dermal microvascular endothelial cells. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 1999. **885**: 444-447.
299. **Scholzen,T.E., Sunderkotter,C., Kalden,D.H., Brzoska,T., Fastrich,M., Fisbeck,T., Armstrong,C.A., Ansel,J.C., and Luger,T.A.,** α -melanocyte stimulating hormone prevents lipopolysaccharide-induced vasculitis by down-regulating endothelial cell adhesion molecule expression. *Endocrinology* 2003. **144**: 360-370.
300. **Schön,M.P. and Schön,M.,** Immune modulation and apoptosis induction: two sides of the antitumoral activity of imiquimod. *Apoptosis.* 2004. **9**: 291-298.
301. **Schon,M.P., Schon,M., and Klotz,K.N.,** The small antitumoral immune response modifier imiquimod interacts with adenosine receptor signaling in a. *J.Invest Dermatol.* 2006. **126**: 1338-1347.
302. **Schromm,A.B., Lien,E., Henneke,P., Chow,J.C., Yoshimura,A., Heine,H., Latz,E., Monks,B.G., Schwartz,D.A., Miyake,K., and Golenbock,D.T.,** Molecular genetic analysis of an endotoxin nonresponder mutant cell line: a point mutation in a conserved region of MD-2 abolishes endotoxin-induced signaling. *J.Exp.Med.* 2001. **194**: 79-88.
303. **Schwandner,R., Dziarski,R., Wesche,H., Rothe,M., and Kirschning,C.J.,** Peptidoglycan- and lipoteichoic acid-induced cell activation is mediated by toll-like receptor 2. *J.Biol.Chem.* 1999. **274**: 17406-17409.
304. **Seibl,R., Birchler,T., Loeliger,S., Hossle,J.P., Gay,R.E., Saurenmann,T., Michel,B.A., Seger,R.A., Gay,S., and Lauener,R.P.,** Expression and regulation of Toll-like receptor 2 in rheumatoid arthritis synovium. *Am.J.Pathol.* 2003. **162**: 1221-1227.
305. **Seth,R.B., Sun,L., Ea,C.K., and Chen,Z.J.,** Identification and characterization of MAVS, a mitochondrial antiviral signaling protein that activates NF-kappaB and IRF 3. *Cell* 2005. **122**: 669-682.
306. **Seung,N.R., Park,E.J., Kim,C.W., Kim,K.H., Kim,K.J., Cho,H.J., and Park,H.R.,** Comparison of expression of heat-shock protein 60, Toll-like receptors 2 and 4, and T-cell receptor gammadelta in plaque and guttate psoriasis. *J.Cutan.Pathol.* 2007. **34**: 903-911.

307. **Sharma,S., tenOever,B.R., Grandvaux,N., Zhou,G.P., Lin,R., and Hiscott,J.**, Triggering the interferon antiviral response through an IKK-related pathway. *Science* 2003. **300**: 1148-1151.
308. **Shimazu,R., Akashi,S., Ogata,H., Nagai,Y., Fukudome,K., Miyake,K., and Kimoto,M.**, MD-2, a molecule that confers lipopolysaccharide responsiveness on Toll-like receptor 4. *J.Exp.Med.* 1999. **189**: 1777-1782.
309. **Siebenlist,U., Franzoso,G., and Brown,K.**, Structure, regulation and function of NF-kappa B. *Annu.Rev.Cell Biol.* 1994. **10**: 405-455.
310. **Slominski,A., Wortsman,J., Mazurkiewicz,J.E., Matsuoka,L., Dietrich,J., Lawrence,K., Gorbani,A., and Paus,R.**, Detection of proopiomelanocortin-derived antigens in normal and pathologic human skin. *J.Lab Clin.Med.* 1993. **122**: 658-666.
311. **Smiley,S.T., King,J.A., and Hancock,W.W.**, Fibrinogen stimulates macrophage chemokine secretion through toll-like receptor 4. *J.Immunol.* 2001. **167**: 2887-2894.
312. **Smith,A.I. and Funder,J.W.**, Proopiomelanocortin processing in the pituitary, central nervous system, and peripheral tissues. *Endocr.Rev.* 1988. **9**: 159-179.
313. **Song,P.I., Park,Y.M., Abraham,T., Harten,B., Zivony,A., Neparidze,N., Armstrong,C.A., and Ansel,J.C.**, Human keratinocytes express functional CD14 and toll-like receptor 4. *J.Invest Dermatol.* 2002. **119**: 424-432.
314. **Star,R.A., Rajora,N., Huang,J., Stock,R.C., Catania,A., and Lipton,J.M.**, Evidence of autocrine modulation of macrophage nitric oxide synthase by α -melanocyte-stimulating hormone. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1995. **92**: 8016-8020.
315. **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.**, Severe impairment of interleukin-1 and Toll-like receptor signalling in mice lacking IRAK-4. *Nature* 2002. **416**: 750-756.

316. **Tackey,E., Lipsky,P.E., and Illei,G.G.**, Rationale for interleukin-6 blockade in systemic lupus erythematosus. *Lupus* 2004. **13**: 339-343.
317. **Tada,H., Nemoto,E., Shimauchi,H., Watanabe,T., Mikami,T., Matsumoto,T., Ohno,N., Tamura,H., Shibata,K., Akashi,S., Miyake,K., Sugawara,S., and Takada,H.**, Saccharomyces cerevisiae- and Candida albicans-derived mannan induced production of tumor necrosis factor alpha by human monocytes in a CD14- and Toll-like receptor 4-dependent manner. *Microbiol.Immunol.* 2002. **46**: 503-512.
318. **Taga,T. and Kishimoto,T.**, Gp130 and the interleukin-6 family of cytokines. *Annu.Rev.Immunol.* 1997. **15**: 797-819.
319. **Takaesu,G., Kishida,S., Hiyama,A., Yamaguchi,K., Shibuya,H., Irie,K., Ninomiya-Tsuji,J., and Matsumoto,K.**, TAB2, a novel adaptor protein, mediates activation of TAK1 MAPKKK by linking TAK1 to TRAF6 in the IL-1 signal transduction pathway. *Mol.Cell* 2000. **5**: 649-658.
320. **Takahashi,K., Kawai,T., Kumar,H., Sato,S., Yonehara,S., and Akira,S.**, Roles of caspase-8 and caspase-10 in innate immune responses to double-stranded RNA. *J.Immunol.* 2006. **176**: 4520-4524.
321. **Takai,Y., Wong,G.G., Clark,S.C., Burakoff,S.J., and Herrmann,S.H.**, B cell stimulatory factor-2 is involved in the differentiation of cytotoxic T lymphocytes. *J.Immunol.* 1988. **140**: 508-512.
322. **Takaoka,A., Yanai,H., Kondo,S., Duncan,G., Negishi,H., Mizutani,T., Kano,S., Honda,K., Ohba,Y., Mak,T.W., and Taniguchi,T.**, Integral role of IRF-5 in the gene induction programme activated by Toll-like receptors. *Nature* 2005. **434**: 243-249.
323. **Takeda,K. and Akira,S.**, Roles of Toll-like receptors in innate immune responses. *Genes Cells* 2001. **6**: 733-742.
324. **Takeda,K., Kaisho,T., and Akira,S.**, Toll-like receptors. *Annu.Rev.Immunol.* 2003. **21**: 335-376.
325. **Takeuchi,O., Hoshino,K., Kawai,T., Sanjo,H., Takada,H., Ogawa,T., Takeda,K., and Akira,S.**, Differential roles of TLR2 and TLR4 in recognition of gram-negative and gram-positive bacterial cell wall components. *Immunity.* 1999. **11**: 443-451.

326. **Takeuchi,O., Kaufmann,A., Grote,K., Kawai,T., Hoshino,K., Morr,M., Muhlrad,P.F., and Akira,S.**, Cutting edge: preferentially the R-stereoisomer of the mycoplasma lipopeptide macrophage-activating lipopeptide-2 activates immune cells through a toll-like receptor 2- and MyD88-dependent signaling pathway. *J.Immunol.* 2000. **164**: 554-557.
327. **Takeuchi,O., Kawai,T., Muhlrad,P.F., Morr,M., Radolf,J.D., Zychlinsky,A., Takeda,K., and Akira,S.**, Discrimination of bacterial lipoproteins by Toll-like receptor 6. *Int.Immunol.* 2001. **13**: 933-940.
328. **Takeuchi,O., Kawai,T., Sanjo,H., Copeland,N.G., Gilbert,D.J., Jenkins,N.A., Takeda,K., and Akira,S.**, TLR6: A novel member of an expanding toll-like receptor family. *Gene* 1999. **231**: 59-65.
329. **Takeuchi,O., Sato,S., Horiuchi,T., Hoshino,K., Takeda,K., Dong,Z., Modlin,R.L., and Akira,S.**, Cutting edge: role of Toll-like receptor 1 in mediating immune response to microbial lipoproteins. *J.Immunol.* 2002. **169**: 10-14.
330. **Taniguchi,T. and Takaoka,A.**, The interferon-alpha/beta system in antiviral responses: a multimodal machinery of gene regulation by the IRF family of transcription factors. *Curr.Opin.Immunol.* 2002. **14**: 111-116.
331. **Tatro,J.B.**, Receptor biology of the melanocortins, a family of neuroimmunomodulatory peptides. *Neuroimmunomodulation.* 1996. **3**: 259-284.
332. **Taylor,K.R., Trowbridge,J.M., Rudisill,J.A., Termeer,C.C., Simon,J.C., and Gallo,R.L.**, Hyaluronan fragments stimulate endothelial recognition of injury through TLR4. *J.Biol.Chem.* 2004. **279**: 17079-17084.
333. **Teofoli,P., Motoki,K., Lotti,T.M., Uitto,J., and Mauviel,A.**, Proopiomelanocortin (POMC) gene expression by normal skin and keloid fibroblasts in culture: modulation by cytokines. *Exp.Dermatol.* 1997. **6**: 111-115.
334. **Termeer,C., Benedix,F., Sleeman,J., Fieber,C., Voith,U., Ahrens,T., Miyake,K., Freudenberg,M., Galanos,C., and Simon,J.C.**, Oligosaccharides of Hyaluronan activate dendritic cells via toll-like receptor 4. *J.Exp.Med.* 2002. **195**: 99-111.

335. **Thody,A.J., Hunt,G., Donatien,P.D., and Todd,C.**, Human melanocytes express functional melanocyte-stimulating hormone receptors. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 1993. **680**: 381-390.
336. **Tomai,M.A., Gibson,S.J., Imbertson,L.M., Miller,R.L., Myhre,P.E., Reiter,M.J., Wagner,T.L., Tamulinas,C.B., Beaurline,J.M., Gerster,J.F., and .**, Immunomodulating and antiviral activities of the imidazoquinoline S-28463. *Antiviral Res.* 1995. **28**: 253-264.
337. **Toshchakov,V., Jones,B.W., Perera,P.Y., Thomas,K., Cody,M.J., Zhang,S., Williams,B.R., Major,J., Hamilton,T.A., Fenton,M.J., and Vogel,S.N.**, TLR4, but not TLR2, mediates IFN-beta-induced STAT1alpha/beta-dependent gene expression in macrophages. *Nat.Immunol.* 2002. **3**: 392-398.
338. **Toyoda,M. and Morohashi,M.**, Pathogenesis of acne. *Med.Electron Microsc.* 2001. **34**: 29-40.
339. **Uematsu,S., Sato,S., Yamamoto,M., Hirotani,T., Kato,H., Takeshita,F., Matsuda,M., Coban,C., Ishii,K.J., Kawai,T., Takeuchi,O., and Akira,S.**, Interleukin-1 receptor-associated kinase-1 plays an essential role for Toll-like receptor (TLR)7- and TLR9-mediated interferon- α induction. *J.Exp.Med.* 2005. **201**: 915-923.
340. **Ulevitch,R.J. and Tobias,P.S.**, Receptor-dependent mechanisms of cell stimulation by bacterial endotoxin. *Annu.Rev.Immunol.* 1995. **13**: 437-457.
341. **Underhill,D.M., Ozinsky,A., Hajjar,A.M., Stevens,A., Wilson,C.B., Bassetti,M., and Aderem,A.**, The Toll-like receptor 2 is recruited to macrophage phagosomes and discriminates between pathogens. *Nature* 1999. **401**: 811-815.
342. **Underhill,D.M., Ozinsky,A., Smith,K.D., and Aderem,A.**, Toll-like receptor-2 mediates mycobacteria-induced proinflammatory signaling in macrophages. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1999. **96**: 14459-14463.
343. **Underwood,D.C., Osborn,R.R., Bochnowicz,S., Webb,E.F., Rieman,D.J., Lee,J.C., Romanic,A.M., Adams,J.L., Hay,D.W., and Griswold,D.E.**, SB 239063, a p38 MAPK inhibitor, reduces neutrophilia, inflammatory cytokines, MMP-9, and fibrosis in lung. *Am.J.Physiol Lung Cell Mol.Physiol* 2000. **279**: L895-L902.

344. **Vabulas,R.M., hmad-Nejad,P., da,C.C., Miethke,T., Kirschning,C.J., Hacker,H., and Wagner,H.**, Endocytosed HSP60s use toll-like receptor 2 (TLR2) and TLR4 to activate the toll/interleukin-1 receptor signaling pathway in innate immune cells. *J.Biol.Chem.* 2001. **276**: 31332-31339.
345. **van Beelen,A.J., Teunissen,M.B., Kapsenberg,M.L., and de Jong,E.C.**, Interleukin-17 in inflammatory skin disorders. *Curr.Opin.Allergy Clin.Immunol.* 2007. **7**: 374-381.
346. **Visintin,A., Mazzoni,A., Spitzer,J.A., and Segal,D.M.**, Secreted MD-2 is a large polymeric protein that efficiently confers lipopolysaccharide sensitivity to Toll-like receptor 4. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 2001. **98**: 12156-12161.
347. **Wagner,T.L., Horton,V.L., Carlson,G.L., Myhre,P.E., Gibson,S.J., Imbertson,L.M., and Tomai,M.A.**, Induction of cytokines in cynomolgus monkeys by the immune response modifiers, imiquimod, S-27609 and S-28463. *Cytokine* 1997. **9**: 837-845.
348. **Wall,E.A., Zavzavadjian,J.R., Chang,M.S., Randhawa,B., Zhu,X., Hsueh,R.C., Liu,J., Driver,A., Bao,X.R., Sternweis,P.C., Simon,M.I., and Fraser,I.D.**, Suppression of LPS-induced TNF-alpha production in macrophages by cAMP is mediated by PKA-AKAP95-p105. *Sci.Signal.* 2009. **2**: ra28.
349. **Walter,P., Gilmore,R., and Blobel,G.**, Protein translocation across the endoplasmic reticulum. *Cell* 1984. **38**: 5-8.
350. **Walz,A., Peveri,P., Aschauer,H., and Baggiolini,M.**, Purification and amino acid sequencing of NAF, a novel neutrophil-activating factor produced by monocytes. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 1987. **149**: 755-761.
351. **Wang,C., Deng,L., Hong,M., Akkaraju,G.R., Inoue,J., and Chen,Z.J.**, TAK1 is a ubiquitin-dependent kinase of MKK and IKK. *Nature* 2001. **412**: 346-351.
352. **Wang,M., Krauss,J.L., Domon,H., Hosur,K.B., Liang,S., Magotti,P., Triantafilou,M., Triantafilou,K., Lambris,J.D., and Hajishengallis,G.**, Microbial hijacking of complement-toll-like receptor crosstalk. *Sci.Signal.* 2010. **3**: ra11.

353. **Waterfield,M., Jin,W., Reiley,W., Zhang,M., and Sun,S.C.**, I kappa B kinase is an essential component of the Tpl2 signaling pathway. *Mol.Cell Biol.* 2004. **24**: 6040-6048.
354. **Weinlich,R., Bortoluci,K.R., Chehab,C.F., Serezani,C.H., Ulbrich,A.G., Peters-Golden,M., Russo,M., and marante-Mendes,G.P.**, TLR4/MYD88-dependent, LPS-induced synthesis of PGE2 by macrophages or dendritic cells prevents anti-CD3-mediated CD95L upregulation in T cells. *Cell Death.Differ.* 2008. **15**: 1901-1909.
355. **Weiss,J.M., Sundar,S.K., Cierpial,M.A., and Ritchie,J.C.**, Effects of interleukin-1 infused into brain are antagonized by alpha-MSH in a dose-dependent manner. *Eur.J.Pharmacol.* 1991. **192**: 177-179.
356. **Werts,C., Tapping,R.I., Mathison,J.C., Chuang,T.H., Kravchenko,V., Saint,G., 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.**, Leptospiral lipopolysaccharide activates cells through a TLR2-dependent mechanism. *Nat.Immunol.* 2001. **2**: 346-352.
357. **Whiteside,S.T. and Israel,A.**, I kappa B proteins: structure, function and regulation. *Semin.Cancer Biol.* 1997. **8**: 75-82.
358. **Wietek,C., Miggin,S.M., Jefferies,C.A., and O'Neill,L.A.**, Interferon regulatory factor-3-mediated activation of the interferon-sensitive response element by Toll-like receptor (TLR) 4 but not TLR3 requires the p65 subunit of NF-kappa. *J.Biol.Chem.* 2003. **278**: 50923-50931.
359. **Wikberg,J.E., Muceniece,R., Mandrika,I., Prusis,P., Lindblom,J., Post,C., and Skottner,A.**, New aspects on the melanocortins and their receptors. *Pharmacol.Res.* 2000. **42**: 393-420.
360. **Wintzen,M. and Gilchrest,B.A.**, Proopiomelanocortin, its derived peptides, and the skin. *J.Invest Dermatol.* 1996. **106**: 3-10.
361. **Wu,C.C., Hsu,S.C., Shih,H.M., and Lai,M.Z.**, Nuclear factor of activated T cells c is a target of p38 mitogen-activated protein kinase in T cells. *Mol.Cell Biol.* 2003. **23**: 6442-6454.
362. **Wu,J., Harrison,J.K., Vincent,L.A., Haystead,C., Haystead,T.A., Michel,H., Hunt,D.F., Lynch,K.R., and Sturgill,T.W.**, Molecular structure of a protein-tyrosine/threonine kinase activating p42 mitogen-

- activated protein (MAP) kinase: MAP kinase kinase.
Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A 1993. **90**: 173-177.
363. **Wyllie,D.H., Kiss-Toth,E., Visintin,A., Smith,S.C., Boussouf,S., Segal,D.M., Duff,G.W., and Dower,S.K.**, Evidence for an accessory protein function for Toll-like receptor 1 in anti-bacterial responses. *J.Immunol.* 2000. **165**: 7125-7132.
364. **Yamamoto,M., Sato,S., Hemmi,H., Hoshino,K., Kaisho,T., Sanjo,H., Takeuchi,O., Sugiyama,M., Okabe,M., Takeda,K., and Akira,S.**, Role of adaptor TRIF in the MyD88-independent toll-like receptor signaling pathway. *Science* 2003. **301**: 640-643.
365. **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.**, Essential role for TIRAP in activation of the signalling cascade shared by TLR2 and TLR4. *Nature* 2002. **420**: 324-329.
366. **Yamashita,M., Kimura,M., Kubo,M., Shimizu,C., Tada,T., Perlmutter,R.M., and Nakayama,T.**, T cell antigen receptor-mediated activation of the Ras/mitogen-activated protein kinase pathway controls interleukin 4 receptor function and type-2 helper T cell differentiation. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1999. **96**: 1024-1029.
367. **Yang,D., Chertov,O., Bykovskaia,S.N., Chen,Q., Buffo,M.J., Shogan,J., Anderson,M., Schroder,J.M., Wang,J.M., Howard,O.M., and Oppenheim,J.J.**, Beta-defensins: linking innate and adaptive immunity through dendritic and T cell CCR6. *Science* 1999. **286**: 525-528.
368. **Yang,Y.L., Reis,L.F., Pavlovic,J., Aguzzi,A., Schafer,R., Kumar,A., Williams,B.R., Aguet,M., and Weissmann,C.**, Deficient signaling in mice devoid of double-stranded RNA-dependent protein kinase. *EMBO J.* 1995. **14**: 6095-6106.
369. **Yaron,A., Hatzubai,A., Davis,M., Lavon,I., Amit,S., Manning,A.M., Andersen,J.S., Mann,M., Mercurio,F., and Ben-Neriah,Y.**, Identification of the receptor component of the I κ B α -ubiquitin ligase. *Nature* 1998. **396**: 590-594.
370. **Ye,H., Arron,J.R., Lamothe,B., Cirilli,M., Kobayashi,T., Shevde,N.K., Segal,D., Dzivenu,O.K., Vologodskaia,M., Yim,M., Du,K., Singh,S.,**

- Pike,J.W., Darnay,B.G., Choi,Y., and Wu,H.**, Distinct molecular mechanism for initiating TRAF6 signalling. *Nature* 2002. **418**: 443-447.
371. **Yoneyama,M., Kikuchi,M., Matsumoto,K., Imaizumi,T., Miyagishi,M., Taira,K., Foy,E., Loo,Y.M., Gale,M., Jr., Akira,S., Yonehara,S., Kato,A., and Fujita,T.**, Shared and unique functions of the DExD/H-box helicases RIG-I, MDA5, and LGP2 in antiviral innate immunity. *J.Immunol.* 2005. **175**: 2851-2858.
372. **Yoshimura,A., Lien,E., Ingalls,R.R., Tuomanen,E., Dziarski,R., and Golenbock,D.**, Cutting edge: recognition of Gram-positive bacterial cell wall components by the innate immune system occurs via Toll-like receptor 2. *J.Immunol.* 1999. **163**: 1-5.
373. **Zhang,D., Facchinetti,V., Wang,X., Huang,Q., Qin,J., and Su,B.**, Identification of MEKK2/3 serine phosphorylation site targeted by the Toll-like receptor and stress pathways. *EMBO J.* 2006. **25**: 97-107.
374. **Zhang,Y.L. and Dong,C.**, MAP kinases in immune responses. *Cell Mol.Immunol.* 2005. **2**: 20-27.
375. **Zhou,X., Giron,J.A., Torres,A.G., Crawford,J.A., Negrete,E., Vogel,S.N., and Kaper,J.B.**, Flagellin of enteropathogenic *Escherichia coli* stimulates interleukin-8 production in T84 cells. *Infect.Immun.* 2003. **71**: 2120-2129.

7 Abkürzungsverzeichnis

Abb.:	Abbildung
ACTH:	adrenokortikotropes Hormon
AKT:	Synonym: Proteinkinase B
AP-1:	activator protein 1
Aqua dest:	destilliertes Wasser
ASK:	<i>apoptosis signal regulating kinase</i>
ATF2:	<i>activating transcription factor 2</i>
ATP:	Adenosintriphosphat
bp:	Basenpaar
bzw.:	beziehungsweise
ca.:	circa
cAMP:	zyklisches Adenosinmonophosphat
CARD:	<i>Caspase recruitment domain</i>
CCL:	Chemokin, CC-Motiv
CD:	<i>cluster of designation</i>
cDNA:	komplementäre DNA
c-fos:	Transkriptionsfaktor, Protoonkogen
CGRP:	<i>Calcitonin gene-related peptid</i>
c-Jun:	Transkriptionsfaktor, Protoonkogen
CO ₂ :	Kohlendioxid
COX:	Cyclooxygenase
CpG:	Cytosin-Phosphatidyl-Guanin
CREB:	<i>cAMP response element binding protein</i>
c-Rel:	Protein der Nf-κB/Rel-Familie
CXCL-2:	Chemokin; Synonym: Gro-α
CyaA:	Adenylatzyklase-Toxin
DAPI:	4', 6'-Diamidino-2-Phenylindoldihydrochlorid
Db-cAMP:	Dibutyryl-zyklisches Adenosinmonophosphat
DEPC:	Diethylpyrocarbonat
DMSO:	Dimethylsulfoxid
dNTP:	Desoxynukleosidtriphosphat

– Abkürzungsverzeichnis –

dsRNA:	double stranded RNA
ELAM:	Endothel-Leukozyten-Adhäsionsmolekül
Elisa:	enzyme linked immuno sorbent assay
ERK:	extrazelluläre Signal regulierte Kinase
FADD:	<i>Fas-associated death domain protein</i>
FCS:	fetal calf serum
FW-Primer:	forward Primer
GAPDH:	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
Ggf.:	gegebenenfalls
Go-Taq:	Go-Taq DNA Polymerase
Green-Reakt.-Buffer:	Green-Reaktion-Buffer
ICAM:	interzelluläres Adhäsionsmolekül
ICER:	<i>inducible response element binding protein</i>
IFN:	Interferon
IgE:	Immunglobulin E
IKK:	I κ B-Kinase
IL:	Interleukin
iNOS:	induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase
IP 10:	<i>Interferon-inducible peptid 10</i>
IPS-1:	IFN-Promotor stimulierender Faktor 1
IRAK:	<i>IL-1 receptor associated kinase</i>
IRF:	IFN-regulierender Faktor
ISRE:	<i>interferon stimulated response element</i>
I κ B:	Inhibitor κ B
JAK:	Janus Kinase
JNK:	c-Jun N-terminale Kinase
JunD:	Transkriptionsfaktor, Protoonkogen
KPV:	C-terminales Tripeptid von α -MSH, Synonym: α -MSH 11-13
LBP:	<i>Lipopolysaccharid binding protein</i>
LPS:	Lipopolysaccharid
LRR:	<i>leucin rich repeats</i>

– Abkürzungsverzeichnis –

MAPK:	<i>mitogen activated protein kinase</i>
MAPKK:	MAP-Kinasen-Kinasen
MAPKKK:	MAP-Kinasen-Kinasen-Kinasen
MCP-1:	<i>Monocytes chemotactic protein 1</i>
MC-R:	Melanokortinrezeptor
MD-2:	Myeloid Differenzierungsfaktor 2
MDA5:	<i>melanoma differentiation associated gene 5</i>
MEK:	MAP-ERK-Kinase
MEKK:	<i>MAPK/extracellular signal-regulated kinase kinase</i>
MHC:	<i>major histocompatibility complex</i>
MIP:	<i>macrophage inflammatory protein</i>
MKK:	<i>mitogen activated protein kinase kinase</i>
MMP:	Matrix-Metallo-Protein
CpG DNA:	Cytosin-phosphatidyl-Guanosin DNA
MNK:	<i>MAPK-interacting kinase</i>
MK:	<i>MAPK-activated protein kinase</i>
MOS:	eine MAPKKK
mRNA:	messenger RNA
MSH:	Melanozyten stimulierendes Hormon
MSK:	<i>mitogen- and stress- activated protein kinase</i>
MTT:	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl Tetrazolium Bromid
MyD88:	Myeloider Differenzierungsfaktor 88
NaCl:	Natriumchlorid
Nf- κ B:	<i>nuclear factor κB</i>
NIK:	<i>Nf-κB-inducing kinase</i>
NLS:	Nuklear Lokalisationsequenz
P38:	MAP-Kinase
p50/p105:	Protein der Nf- κ B/Rel-Familie
p52/p100:	Protein der Nf- κ B/Rel-Familie
p65 (RelA):	Protein der Nf- κ B/Rel-Familie
PAGE:	Polyacrylamid-Gelelektrophorese

– Abkürzungsverzeichnis –

Pam ₃ Cys:	Pam ₃ Cys-Ser-(Lys) ₄
PAMP:	<i>pathogen associated molecular pattern</i>
PBS:	Phosphat buffered saline
PC:	Prohormonkonvertase
PCR:	Polymerase-Kettenreaktion
PGE ₂ :	Prostaglandin E 2
PI3K:	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PKA:	Proteinkinase A
PKR:	Proteinkinase R
Poly (I:C):	polyinosine-polycytidylic acid
POMC:	Proopiomelanokortin
PRR:	Pathogen assoziierter Mustererkennungsrezeptor
R848:	Imidazochinolin Derivat
RAF:	eine MAP-Kinase Kinase Kinase
RelB:	Protein der Nf-κB/Rel-Familie
RHIM:	<i>receptor interacting protein homotypic interaction motif</i>
RHR:	Rel homologe Region
RIG:	<i>retinoic-acid-inducible protein</i>
RIP:	<i>receptor interacting protein</i>
RNA:	Ribonukleinsäure
ROS:	<i>reactive oxygen species</i>
RPMI-Medium:	Roswell Park Memorial Institute Grundmedium
RSK2:	ribosomale Kinase-2
RT-PCR:	Reverse-Transkriptase-Polymerasekettenreaktion
RW-Primer:	reverse Primer
SAPK:	Stress-aktivierte Proteinkinase
SCF:	Skp1-Cullin-F-Box Familie
SDS:	Sodiumdodecylsulfat
STAT:	<i>signal transducer and activator of transcription</i>
TAD:	Transaktivierungsdomäne
TAE:	Tris-Acetat-EDTA
TAK:	TGF-β activated kinase

– Abkürzungsverzeichnis –

TAO:	eine MAPKKK
TBK:	TANK-bindende Kinase
TBS:	Tris-gepufferte Saline
TBS-T:	Tris gepufferte Saline mit TWEEN
TEMED:	N, N, N', N', Tetramethylethyldiamin
TIR:	Toll/IL-1 receptor
TIRAP-MAL:	Toll/IL-1 Rezeptordomäne enthaltendes Adaptorprotein
TLR:	Toll-like receptor
TNF:	Tumor Nekrose Faktor
Tpl-2:	Tumor Progression Locus-2
TRAF:	<i>TNFR-associated factor</i>
TRAM-TICAM:	TRIF-verwandtes Adaptormolekül
TRIF-TICAM:	Toll/IL-1 Rezeptordomäne enthaltender IFN- β induzierender Adaptor
TRIS:	Tris-(Hydroxymethyl)-Aminomethan
TWEEN:	Polyoxyethylenesorbitan monolaurate
UBC13:	Ubiquitin-Konjugation-Enzym 13
UEV1A:	Ubiquitin-E2 Variante 1a
VCAM:	vaskuläres Zelladhäsionsmolekül

8 Danksagung

Ich danke Allen, die mich bei der Planung und Erstellung der Arbeit beraten und begleitet haben.

Mein Dank gilt Univ.-Prof. Dr. med. Dr. h.c. T. Luger für die freundliche Überlassung des Themas.

Ganz besonders danke ich Priv.-Doz. Dr. M. Schiller, der mir während des gesamten Entstehungsprozesses dieser Arbeit jederzeit mit Rat und Tat zur Seite stand.

Ferner danke ich Prof. Dr. M. Böhm für seine hilfreichen Ratschläge und Anregungen.

Des Weiteren danke ich den Mitarbeitern des Labors für Zellbiologie, insbesondere Nicole Hoecker und Agatha Kokot, für die tatkräftige Unterstützung im Rahmen der praktischen Durchführung.

Mein Dank gilt auch Dr. rer. nat. K. Loser für die freundliche Bereitstellung der verwendeten Primer.

Zu guter Letzt danke ich meiner Familie, meinem Freund und meinen Freunden für ihre Hilfe und Begleitung.

9 Lebenslauf