

Aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene
der Universität Tübingen

Ärztlicher Direktor: Professor Dr. I. B. Autenrieth

**Aktivatoren und Signaltransduktion des HIF-1 α - / VEGF-
Signalweges in murinen dendritischen Zellen im
Rahmen von Infektionen mit *Yersinia enterocolitica***

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Szilvia Takács
aus
Karl-Marx-Stadt
2011

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter: Professor Dr. I. B. Autenrieth

2. Berichterstatter: Professor Dr. H.-G. Rammensee

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung.....	1
1.1. <i>Yersinia enterocolitica</i>	1
1.1.1. Mikrobiologische Charakteristika	1
1.1.2. Epidemiologie.....	1
1.1.3. Pathogenese und Pathogenitätsfaktoren	2
1.1.4. Klinisches Bild der humanen Yersiniose.....	5
1.2. Der Transkriptionsfaktor Hypoxia-inducible factor (HIF-1)	5
1.2.1. Aufbau und Struktur von HIF-1	6
1.2.2. Zielgene von HIF-1	6
1.2.3. Regulation von HIF-1	7
1.2.3.1. HIF-1- Prolylhydroxylierung / prolyl hydroxylase domain containing proteins (PHDs)	8
1.2.3.2. Polyubiquitination durch das von Hippel-Lindau Tumorsuppressor Protein (pVHL).....	8
1.2.4. Normoxische Induktion von HIF-1	9
1.2.5. Hypoxische Induktion von HIF-1	10
1.2.6. Die Rolle von HIF-1 in der Entwicklung und bei Erkrankungen.....	11
1.3. Das Zytokin Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF).....	12
1.3.1. Biologische Aktivitäten von VEGF.....	13
1.3.2. Die Organisation der VEGF-Gene	13
1.3.3. Die Regulation der VEGF-Genexpression	14
1.3.4. VEGF-Rezeptoren	14
1.4. Dendritische Zellen (DCs) bilden die Schnittstelle zwischen angeborener und adaptiver Immunität.....	15
1.5. Die Rolle von HIF und VEGF im Immunsystem.....	19
1.6. Pathogen-assoziierte Strukturen werden von Rezeptoren der Immunerkennung (pattern recognition) erkannt.....	22
1.6.1. Toll-like Rezeptoren	22
1.6.2. nucleotide- binding oligomerization domain (NOD)-Proteine.....	24
1.6.3. Initiation der TLR-Signaltransduktion durch Adaptormoleküle	27
1.7. Die Rolle der Kinasen.....	29
1.7.1. MAPK.....	29
1.7.2. PI3K.....	30
1.7.3. Rho GTPasen.....	31
1.8. Fragestellung.....	31
2. Material und Methoden.....	33
2.1. Material	33
2.1.1. Geräte.....	33
2.1.2. Verbrauchsmaterialien.....	34
2.1.3. Chemikalien.....	35
2.1.4. Antibiotika	36

2.1.5.	Antikörper.....	36
2.1.6.	Zytokine.....	37
2.1.7.	Inhibitoren	37
2.1.8.	Bakterienstämme und –medien	38
2.1.9.	Größenstandards	39
2.1.10.	Zellkultur	39
2.1.11.	Puffer und Lösungen	40
2.1.12.	Oligonukleotide	43
2.1.13.	Kits	44
2.1.14.	Mäuse	44
2.1.15.	Sonstiges.....	44
2.1.16.	Computerprogramme.....	44
2.2.	Methoden.....	45
2.2.1.	Mikrobiologische Methoden.....	45
2.2.1.1.	Herstellung von Bakterienstocks.....	45
2.2.1.2.	Vorbereitung der Bakterien zur Infektion von DCs	45
2.2.2.	Zellbiologische Methoden.....	45
2.2.2.1.	Isolierung von DCs aus dem Knochenmark einer Maus.....	45
2.2.2.2.	Kultivierungsbedingungen	46
2.2.2.3.	Bestimmung der Lebendzellzahl mit Trypan-Blau	47
2.2.2.4.	Infektion von DCs mit Bakterien	47
2.2.2.5.	Infektionsversuche nach Vorinkubation der DCs mit spezifischen Inhibitoren	48
2.2.2.6.	Zytokin-Assay	48
2.2.2.7.	Invasions-Assay.....	49
2.2.2.8.	Transwell-Assay	50
2.2.2.9.	Durchflusszytometrie (FACS-Analyse)	51
2.2.3.	Proteinbiochemische Methoden	52
2.2.3.1.	Herstellung von Kernextrakten zur Untersuchung von HIF-1 α	52
2.2.3.2.	Proteinbestimmung nach Pierce	53
2.2.3.3.	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese von Proteinen	53
2.2.3.4.	Western-Blot (Immunoblot)	54
2.2.4.	Bestimmung der Zytokinkonzentration in Zellkulturüberständen über ELISA	56
2.2.4.1.	Gewinnung von Zellkulturüberständen	56
2.2.4.2.	VEGF-ELISA	56
2.2.5.	Molekularbiologische Methoden.....	57
2.2.5.1.	RNA-Isolierung aus DCs.....	57
2.2.5.2.	Quantifizierung der RNA	58
2.2.5.3.	Reverse Transkriptase Reaktion (RT-PCR)	58
2.2.5.4.	Polymerase-Kettenreaktion	59
2.2.5.5.	Agarose-Gelelektrophorese	60
2.2.6.	Statistik	61
3.	Ergebnisse.....	62
3.1.	LPS und <i>Y. enterocolitica</i> induzieren über Toll-like Rezeptoren HIF-1α und VEGF	62

3.1.1.	LPS induziert die HIF-1 α Aktivierung und die nachfolgende VEGF Sekretion in DCs der Maus über einen TLR-abhängigen Weg	62
3.1.2.	<i>Y. enterocolitica</i> induziert die HIF-1 α Aktivierung und die nachfolgende VEGF-Sekretion in DCs der Maus über einen TLR-unabhängigen Weg.....	63
3.2.	<i>Y. enterocolitica</i> induziert VEGF in MyD88^{-/-}-DCs MyD88-unabhängig/Trif-abhängig und in Trif^{-/-}-DCs Trif-unabhängig / MyD88-abhängig	65
3.3.	Die intrazelluläre Signaltransduktion bakteriell infizierter DCs verläuft über ausgewählte Kinasen und GTPasen.....	66
3.3.1.	VEGF-Sekretion in <i>Y. enterocolitica</i> infizierten DCs ist abhängig von MAPK.....	66
3.3.2.	VEGF Sekretion in <i>Y. enterocolitica</i> infizierten DCs ist abhängig von PI3K	68
3.3.3.	VEGF Sekretion in <i>Y. enterocolitica</i> infizierten DCs ist abhängig von Rho GTPasen	69
3.4.	Die Induktion von VEGF wird nicht durch Zytokine wie TNF-α oder IL-1β vermittelt	71
3.5.	Trotz Hemmung der Phagozytose ist die VEGF-Sekretion induzierbar	73
3.6.	Yersinien können ohne direkten Kontakt mit DCs VEGF induzieren....	75
3.7.	Synergistische Stimulation der DCs mit LPS und NOD-Agonisten führt zur VEGF-Sekretion	77
3.8.	VEGF beeinflusst nicht die Expression costimulatorischer Moleküle auf den DCs.....	80
4.	<i>Diskussion und Ausblick</i>	85
4.1.	Die Induktion von HIF-1α und VEGF über Toll-like Rezeptoren	85
4.2.	Die Rolle von MyD88 und Trif im Rahmen der Induktion der Zytokinproduktion	88
4.3.	Die Rolle der MAPK, PI3K und Rho GTPasen in der Zytokinproduktion im Rahmen einer Entzündung oder der Tumorgenese.....	90
4.4.	Proinflammatorische Zytokine aktivieren HIF-1α und VEGF.....	94
4.5.	Die Phagozytose-unabhängige Produktion von Zytokinen und bakterizider Aktivität verschiedener Zellen des Immunsystems.....	96
4.6.	Der antientzündliche Effekt des LPA	100
4.7.	Die Rolle der NODs im Immunsystem.....	102
4.8.	Die Auswirkung von VEGF auf die Expression costimulatorischer Moleküle auf den DCs sowie der T-Zell-Aktivierung	104
5.	<i>Zusammenfassung</i>.....	109
6.	<i>Abkürzungsverzeichnis</i>.....	112
7.	<i>Literaturverzeichnis</i>.....	115

8. Danksagung132

1. Einleitung

1.1. *Yersinia enterocolitica*

1.1.1. Mikrobiologische Charakteristika

Y. enterocolitica ist ein ubiquitär verbreitetes, Gram-negatives, pleomorphes, mono- bis peritrich begeißeltes, nicht sporenbildendes, fakultativ anaerobes Stäbchen (Abb. 1).

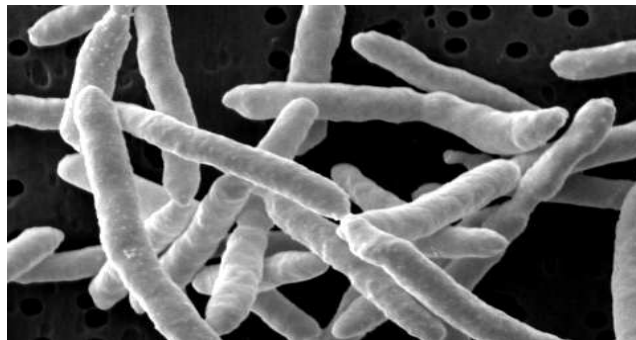


Abb. 1: *Yersinia enterocolitica*

Elektronenmikroskopische Aufnahme (www.sciencephotos.com)

Die optimale Wachstumstemperatur liegt bei 28 °C. Als sogenanntes psychrophiles Bakterium kann es sich auch bei Temperaturen zwischen 0 °C und 4 °C vermehren (Knapp et al. 1973, Kayser et al. 1998). *Y. enterocolitica* ist Oxidase negativ und Katalase positiv (Kayser et al. 1998). Sie gehört zu den Laktose-Nonfermentern und Urease-positiven Organismen (Butler et al. 2005). Die Yersinien weisen eine komplexe Antigenstruktur auf, die auf verschiedenen O- und H-Antigenen beruht (Hof et al. 2005). Man unterscheidet mehr als 60 Serotypen und 6 Biotypen. Die meisten Isolate vom Menschen gehören zu den Serogruppen O:3, O:5.27, O:8 und O:9 (Butler et al. 2005).

1.1.2. Epidemiologie

Y. enterocolitica findet sich weltweit in tierischen Reservoiren, vor allen in Schweinen (Knapp et al. 1973), aber auch in Rindern, Schafen, Nagetieren,

Hunden und Vögeln (Butler et al. 2005). Von ihnen aus kommt es zur Kontamination der Vegetation, des Bodens und von Oberflächenwasser (Knapp et al. 1973, Kayser et al. 1998). Die Übertragung erfolgt auf oralem Weg über tierische Lebensmittel (Milchprodukte, rohes Schweinefleisch) (Herold 2007) oder nach direktem Tierkontakt (Butler et al. 2005). Yersinien können sich noch bei 4 °C im Kühlschrank auf Fleisch oder Wurst vermehren (Herold 2007).

Die bisherigen Untersuchungen scheinen zu belegen, dass *Y. enterocolitica* für den Menschen nicht sehr infektiös ist. Da der Erreger nur in kleinen Mengen und kurzfristig mit dem Stuhl ausgeschieden wird, sind Übertragungen von Mensch zu Mensch ungewöhnlich. Dennoch ist der Nachweis der Erreger bei einer Enteritis meldepflichtig (Knapp et al. 1973). Bei circa 1 % der Durchfallerkrankungen ist *Y. enterocolitica* nachweisbar (Herold 2007). Übertragungen durch Bluttransfusion sind möglich (Bottone 1997, Butler et al. 2005, Herold 2007). Dauerausscheider sind nicht bekannt (Butler et al. 2005). Personen mit einem supprimierten Immunsystem haben ein höheres Risiko an einer Septikämie oder lokalen Abszessen zu erkranken. Die Desferrioxamin (DFO)-Behandlung von Patienten mit Eisenüberladung kann ebenfalls zu einer Yersinien-Sepsis führen, da der Eisenchelator das Wachstum der Bakterien zu fördern und die Leukozytenabwehr gegen Infektionen zu hemmen scheint (Hof et al. 2005, Butler et al. 2005).

1.1.3. Pathogenese und Pathogenitätsfaktoren

Wenn Yersinien über kontaminiertes Essen oder während einer Bluttransfusion aufgenommen werden und in den Wirt gelangen, muss das Pathogen zunächst seine Oberflächenantigene an die Umgebungstemperatur von 37 °C anpassen. Diese Antigene sind zum größten Teil jedoch auf einem großen 64-75 kb großen Virulenzplasmid kodiert, welches in avirulenten Stämmen nicht vorkommt (siehe Tab. 1). *Y. enterocolitica* besitzt verschiedene Pathogenitätsfaktoren, welche entweder chromosomal oder auf dem Virulenzplasmid kodiert sind. Bei Anwesenheit des Virulenzplasmids, dem sogenannten pYV- (*Yersinia* Virulenz) Plasmid werden einige Virulenzfaktoren temperaturabhängig, also bei 37 °C, aber nicht bei 25 °C exprimiert. Viele dieser Faktoren ermöglichen es

den Yersinien, sich den Abwehrmechanismen des Wirtes zu entziehen (Bottone 1997). Das chromosomal kodierte Protein Invasin (*inv*) wird bei 26-28 °C maximal und bei 37 °C vermindert exprimiert (Ruckdeschel et al. 1996). *Ye pYV-* stellen Plasmid-lose Yersinien dar und den *Ye pYV- inv-* fehlt zusätzlich das Invasinprotein. Ruckdeschel zeigt auch, dass bei *Ye pYV- inv-* die Adhärenz an polymorphkernige Neutrophile (PMN) sowie das Phagozytosevermögen durch das fehlende Invasin eingeschränkt sind.

Nach oraler Infektion wird zunächst der Intestinaltrakt kolonisiert. Die Yersinien penetrieren durch die Schleimbarriere zu den Darmzellen des terminalen Ileums und haften an deren Bürstensaummembran. Virulente Plasmid-tragende Yersinien synthetisieren eine Vielzahl von Oberflächenproteinen wie das *YadA*, welches den Bakterien ermöglicht, am Mukus zu adhären. Die Bakterien durchdringen mit Hilfe des *inv*-Proteins die M-Zellen und vermehren sich in den Peyer'schen Plaques (PP). Drei Tage nach der Infektion sind die gesamten PP kolonisiert und ihre Architektur zerstört. Nach dieser Vermehrungsphase disseminieren die Yersinien zu den mesenterialen Lymphknoten und Organen des retikulo-endothelialen Systems wie Leber und Milz (Bottone 1997).

Tab. 1: Übersicht über einige der chromosomal- und plasmidkodierte Pathogenitätsfaktoren von *Y. enterocolitica*. (Schmid 2005)

Chromosomal Kodiert	Funktion
Inv	Invasin, Adhäsion, Transzytose durch M-Zellen durch Bindung an β_1 -Integrine, Internalisation in epitheliale Zellen und Aktivierung der Sekretion von IL-8, aktiviert B- und T-Lymphozyten zur Proliferation oder Zytokin-Sekretion, induziert bei T-Lymphozyten die Bildung von Pseudopodien und vermittelt haptotaktische und chemotaktische Wirkung.
Ail	Vermittelt neben der Adhäsion an und der Invasion in Epithelzellen auch Serum-Resistenz.
LPS	Virulenz bei Serotyp O:8, Serumresistenz und Virulenz bei Serotyp O:3.

Myf	Fimbrien, die möglicherweise als intestinaler Kolonisierungsfaktor zusammen mit Yst Diarrhöe auslösen.
RovA	Regulator von Inv und anderen chromosomalen Virulenzgenen, beeinflusst Entzündungsreaktion in den PP
SodA	Detoxifiziert von PMNs gebildete Sauerstoff-Radikale. Vermittelt Virulenz bei Besiedlung von Leber und Milz, aber nicht bei Kolonisierung der PP.
Yst	Hitzestabiles Enterotoxin, das die Guanylat-Zyklase intestinaler Epithelzellen stimuliert und Diarrhö erzeugt.
HPI	Kodiert für das Siderophor Yersiniabactin und für damit assoziierte Gene und vermittelt Aufnahme von Eisen. Hat möglicherweise immunsupprimierende Wirkung auf B- und T-Zellen, Makrophagen und PMNs.
plasmidkodiert	Funktion
YopT	Zerstörung der Aktinfilamente und Veränderungen des Zytoskeletts. Modifikation von RhoA, dadurch Umverteilung von RhoA von der Membran ins Zytosol. Nicht in allen <i>Y. pseudotuberculosis</i> -Stämmen.
YopH	Protein-Tyrosin Phosphatase, dephosphoryliert Proteine des fokalen Adhäsions-Komplexes. Verhindert durch Auflösung der fokalen Adhäsions-Komplexe Phagozytose durch Makrophagen und Granulozyten. Suppression von oxidative burst und Monozyten Chemoattractant Protein 1 (MCP-1) Produktion in Makrophagen. In B- und T-Lymphozyten Inhibition der Antigen-Rezeptor assoziierten Signaltransduktionskaskaden. Hemmt Proliferation von T- Zellen.
YopE	Zytotoxin, interagiert mit Rho, Rac, Cdc42 und wahrscheinlich noch anderen Molekülen, blockiert Phagozytose, zerstört Aktin-Filamente.
YopM	Agglutination von Plasma, Homologie zum von-Willebrand-Faktor. Wird in den Nukleus transportiert. Interagiert mit den eukaryontischen Kinasen PRK2 und RSK1 und aktiviert sie.
YopO (YpkA)	Zerstörung des Aktinzytoskeletts, dadurch Abrundung von Zellen. Proteinkinase, durch Aktin aktiviert, katalysiert Autophosphorylierung von Serin-Resten. Interagiert mit RhoA und Rac1.

YopP (YopJ)	Induktion von Apoptose in murinen Makrophagen. Reduktion der TNF α -Sekretion in Makrophagen. Cystein-Protease, die die Caspase-Kaskade aktiviert und durch Interaktion mit MAPKK und IKK β die MAPKinase- und NF- κ B-abhängigen Signaltransduktionswege blockiert. Hemmt die Freisetzung proinflammatorischer Zytokine wie IL-8 und TNF- α sowie Präsentation von ICAM-1 und E-Selektin auf endothelialen Zellen.
YadA	Vermittelt Adhärenz an epitheliale Zellen und professionelle Phagozyten. Bindet an Kollagen, zelluläres Fibronectin, Laminin. Vermittelt Phagozytoseresistenz und Schutz gegen Komplement-vermittelte Lyse und Defensine.
LcrV	Suppressiert die Expression von TNF α und IFN- γ . Inhibiert Chemotaxis von Neutrophilen. Induziert in Makrophagen die Produktion des immunsuppressiven Zytokins IL-10.

1.1.4. Klinisches Bild der humanen Yersiniose

Die Yersinien werden wie schon unter 1.1.3. beschrieben in der Regel über kontaminierte Lebensmittel aufgenommen. Die Keime gelangen in den unteren Intestinaltrakt, penetrieren die Mukosa und werden mit den Makrophagen in die Mesenteriallymphknoten transportiert. *Y. enterocolitica* kann abhängig vom Alter, Immunstatus und Vorerkrankungen unterschiedliche Krankheitsbilder hervorrufen, wie z.B. enterische Yersiniosen, extramesenteriale Yersiniosen (Sepsis, Lymphadenopathie, Pleuritis, Endokarditis, Cholezystitis, Osteomyelitis) und immunpathologischen Komplikationen (reaktive Mono- und Oligoarthritis, Erythema nodosum) (Kayser et al. 1998).

1.2. Der Transkriptionsfaktor Hypoxia-inducible factor (HIF-1)

HIF-1 ist ein Regulator der zellulären und systemischen Sauerstoffhomöostase in Mensch und Tier. Diese Homöostase unterliegt einer strikten Regulation, damit für entscheidende Sauerstoffabhängige Prozesse im Organismus genügend Sauerstoff zur Verfügung steht. Übersteigt der Sauerstoffbedarf das Sauerstoffangebot, kommt es zu verschiedenen physiologischen Reaktionen im

Organismus, um dieser Hypoxie entgegen zu treten. Beispielsweise gewinnt die Zelle das Adenosintriphosphat (ATP) über anaerobe Glykolyse oder es steigt die Transportkapazität des Blutes an, um die Versorgung der Gewebe weiterhin zu gewährleisten. Des Weiteren erfolgt durch HIF-1 eine Induktion verschiedener Gene, welche der Zelle die Adaption und das Überleben in einem hypoxischen Milieu erleichtern.

1.2.1. Aufbau und Struktur von HIF-1

HIF-1 ist ein Heterodimer bestehend aus der α - und der β -Untereinheit. Beide enthalten zwei charakteristische Domänen. Die basic helix-loop-helix (bHLH) Domäne und die Per-AHR-ARNT-Sim (PAS) Domäne. Die bHLH Domäne, welche auch in anderen Transkriptionsfaktoren vorkommt, wird für die Dimerisierung beider HIF-Untereinheiten und die Bindung an die DNA benötigt (Zagorska et al. 2004).

HIF-1 α ist ein aus 826 Aminosäuren bestehendes Protein mit einem Molekulargewicht von 120 kDa. Der N-terminale Bereich besteht aus der bHLH und der PAS Domäne. Der C-terminale Bereich enthält eine Domäne, welche für die Degradation von HIF-1 α unter normoxischen Bedingungen verantwortlich ist. Die Aminosäuresequenz der Sauerstoffabhängigen Degradationsdomäne (oxygen-dependent degradation domain, ODD-Domäne) ist unter anderem reich an Prolin. Die Halbwertszeit beträgt unter normoxischen Bedingungen weniger als 10 Minuten (Zagorska et al. 2004, Dery et al. 2005).

HIF-1 β wurde zuvor als aryl hydrocarbon nuclear receptor (ARNT) identifiziert (Zagorska et al. 2004). Es findet sich in Zellen unanhängig vom Sauerstoffgehalt (Dery et al. 2005).

1.2.2. Zielgene von HIF-1

Unter Hypoxie wird mit Hilfe von HIF-1 die Transkriptionsrate mehrerer verschiedener Gene hochreguliert, siehe Tab. 2 (Dery et al. 2005). Untersuchungen haben gezeigt, dass mehr als 2 % aller menschlichen Gene durch HIF-1 reguliert werden, direkt oder indirekt (Ke et al. 2006).

Tab. 2: Zielgene von HIF-1 (modifiziert nach Zagorska et al. 2004)

Prozess		Genprodukt
Kontrolle des Gefäßsystems	Angiogenese	Vascular endothelial growth factor (VEGF) VEGF Rezeptor 1 Plasminogenaktivator-Inhibitor 1 Transforming growth factor (TGF)
	Gefäßtonus	Nitritoxidsynthase 2 Endothelin 1 Adrenomedullin Hämoxxygenase 1
Reifung der Erythrozyten	Erythropoese	Erythropoietin
	Eisentransport	Transferrin Transferrinrezeptor Ceruloplasmin
Energiehaushalt	Glykolyse	Laktatdehydrogenase Phosphoglyceratkinase Aldolase Phosphofruktinase Pyruvatkinase Enolase
	Glucosetransport	Glucosetransporter 1 und 2
Zellproliferation und - lebensfähigkeit	Zellzyklus	p21
	Apoptose	Bcl2/EIB Protein3
	Wachstumsfaktoren	Insulin-like growth factor 2
Andere	pH-Regulation	Carbonanhydrase 9
	Nukleotidmetabolismus	Adenylatkinase 3

1.2.3. Regulation von HIF-1

Während HIF-1 β ein konstitutiv exprimiertes nukleäres Protein darstellt, ist HIF-1 α durch Hypoxie induzierbar und stellt somit den kontrollierenden Faktor für die Regulation von HIF-1 dar. Unter physiologischen, normoxischen

Bedingungen liegt der HIF-1 α -Spiegel generell auf einem sehr niedrigen Niveau (Ke et al. 2006). Stroka et al. (2001) zeigen, dass HIF-1 α in Gehirn, Niere, Leber und Herz der Maus unter normoxischen Bedingungen nur in geringer Menge exprimiert wird. Die Regulation der HIF-1-Aktivität betrifft meist die α -Untereinheit und findet auf verschiedenen Ebenen statt: Proteinstabilisierung, posttranslationale Modifikation, Dimerisation, transkriptionale Aktivierung und Interaktion mit anderen Proteinen (Zagorska et al. 2004).

1.2.3.1. HIF-1- Prolylhydroxylierung / prolyl hydroxylase domain containing proteins (PHDs)

Die Hydroxylierung der Prolinreste von HIF-1 α in der ODD-Domäne wird durch die HIF-1-Prolyl-4-Hydroxylase, Mitglied der Fe²⁺- und 2-Oxoglutarat-abhängigen Dioxygenasen, katalysiert. Im menschlichen Organismus werden mindestens drei verschiedene PHDs exprimiert: PHD1, PHD2 und PHD3. Sie unterscheiden sich in der intrazellulären Lokalisation. Dabei ist PHD1 ausschließlich im Zellkern, PHD2 hauptsächlich im Zytoplasma und PHD3 in beiden Kompartimenten zu finden (Zagorska et al. 2004). Alle drei PHDs haben das Potential HIF-1 α mit einer relativen Aktivität von PHD2 >> PHD3 >> PHD1 zu hydroxylieren (Ke et al. 2006). Die hydroxylierenden Enzyme benötigen neben dem molekularen O₂ auch Fe²⁺ für ihre katalytische Reaktion. Während einer Hypoxie oder im Fall eines Mangels an Fe²⁺ oder 2-Oxoglutarat, verlieren die PHDs ihre Funktion, so dass es letztendlich nicht zur Degradation von HIF-1 α kommt (Dery et al. 2005). Der Abbau von HIF-1 α kann beispielsweise durch Eisenchelatoren wie DFO verhindert werden (Zagorska et al. 2004).

1.2.3.2. Polyubiquitination durch das von Hippel-Lindau Tumorsuppressor Protein (pVHL)

Bei der Ubiquitination von HIF-1 α spielt das pVHL eine Hauptrolle. Durch die Hydroxylierung der Prolinreste kann das pVHL, dessen β -Domäne direkt mit der ODD-Domäne interagiert an HIF-1 α binden (Zagorska et al. 2004, Ke et al. 2006). Das pVHL ist an einen E3-Ubiquitin-Ligase-Komplex gebunden. Durch

die Bindung von pVHL an HIF-1 α kann die Ligase ihre Funktion aufnehmen und die ODD-Domäne mit Ubiquitinresten versehen, um den im Anschluss folgenden Abbau in den Proteosomen einzuleiten. Der pVHL-E3-Ligase-Komplex wird in verschiedenen Geweben exprimiert und ist überwiegend im Zytoplasma lokalisiert. Sein „Pendeln“ zwischen Zytoplasma und Zellkern ermöglicht den HIF-1 α -Abbau in beiden Kompartimenten (Ke et al. 2006). Die Interaktion von pVHL mit HIF-1 ist abhängig von der posttranslationalen Modifikation von HIF-1 α , der O₂- und Eisenabhängigen Prolyl-Hydroxylierung (siehe 2.3.1.). Unter hypoxischen Bedingungen kann pVHL nicht mit der ODD-Domäne interagieren (Zagorska et al. 2004).

1.2.4. Normoxische Induktion von HIF-1

Interessanterweise belegen viele Studien, dass die Stabilisierung von HIF-1 α auch Hypoxie-unabhängig induziert werden kann. Einige Peptidmediatoren führen unter Normoxie zur Akkumulation und Desoxyribonukleinsäure (DNA)-Bindung von HIF-1. Dazu gehören neben den Zytokinen wie Interleukin-1 (IL-1) und Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) (Hellwig-Bürgel et al. 2005) sowohl Hormone wie Insulin oder insulin-like growth factor (IGF) 1/2 als auch vasoaktive Peptide wie Angiotensin II oder Thrombin (siehe Abb. 3). Auch ein Austausch von Metallionen, zum Beispiel wenn Cobalt oder Nickel das Eisenion der PHDs ersetzen, führt zum Funktionsverlust der Enzyme und demzufolge zur Stabilisierung von HIF-1 α (Zagorska et al. 2004). Dabei scheint im Gegensatz zur Hypoxie während der normoxischen Induktion von HIF-1 α dessen Stabilisierung keine Rolle zu spielen. Eine gesteigerte HIF-1 α -Proteintranslation allein scheint suffizient genug zu sein, um das Gleichgewicht zwischen Synthese und Abbau von HIF-1 α in Richtung Akkumulation zu verschieben (Dery et al. 2005).

Wie schon oben beschrieben, wird HIF-1 α unter normoxischen Bedingungen schnell abgebaut. Während einer Hypoxie wird HIF-1 α stabilisiert und transloziert vom Zytoplasma in den Zellkern. Dort dimerisiert es mit der β -Untereinheit zu einem HIF-1-Komplex, welcher in diesem Zustand transkriptional aktiv ist. Der aktivierte HIF-1-Komplex assoziiert mit den hypoxia

response elements (HREs) auf bestimmten Zielgenen und induziert somit eine Genexpression (siehe Abb. 2). Die HREs können innerhalb einer Promotor- oder Enhancer-Region liegen (Ke et al. 2006, Dery et al. 2005, Zagorska et al. 2004).

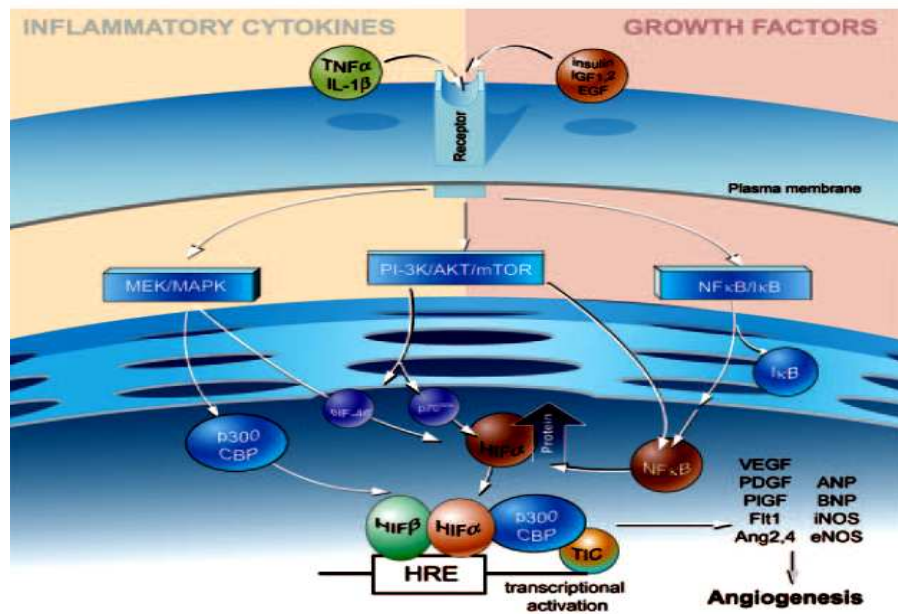


Abb. 2: Regulation der HIF-1 α -Aktivität durch inflammatorische Zytokine und Wachstumsfaktoren

HIF-1 α wird auch unter normoxischen Bedingungen durch eine Vielzahl anderer intrazellulärer Signaltransduktionswege aktiviert, wie zum Beispiel das Inflammations-vermittelte Signaling, getriggert durch TNF- α oder IL-1 β . (Frantz et al. 2005)

1.2.5. Hypoxische Induktion von HIF-1

Wie schon oben beschrieben, wird HIF-1 α unter normoxischen Bedingungen schnell abgebaut. Während einer Hypoxie wird HIF-1 α stabilisiert und transloziert vom Zytoplasma in den Zellkern. Dort dimerisiert es mit der β -Untereinheit zu einem HIF-1-Komplex, welcher in diesem Zustand transkriptional aktiv ist. Der aktivierte HIF-1-Komplex assoziiert mit den hypoxia response elements (HREs) auf bestimmten Zielgenen und induziert somit eine Genexpression (siehe Abb. 2). Die HREs können innerhalb einer Promotor- oder Enhancer-Region liegen (Ke et al. 2006, Dery et al. 2005, Zagorska et al. 2004).

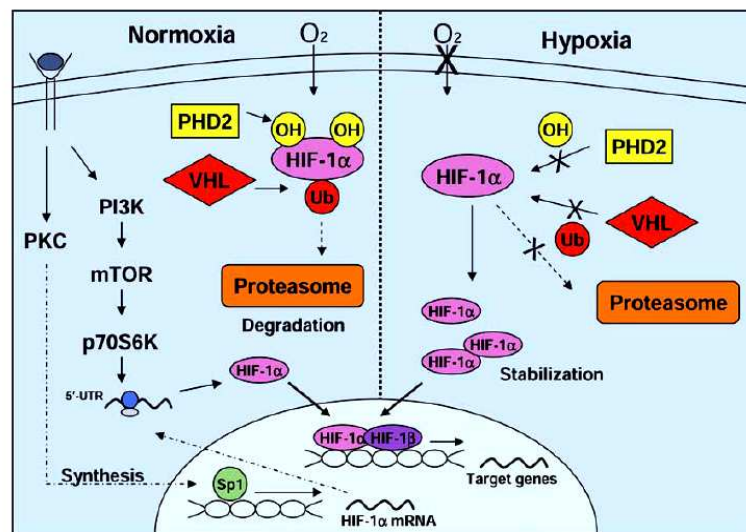


Abb. 3: Regulation der HIF-1 α -Proteinstabilisierung

Unter normoxischen Bedingungen hydroxyliert die HIF-1-Prolylhydroxylase Prolinreste innerhalb der ODD-Domäne. Nach der Prolylhydroxylierung bindet das pVHL an die ODD-Domäne und rekrutiert andere Proteine des E3 Ubiquitin Ligase Komplexes. HIF-1 α wird ausschließlich durch die 26S Proteosomen abgebaut. Unter hypoxischen Bedingungen sind die PHDs inaktiv, was die Bindung an das pVHL verhindert. Deshalb entkommt HIF-1 α der Ubiquitination und dem proteosomalen Abbau. Jetzt kann es in den Zellkern transportiert werden, wo es nach der Dimerisation mit HIF-1 β die Transkription bestimmter Zielgene stimuliert. (Déry et al. 2005)

1.2.6. Die Rolle von HIF-1 in der Entwicklung und bei Erkrankungen

Die Hypoxie und der HIF-Stoffwechsel haben eine große Bedeutung in der Embryonalentwicklung und in der Pathophysiologie von verschiedenen Erkrankungen beim Mensch. HIF-1 spielt eine große Rolle im Wachstum und in der Progression eines Tumors. Die Aktivierung bestimmter Gene, dessen Produkte beispielsweise zu einer erhöhten Sauerstoffzufuhr über Angiogenese und einer gesteigerten Glykolyse führen, verleihen den Tumorzellen einen selektiven Vorteil (Ke et al. 2006).

Komponenten des HIF-Systems spielen eine wichtige Rolle in der Embryonalentwicklung. Ein Knock-out von HIF-1 α -, HIF-2 α oder HIF-1 β -Genen im Mäusen resultiert in einer abnormen Gefäßentwicklung und Letalität. Untersuchungen haben gezeigt, dass Embryonen von HIF-1 α ^{-/-}-Mäusen einen Phänotyp entwickeln, der mit defekter Gefäßbildung, kardiovaskulärer Missbildung und Neuralrohrdefekten aufgrund Absterbens mesenchymaler Zellen einhergeht. Diese Embryonen waren nicht lebensfähig (Ke et al. 2006).

Eine Überexpression von HIF-1 α und HIF-2 α wird in verschiedenen Karzinomarten beim Menschen gefunden; wahrscheinlich eine Konsequenz der intratumoralen Hypoxie oder aufgrund genetischer Veränderungen. Innerhalb des Tumors, wo noch keine adäquate Blut- und O₂-versorgung herrscht, kommt es zur Hypoxie. Unter diesen hypoxischen Bedingungen wird HIF-1 vermehrt stabilisiert und aktiviert. Immunhistochemische Analysen haben gezeigt, dass das detektierbare Level von HIF-1 α in benignen Tumoren gering, in primär malignen Tumoren erhöht und in Metastasen merklich gesteigen ist; im Gegensatz zu seiner Abwesenheit im normalen Gewebe. Zusätzlich führt ein Funktionsverlust von p53, einem Tumorsuppressorprotein, welches in den meisten humanen Tumoren inaktiviert ist, zur erhöhten HIF-1 α -Mengen und zur verbesserten Transkription HIF-abhängiger Gene (Ke et al. 2006).

Die Aktivierung von HIF als physiologische Antwort auf Ischämie, Hypoxie und Entzündung soll einen Schaden am Organ oder Gewebe verhindern oder eindämmen. Zum Beispiel steigen die Level von HIF-1 α und VEGF bei Patienten mit einem akuten Verschluss der Koronararterien im Myokard an. Auch bei einer Präeklampsie der Plazenta oder während des Heilungsprozesses von Wunden kommt es zur Induktion von HIF-1 α und HIF-2 α und deren Zielgene (Ke et al. 2006).

1.3. Das Zytokin Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)

Die Bildung der Gefäße ist eine fundamentale Voraussetzung für die Organentwicklung und Differenzierung während der Embryogenese wie auch bei der Wundheilung. Die Angiogenese ist auch ein Prozess, der in die Pathogenese verschiedener Erkrankungen involviert ist wie zum Beispiel bei der proliferativen Retinopathie, Tumoren, rheumatoider Arthritis, Psoriasis und viele mehr. Tumorassoziierte Neovaskularisierung erleichtert das Tumorwachstum und bei Anschluss an die systemische Zirkulation die Streuung von Metastasen. VEGF spielt an der Seite mehrerer potentiell in der Angiogenese involvierten Faktoren eine herausragende Rolle, sowohl bei physiologischen als auch pathologischen Umständen (Ferrara et al. 1997).

1.3.1. Biologische Aktivitäten von VEGF

VEGF ist ein potentes Mitogen für Endothelzellen der Arterien, Venen und Lymphgefäße. Es fördert die Angiogenese durch Rekrutierung von Endothelzellen in das Bindegewebe und Bildung kapillarähnlicher Strukturen. VEGF ist auch bekannt als vascular permeability factor (VPF), welcher in den Gefäßen „Lecks“ induziert. Es wird vermutet, dass eine Steigerung der Gefäßpermeabilität einen entscheidenden Schritt der Angiogenese bei Tumoren und Wunden darstellt. Entsprechend dieser Hypothese würde sich durch den Verlust von Plasmaproteinen durch diese „Lecks“ extravaskulär Fibrin anhäufen, welches als Substrat für Endothel- und Tumorzellen im Hinblick auf das Wachstum Verwendung findet (Ferrara et al. 1997). VEGF führt in Regionen, wo normalerweise keine gefensterten Endothelzellen vorkommen zu Fenestrations im Endothel von kleinen Venolen und Kapillaren. Pickkers et al. (2005) zeigten in ihrer Studie, dass die erhöhte VEGF-Plasmakonzentration während der ersten 48 h des septischen Schockes einer Meningokokkeninfektion mit der Gefäßpermeabilität korreliert. Ein zusätzlicher Effekt von VEGF auf das Gefäßendothel stellt die Stimulation des Hexosetransports dar. Auf einen gesteigerten Energiebedarf während der Endothelzellproliferation oder Entzündungsprozessen kann der Organismus durch Erhöhung der Transportrate von Hexose in die Peripherie reagieren. Ein weiterer wichtiger Effekt von VEGF stellt die Inhibition der Reifung dendritischer Zellen dar. Diese Beobachtung führt zur Hypothese, dass durch das VEGF (welches selbst von vielen Tumoren gebildet wird) der Tumor einer Induktion der Immunantwort umgeht und somit das Tumorstadium erleichtert wird (Ferrara et al. 1997).

1.3.2. Die Organisation der VEGF-Gene

Das menschliche Gen für VEGF besteht aus acht Exons, getrennt durch sieben Introns. Es ist auf dem Chromosom sechs lokalisiert. Analysen der complementary DNA (cDNA)-Sequenz haben gezeigt, dass es vier verschiedene Spezies mit unterschiedlicher Aminosäureanzahl gibt: VEGF₁₂₁, VEGF₁₆₅, VEGF₁₈₉ und VEGF₂₀₆. VEGF₁₆₅ ist die prädominante Spezies, welche in einer Vielzahl normaler und transformierter Zellen gebildet wird. Im

Gegensatz dazu ist VEGF₂₀₆ eine sehr rare Form, welche nur in humaner fetaler Leber zu finden ist (Ferrara et al. 1997).

1.3.3. Die Regulation der VEGF-Genexpression

Verschiedene Mechanismen nehmen an der Regulation der Genexpression von VEGF teil. Die O₂-Sättigung im Gewebe spielt eine Hauptrolle, *in vitro* und *in vivo*. Unter hypoxischen Bedingungen wird die Expression der VEGF-mRNA schnell und reversibel induziert. Im Glioblastoma multiforme beispielsweise und anderen Tumoren mit einem signifikanten Anteil an nekrotischen Arealen ist die VEGF-mRNA stark exprimiert, besonders in den Tumorzellen, welche in unmittelbarer Nachbarschaft zur Nekrose liegen. Die lokale Hypoxie ist der Hauptinduktor der VEGF-Genexpression bei Tumoren. Ebenfalls werden gesteigerte VEGF-Konzentrationen in ischämischen Gebieten wie zum Beispiel im Myokard beim Herzinfarkt gefunden. Die Aktivierung des VEGF-Gens erfolgt über HIF-1 α (Ferrara et al. 1997).

Verschiedene Zytokine oder Wachstumsfaktoren führen zur Hochregulation der VEGF-mRNA-Expression und/oder induzieren die Freigabe des VEGF-Proteins. Humane Keratinozyten geben Zytokine wie den epidermal growth factor (EGF), (TGF- β) oder keratinocyte growth factor ab, welche in der Induktion von VEGF-mRNA-Expression resultieren. Glioblastomzellen sezernieren ebenfalls EGF, welcher die VEGF-Freigabe stimuliert. IL-1 β induziert die VEGF-Expression in den glatten Muskelzellen der Aorta und IL-1 α sowie Prostaglandin E₂ in synovialen Fibroblasten (Ferrara et al. 1997).

1.3.4. VEGF-Rezeptoren

Verschiedene VEGF-Bindungsstellen auf Zelloberflächen werden beschrieben. Je nach Zelltyp ist ihre Bindungsaffinität hoch oder niedrig. Rezeptoren niedriger Affinität finden sich auf mononukleären Phagozyten, Endothel- oder Tumorzellen, Rezeptoren hoher Affinität auf Gefäßendothelzellen. Dies bestätigt die Hypothese, dass das Gefäßendothel das Hauptziel der VEGF-Aktion ist (Ferrara et al. 1997).

Zwei VEGF-Rezeptor-Tyrosinkinasen wurden identifiziert. Der fms-like-tyrosine (Flt-1)-Rezeptor und der kinase domain region (KDR)-Rezeptor binden VEGF mit hoher Affinität. Der fetal liver kinase-1 (Flk-1)-Rezeptor, homolog zum murinen KDR, ist in 85 % der Aminosäuresequenz mit dem humanen KDR identisch. Die lösliche Form des Flt-1 (sFlt-1) wurde in humanen Endothelzellen der Umbilikalvene gefunden. Dieser Rezeptor bindet VEGF mit hoher Affinität und ist in der Lage die VEGF-induzierte Mitogenese zu hemmen. Er stellt einen physiologischen Negativregulator der VEGF-Wirkung dar (Ferrara et al. 1997). Mäkinen et al. (2001) weisen auf, dass ein VEGF-Rezeptor 3 auf den Endothelzellen der Lymphgefäße deren Wachstum und Überleben reguliert. Er wird nur in Lymphgefäßen exprimiert und bindet VEGF-C und -D. Chen et al. (2004) sprechen in ihrer Studie von einem VEGF-Rezeptor 3, welcher sich auf stromalen dendritischen Zellen (dendritic cells, DCs) einer entzündeten Cornea befindet.

Die Expression der Flt-1- und Flk-1- / KDR-Gene ist im wesentlichen auf das Gefäßendothel beschränkt. Ähnlich wie bei VEGF spielt die Hypoxie eine wichtige Rolle in der Regulation der VEGF-Rezeptor-Genexpression. Versuche an Ratten mit akuter oder chronischer Hypoxie führen zur ausgeprägten Hochregulation von Flt-1- und Flk-1-/ KDR-Genen in den Lungengefäßen. Ebenfalls wird die mRNA dieser Rezeptoren nach einem Herzinfarkt der Ratte im gesamten Herzen hochreguliert (Ferrara et al. 1997).

Einige Studien haben gezeigt, dass die Zytokine TNF- α und TGF- β in der Lage sind die Expression der KDR-Gene in Endothelzellen zu hemmen (Ferrara et al. 1997).

1.4. Dendritische Zellen (DCs) bilden die Schnittstelle zwischen angeborener und adaptiver Immunität

Adaptive Immunantworten werden nicht an der Stelle ausgelöst, an der ein Pathogen einen Infektionsherd verursacht. Dies geschieht vielmehr in organisierten peripheren Lymphgeweben, durch die unaufhörlich naive T-Zellen wandern. Dorthin werden die Krankheitserreger oder ihre Produkte von der aus dem infizierten Gewebe abfließenden Lymphe oder seltener mit dem Blut

abtransportiert. Befallen die Pathogene die Schleimhäute, häufen sie sich in Lymphgeweben wie den Peyerschen Plaques des Darms oder den Tonsillen an, während Pathogene, welche ins Blut gelangen, in der Milz abgefangen werden. Krankheitserreger, welche periphere Stellen befallen, werden in den Lymphknoten in der Nähe des Infektionsherdes „festgehalten“. Alle diese lymphatischen Organe enthalten Zellen, die darauf spezialisiert sind, Antigene abzufangen und sie den T-Zellen zu präsentieren. Die wichtigsten antigenpräsentierenden Zellen (APCs) sind die DCs, welche ein Antigen an der Infektionsstelle aufgreifen und dann mit ihm weiter zum Lymphknoten wandern. Zu den professionellen APC des Immunsystems gehören B-Zellen, Makrophagen und DCs. DCs entwickeln sich aus myeloischen Vorläuferzellen im Knochenmark, welche ebenfalls Vorstufen von Granulozyten, Makrophagen und Mastzellen darstellen. Ihre Entwicklung geschieht unter dem Einfluss des koloniestimulierenden Faktors granulocyt-macrophage colony stimulating factor (GM-CSF), welcher hauptsächlich von den Stromazellen des Knochenmarks und durch reife Formen differenzierter myeloischer Zellen gebildet wird (Janeway et al. 2002, Roitt et al. 1995). Unreife DCs werden mit dem Blut zu den peripheren Geweben transportiert und verbleiben dort bis zum Antigenkontakt. In dieser Phase besitzen sie wenige major histocompatibility complex (MHC)-Proteine und keine costimulierenden Moleküle (Janeway et al. 2002). Es gibt mehrere Möglichkeiten der Antigenaufnahme. Als erstes sei die Makropinozytose genannt, bei der große Mengen der umgebenden extrazellulären Flüssigkeit aufgenommen werden. Über die Phagozytose werden bestimmte Partikel oder mikrobielle Bestandteile in die Zelle einverleibt. Bei der Endozytose findet die Aufnahme der Antigene über den C-type lectin receptor statt, wie zum Beispiel der Makrophagen-Mannose-Rezeptor (Yao et al. 2002, Banchereau et al. 1998). Die unreifen DCs nehmen, wie oben schon erwähnt, an den Infektionsstellen das Antigen auf. Sie verlassen im jetzt aktivierten Zustand das Gewebe, um durch die Lymphbahnen ins sekundäre Lymphgewebe (Lymphknoten, Milz) zu gelangen. Die Signale, welche die DCs dazu veranlassen, nach der Aufnahme des Antigens auf Wanderschaft zu gehen und heranzureifen, sind offensichtlich von entscheidender Bedeutung

dafür, ob es zu einer erworbenen Immunantwort kommt. Sie können aufgrund von direkten Wechselwirkungen mit Krankheitserregern oder aufgrund einer Stimulation durch Zytokine ausgelöst werden (Janeway et al. 2002, Adams et al. 2005). Das am besten untersuchte Beispiel ist die Reaktion auf gramnegative Bakterien, deren Zellwände Lipopolysaccharid (LPS) enthalten. Spezifische Rezeptoren für LPS findet man auf DCs und Makrophagen. LPS assoziiert mit dem Toll-like Rezeptor (TLR) 4, wobei es im Verlauf der weiteren Signaltransduktion zur Aktivierung von NF- κ B kommt. Die auf diesem Weg weitergeleiteten Signale induzieren die Expression von costimulierenden Molekülen und Zytokinen wie den TNF- α , welche die Wanderung der DCs auslösen (Janeway et al. 2002). DCs fungieren im Rahmen einer Immunantwort als hauptsächliche Vermittler der Aktivierung naiver T-Zellen (Priming) (Mempel et al. 2004). Damit stellen sie das zentrale Bindeglied zwischen angeborener und adaptiver Immunität dar (Abb. 4).

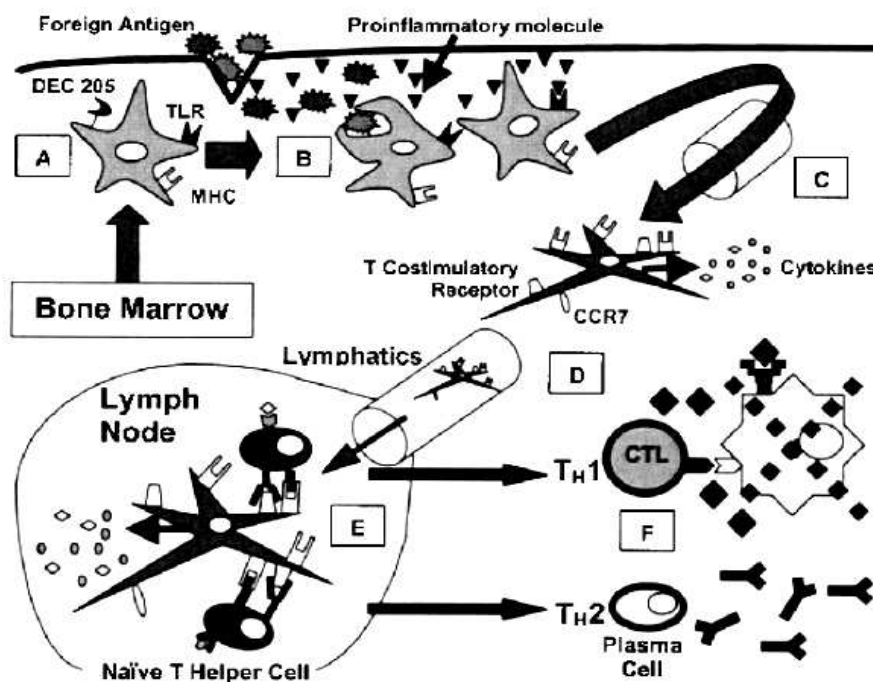


Abb. 4: Übersicht über die Fähigkeit myeloischer DCs, das angeborene mit dem adaptiven Immunsystem zu verbinden

Die unreifen DCs (A) migrieren und verbleiben in der Peripherie, wo niedrige Level an MHC-Molekülen exprimiert werden. Dazu besitzen sie ein Phagozytosevermögen. Die DCs unterziehen sich einer Reifung, nachdem sie Fremdantigene phagozytiert haben oder nach Stimulation ihrer Rezeptoren, wie den TLR (B). Im Anschluss daran wandern die DCs zu den lokalen lymphatischen Geweben (C). Während dieser Periode verlieren die DCs ihre Fähigkeit

zur Phagozytose, die Expression von MHC- und costimulatorischen Molekülen (z.B. CD86) an der Zelloberfläche wird gesteigert und verschiedene Zytokine werden sekretiert (D). Die DCs aktivieren naive T-Zellen (E), welche in T₁- oder T₂-Helferzellen ausdifferenzieren (F). (Efron et al. 2003)

Peptide von intrazellulären Pathogenen, die sich im Zytoplasma vermehren, werden von MHC-I-Molekülen an die Zelloberfläche transportiert und dort den CD8⁺-T-Zellen präsentiert. Peptidantigene von Krankheitserregern, welche in intrazellulären Vesikeln wachsen, und solche, die von aufgenommenen extrazellulären Bakterien und Toxinen abstammen, werden von MHC-II-Molekülen an die Zelloberfläche transportiert und CD4⁺-T-Zellen präsentiert (Banchereau et al. 1998, Janeway et al. 2002, Adams et al. 2005). Die Anzahl der MHC-Komplexe auf den DCs ist 10 bis 100 mal höher als auf anderen antigenpräsentierenden Zellen wie B-Lymphozyten oder Monozyten (Banchereau et al. 1998, Banchereau et al. 2000)

In den sekundären Lymphgeweben, wie z.B. den Lymphknoten, reifen die DCs, welche sich überwiegend in den T-Zell-Bereichen aufhalten, heran und exprimieren große Mengen an costimulierenden Faktoren und Adhäsionsmolekülen, welche eine verstärkte Wechselwirkung zwischen DCs und T-Zellen hervorrufen. Der erste Schritt in der Interaktion zwischen DCs und T-Lymphozyten (siehe Abb. 5) stellt die Erkennung der MHC-Komplexe auf den DCs durch antigenspezifische T-Zell-Rezeptoren (TCR) dar. Diese Verknüpfung wird über verschiedene Adhäsionsmoleküle wie β_1 - und β_2 -Integrine und Mitglieder der Immunglobulin-Superfamilie (CD2, CD50, CD54, CD58) vermittelt. Um die T-Zell-Aktivierung aufrecht zu erhalten, ist die Interaktion zwischen costimulierenden Molekülen der DCs und deren Liganden, exprimiert durch die T-Zellen, der entscheidende Faktor (Banchereau et al. 2000). T-Lymphozyten können DCs über den CD40-Ligand aktivieren. Dies führt zur erhöhten Expression von CD80/CD86 auf den DCs und einer gesteigerten Zytokinausschüttung (IL-1, TNF, IL-12) (Yao et al. 2002, Banchereau et al. 2000). CD86 ist das wichtigste Molekül für eine verstärkte T-Zell-Antwort (Banchereau et al. 2000). IL-12 fördert die Immunität gegen intrazelluläre Infektionen durch T-Helferzellen und verbessert den Wandel der naiven CD8⁺-Zelle zur zytotoxischen T-Zelle (Yao et al. 2002). Neben der Aktivierung naiver

T-Zellen können DCs auch direkt B-Gedächtniszellen aktivieren und über IL-12 die Differenzierung von B-Zellen zu Plasmazellen vermitteln (Banchereau et al. 2000).

Der Reifungsprozess der DCs ist verbunden mit dem Verlust der Endozytose-/Phagozytoserezeptoren und der daraus resultierenden mangelnden Antigenaufnahme-fähigkeit, der Hochregulation costimulierender Moleküle wie CD40 oder CD86, der Reorganisation der Zytoskeletts sowie der Motilität der Zelle (Granucci et al. 1999, Banchereau et al. 2000, Adams et al. 2005).

Ihren Namen erhielten die DCs nach ihren fingerartigen Fortsätzen, den sogenannten Dendriten, welche zwischen den T-Lymphozyten ein verzweigtes Netzwerk bilden (Janeway et al. 2002).

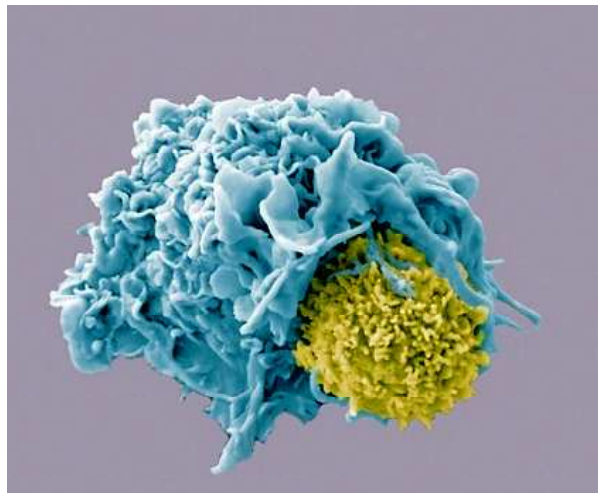


Abb. 5: DC und T-Lymphozyt

Elektronenmikroskopische Darstellung der Interaktion zwischen einer DC (rechts) und einem T-Lymphozyt (links). (www.sciencephotos.com)

1.5. Die Rolle von HIF und VEGF im Immunsystem

Gewebe, geschädigt durch infektiöse Prozesse oder Traumen, sind durch Umgebungsbedingungen mit niedrigem Gehalt an Sauerstoff (< 1 %) und Nährstoffen charakterisiert, welche durch eine inadäquate Perfusion des erkrankten Gewebes mit Bildung multipler transienter oder chronischer hypoxischer Areale entstehen (Peyssonnaud et al. 2004). Viele Bakterien können gut angepasst an die anaeroben Bedingungen im erkrankten Gewebe

überleben und proliferieren, so dass sich die Phagozyten ebenso an diese Umgebung adaptieren müssen, um eine Vernichtung dieser Keime zu gewährleisten (Zinkernagel et al. 2007). Myeloische Zellen erwartet oft im Rahmen einer Entzündung in den infizierten Geweben ein Milieu mit reduziertem Sauerstoffgehalt. Um sich an diese Bedingungen adaptieren zu können, haben sie eine Überlebensstrategie entwickelt, welche die Beteiligung von HIF-1 α erfordert. Dazu gehören zum Beispiel eine HIF-abhängige Adaption an den anaeroben Metabolismus sowie eine Hemmung der Apoptose (Walmsley et al. 2005). Des Weiteren werden verstärkt weitere Makrophagen oder andere inflammatorische Zellen in das betroffene Gewebsareal rekrutiert (Murdoch et al. 2005). Eine Mutation von HIF-1 α in Neutrophilen oder mononukleären Monozyten hat eine starke Beeinträchtigung ihrer Phagozytosefunktion zu Folge (Cramer et al. 2003, Peyssonnaud et al. 2004). In vielen Zellen führt der Verlust der aeroben Energiegewinnung zur funktionellen Beeinträchtigung. Jantsch et al. (2008) demonstrierte in seinen Versuchen, dass DCs in einem hypoxischen Milieu ihre Fähigkeit, nach Kontakt mit LPS eine Immunantwort auszulösen, nicht verloren haben. Der synergistische Effekt von LPS und Hypoxie resultiert in einer anhaltenden Aktivierung der DCs sowie gesteigerten Immunantwort. Wie wirkt sich eine Gewebshypoxie während einer Entzündung oder Infektion auf die Expression von TLRs aus? Kuhlicke et al. (2007) zeigte, dass HIF-1 die Induktion von TLR2 und TLR6 auf DCs und Monozyten während der Hypoxie koordiniert und diese TLRs im Vergleich zur Normoxie verstärkt exprimiert werden.

Kempf et al. (2005) lieferte den ersten Beweis, dass HIF-1 α während einer bakteriellen Infektion von HeLa-Zellen mit *Bartonella henselae*, einem fakultativ intrazellulären Bakterium, aktiviert wird. Mutantenstudien zeigten, dass Wildtyp im Vergleich zu Pilus-defizienten Bartonellen eine verstärkte HIF-1 α -Aktivierung, VEGF-Sekretion und Initiation des proangiogenetischen Programmes, welches die Pathologie der bazillären Angiomatose erklärt, induzieren. Ein anderes obligat intrazelluläres Pathogen, *Chlamydia pneumoniae*, zeigte in der Frühphase der Infektion unter hypoxischen Bedingungen einen additiven Effekt auf die HIF-1 α -Stabilisierung, welcher in

einer gesteigerten Glukoseaufnahme der Zelle resultierte. Während der Spätphase der Infektion, als die Replikation der Chlamydien stattfand, wurde HIF-1 α Pathogen-induziert abgebaut, welches das proapoptotische Signaling verhinderte (Rupp et al. 2007).

Viele physiologische Stimuli können die HIF-1 α -Proteinakkumulation und modulierte Hypoxie-induzierte Genexpression unter normoxischen Bedingungen auslösen. In Makrophagen induziert LPS die HIF-1 α -Akkumulation und die transkriptionale Aktivität unter nichthyposischen Bedingungen (Blouin et al. 2004). HIF-1 spielt eine bedeutende Rolle in der Entwicklung und Funktion von Lymphozyten. So weisen HIF-1 α -defiziente Mäuse signifikante Defekte in der B-Zellentwicklung auf (Hellwig-Bürgel et al. 2005).

VEGF und IL-10, welche von den meisten Tumoren gebildet werden, beeinflussen den Differenzierungsprozess von hämatopoetischen Stammzellen zu funktionstüchtigen DCs. Eine dadurch ausgelöste inadäquate Präsentation tumorspezifischer Antigene durch die DCs, eingeschlossen die erniedrigte oder fehlende Expression von MHC I und MHC II sowie der costimulatorischen Moleküle ermöglichen dem Tumor eine effektive Immunantwort zu umgehen (Gabrilovich et al. 1996, Yao et al. 2002). Oyama et al. (1998) und Dikov et al. (2005) zeigten, dass VEGF spezifisch an den Flt-1-Rezeptor auf der Oberfläche der hämatopoetischen Stammzellen (HPC) bindet und zur Hemmung der NF- κ B (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells)-Aktivität führt, welche in einer defekten DC-Reifung resultiert. Die reduzierte Bindungsfähigkeit von VEGF während der Reifung von HPC zu DCs war mit einem sinkenden mRNA-Level von Flt-1 assoziiert ist. Die Hemmung des VEGF-Signaling ist ein wesentlicher Bestandteil in der Tumorthherapie.

Unter Einsatz des VEGF-Trap, einem löslichen VEGF-Rezeptor-Fusionsprotein, verbessert sich zwar die DC-Differenzierung, aber nicht die Immunantwort (Fricke et al. 2007). Die Studie von Crujisen et al. (2007) zeigt, dass der Einsatz von VEGF-Rezeptor-Tyrosinkinaseinhibitoren die defekte Differenzierung von DCs bei Patienten im fortgeschrittenem Tumorstadium nicht mehr normalisieren kann.

1.6. Pathogen-assoziierte Strukturen werden von Rezeptoren der Immunerkennung (pattern recognition) erkannt

Während die adaptive Immunantwort gegen individuelle Antigene eines bestimmten Erregers gerichtet ist, detektieren Zellen des angeborenen Immunsystems ein breites Spektrum von Pathogenen. Dies geschieht durch die Erkennung Pathogen-assoziiierter molekularer Strukturen (Pathogen-associated molecular patterns, PAMP). Beispiele für PAMPs sind Moleküle wie LPS, Peptidoglykan, Lipoproteine oder doppel- und einzelsträngige RNA, die in vielen Pathogenklassen verbreitet und für das Pathogen essenziell sind. PAMP werden von sogenannten Pattern Recognition Rezeptoren (PRR) auf der Oberfläche von Zellen des angeborenen Immunsystems erkannt. Einige PRR vermitteln ausschließlich Phagozytose, andere führen durch eine proinflammatorische Signaltransduktion zur Aktivierung der Zielzelle. Obwohl die molekulare Struktur aller Mikroorganismen einer selben Gattung hoch konserviert und variabel erscheint, können die meisten davon doch durch eine limitierte Anzahl an PRR erkannt werden (Inohara et al. 2003).

1.6.1. Toll-like Rezeptoren

Der in der Fruchtfliege *Drosophila* identifizierte Rezeptor Toll ist für die dorsoventrale Achsenbildung des Embryos wichtig. Die Toll-homologen Proteine in Vertebraten wurden dann Toll-like Rezeptor genannt (Takeuchi et al. 1999). TLRs gehören zur Familie der Typ-I-Transmembranrezeptoren, die eine extrazelluläre LRR (leucine-rich repeat)-Domäne und eine intrazelluläre Toll/Interleukin 1 (TIR)-Domäne besitzen (Takeuchi et al. 2000). Im Menschen wurden bislang 11, in der Maus 13 TLR beschrieben (Akira et al. 2004).

Toll-like Rezeptoren (TLR) stellen eine wichtige Klasse von PRR dar. Sie sind hauptsächlich auf APCs wie Makrophagen oder DCs exprimiert und ihr Signaling bewirkt durch die Aktivierung des angeborenen Immunsystems den Aufbau einer adaptiven Immunität (Kaisho et al. 2006). Nach Erkennung des mikrobiellen Pathogens triggern TLRs intrazelluläre Signalwege, welche in der Induktion von inflammatorischen Zytokinen und Chemokinen resultieren. TLR-

aktivierte APCs regulieren ihre Oberflächenmoleküle hoch (DC-Reifung) und regen die T-Zell-Aktivierung an (Kawai et al. 2006, Kaisho et al. 2006).

TLR kommen sowohl auf der Zelloberfläche als auch intrazellulär vor. Zu den Oberflächenrezeptoren gehören TLR1, 2, 4 und 6, die Lipide erkennen, sowie im Zellinneren findet man TLR3, 7 und 9, die bakterielle oder virale Nukleinsäuren detektieren (Akira et al. 2004). Einen Überblick über die TLR mit Beispielen für die jeweiligen Liganden gibt Tab. 3 wieder.

Tab. 3: Übersicht über TLRs und ihre Liganden (modifiziert nach Akira et al. 2004)

Rezeptor	Ligand	Quelle der Liganden
TLR1	triacylierte Lipopeptide	Bakterien-Zellwand
TLR2	Peptidoglycan	Zellwand Gram-positiver Bakterien
	Lipoteichonsäure	Zellwand Gram-positiver Bakterien
	Zymosan	Zellwand von Pilzen / Hefen
TLR3	Doppelsträngige RNA	Viren
TLR4	Lipopolysaccharide	Zellwand Gram-negativer Bakterien
TLR5	Flagellin	Bakterielle Flagellen
TLR6	Lipoteichonsäure	Zellwand Gram-positiver Bakterien
	Zymosan	Zellwand von Pilzen / Hefen
TLR7	Einzelsträngige RNA	Viren
TLR8	Einzelsträngige RNA	Viren
TLR9	Hypomethylierte CpG-DNA	Bakterien, Viren
TLR10	unbekannte Komponente	unbekannte Komponente
TLR11	unbekannte Komponente	Uropathogene Bakterien

Ein Vergleich des intrazellulären Signaling von TLR2 und TLR4 hat gezeigt, dass TLR-Agonisten DCs im Hinblick auf deren T-Zell-Stimulation unterschiedlich aktivieren. TLR4-Liganden stimulieren bevorzugt die T₁-Helferzellen über eine p38-MAPK-abhängige DC-Reifung und TLR2 die T₂-Helferzellen ERK1/2-abhängig (Agrawal et al. 2003, Dillon et al. 2004, Caparros et al. 2006).

Das TLR-Signaling spielt eine tragende Rolle bei der Entwicklung verschiedener Erkrankungen, wie z.B. der Sepsis. Im Mittelpunkt des Interesses steht dabei ein spezieller, großmolekularer Bestandteil der Oberfläche von Gram-negativen Bakterien - das LPS, dessen Freisetzung während einer Infektion bei ungünstigerem Verlauf der Krankheit zu einer in der Humanmedizin gefürchteten Komplikation, dem häufig tödlich verlaufenden Endotoxinschock, führt. Sowohl TLR2 wie auch TLR4 sind in die durch LPS ausgelösten Reaktionen des Organismus involviert (Heine et al. 1999). Die LPS-Erkennung durch z.B. DCs oder Makrophagen wird durch die LPS-bindenden Plasmaproteine (LBP) und das Oberflächenprotein CD14 unterstützt (Schwandner et al. 1999, Muta et al. 2001).

Mehr als die Hälfte der Sepsisfälle in den USA, darunter auch viele Todesfälle, werden durch Gram-negative Bakterien verursacht. Eine besonders schwerwiegende Komplikation der Sepsis ist die Immunsuppression der Patienten, welche zur beeinträchtigten Bekämpfung der primären Infektion durch das Immunsystem führt und zu nosokomialen Infektionen prädisponiert (Cook et al. 2004). Es ist daher wichtig, neue Therapien zur Behandlung zu entwickeln.

1.6.2. nucleotide- binding oligomerization domain (NOD)-Proteine

An der intrazellulären Erkennung verschiedener Pathogene scheinen TLR-unabhängige Systemen involviert zu sein. Dies zeigte ein Versuch von Philpott et al. (2000), in dem LPS in das Zytoplasma von Epithelzellen injiziert wurde, welches eine Aktivierung von NF- κ B zur Folge hatte. Dieses Ergebnis suggerierte, dass es neben den TLRs auch ein intraplasmatisches System in der Zelle geben muss, welches LPS erkennt. Girardin et al. (2001) liefert den Beweis, dass invasive Bakterien, wie *Shigella flexneri*, die NF- κ B-Aktivierung über NOD1 induzieren, unabhängig von TLR4.

Neben den oben beschriebenen Transmembranrezeptoren der TLR-Familie wurden im Zytoplasma lokalisierte Rezeptoren des angeborenen Immunsystems beschrieben, die wie TLRs LRRs aufweisen und NF- κ B aktivieren können (Girardin et al. 2003, Inohara et al. 2003). NOD1 und NOD2

erkennen das bakterielle LPS und Peptidoglykan über ihre Carboxy-terminale LRRs (Inohara et al. 2003).

Diese Rezeptoren der sog. NOD-Familie scheinen an inflammatorischen Prozessen beteiligt zu sein, da bestimmte Mutationen, insbesondere von NOD2, beim Menschen mit genetisch bedingten entzündlichen Erkrankungen in Verbindung gebracht werden können (Netea et al. 2004). Eine frame-shift Mutation, die zu einem Defekt in der LRR-Domäne von NOD2 führt, ist beispielsweise mit Morbus Crohn assoziiert (Girardin et al. 2003).

Die ersten Nod-like Rezeptoren (NLR), von denen berichtet wurde, sind die beiden Proteine NOD1 und NOD2, welche verschiedene Substrukturen des bakteriellen Peptidoglykans (siehe Abb. 6) erkennen. NOD2 detektiert Muramyl dipeptid (MDP), die größte molekulare Struktur in Gram-negativen sowie Gram-positiven Bakterien. Im Gegensatz dazu erkennt NOD1 γ -D-Glutamyl-meso-Diaminopimelinsäure (iE-DAP), ein Abbauprodukt des Peptidoglykans, welches v.a. in Gram-negativen Keimen zu finden ist (Fritz et al. 2006).

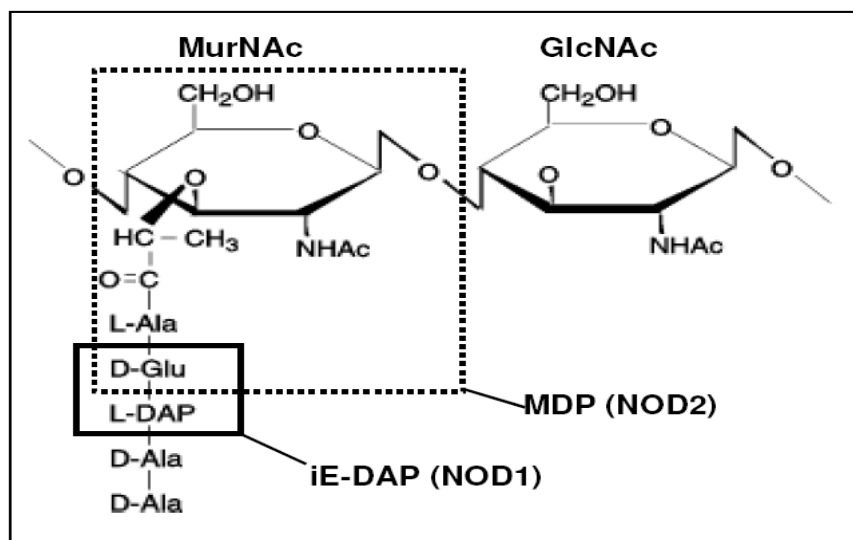


Abb. 6: Schematische Darstellung der Peptidoglykanstruktur.

Gekennzeichnet sind γ -D-Glutamyl-meso-Diaminopimelinsäure (iE-DAP) und Muramyl Dipeptid (MDP) innerhalb des Peptidoglykans, die von NOD1 bzw. NOD2 als minimalistische Struktur erkannt werden.

Ala: Alanin; Glu: Glutaminsäure; GlcNAc: N-Acetylglucosaminsäure; MurNAc: N-Acetylmuraminsäure
(Voß 2006)

Bakterien, welche zu Infektionen im Gastrointestinaltrakt führen, wie z.B. *Salmonella*, invasiver *E.coli*, *Listeria*, *Shigella* und *Yersinia* stellen eine der Hauptursachen der weltweiten Morbidität und Mortalität dar (Chamaillard et al. 2004). Das rasche Erkennen der enteroinvasiven Keime durch Zellen des angeborenen Immunsystems ist entscheidend für deren erfolgreiche Eliminierung. Es wird berichtet, dass das intrazelluläre NOD-Signaling auch ohne direkte Epithelzell-Invasion von Pathogenen ausgelöst werden kann. Die Bakterien *Helicobacter pylori* und *Pseudomonas aeruginosa* z.B. triggern das NOD1-Signaling in Epithelzellen Invasionsunabhängig (Viala et al. 2004, Travassos et al. 2005). NOD1 scheint aber nicht nur eine wichtige Rolle in der Abwehr gegen Bakterien, sondern auch in der Tumorbilogie zu spielen. NOD1-defiziente Brustkebszellen zeigen eine erhöhte Expression von Östrogenrezeptoren, verbunden mit verstärktem Tumorwachstum sowie einer verminderten Apoptose (Correia et al. 2006).

Welche Funktion übernehmen NODs im Immunsystem? NODs, welche in Monozyten und DCs exprimiert werden, verknüpfen das angeborene mit dem erworbenen Abwehrsystem, ähnlich wie es für TLRs bekannt ist; siehe Abb. 7 (Inohara et al. 2003).

Einige Studien beschreiben das Zusammenspiel zwischen TLRs und NODs. Eine synergistische Stimulation von TLRs und NODs mit den jeweiligen Agonisten resultiert in einer gesteigerten Sekretion von Zytokinen (Yang et al. 2001, Uehara et al. 2004, Fritz et al. 2005). Netea et al. (2005) berichtet, dass das durch TLR4 und TLR3, aber nicht TLR5, TLR7 und TLR9 ausgelöste Signaling durch NOD2 moduliert wird. In einer Studie demonstriert er, dass eine Mutation von *NOD2* den synergistischen Effekt der TLR2-vermittelten IL-10-Produktion und T-Helferzell-Stimulation aufhebt, was in einer überschießenden Entzündung des Morbus Crohn resultiert. Tada et al. (2005) beschreibt, dass NOD1- und NOD2-Agonisten in Kombination mit TLR3-, TLR4- und TLR9-Agonisten synergistisch die Produktion von IL-12 und IFN- γ induzieren, um die Immunantwort über T₁-Helferzellen zu aktivieren. Van Beelen et al. (2007) zeigt, dass die durch DCs vermittelte IL-17-Produktion in T-Helferzellen nach Stimulation von NOD2 mit Bakterien in Kombination mit MDP gefördert wird.

NODs scheinen auch als zytosolische Sensoren in der Induktion der Apoptose zu fungieren (Inohara et al. 2003).

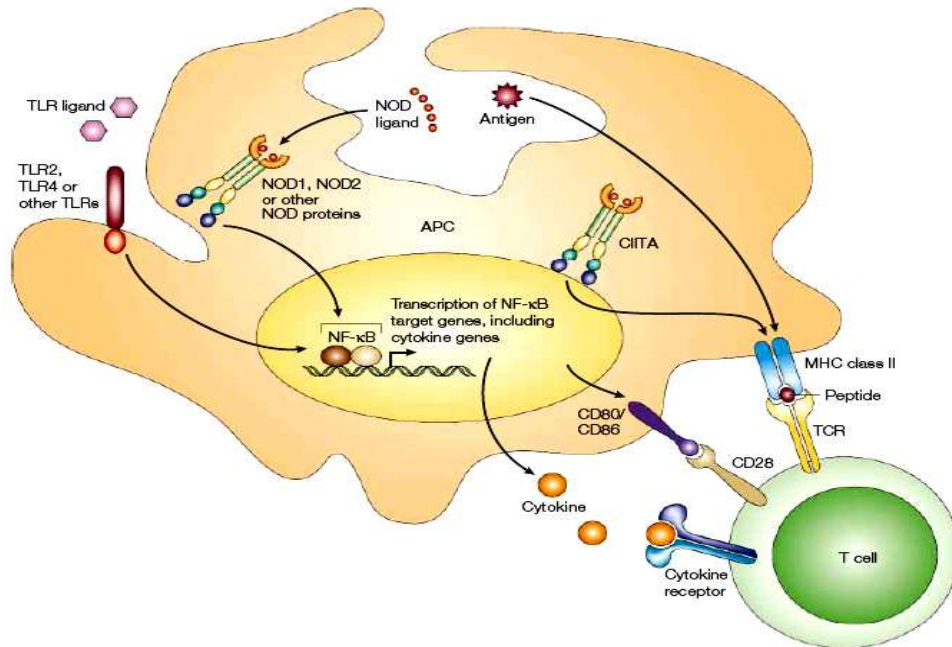


Abb. 7: Modell: Die Rolle von NOD1 und NOD2 im angeborenen und adaptiven Immunsystem

In diesem Modell werden phagozytierte Mikroorganismen sowie freie Liganden durch NODs erkannt. Diese und die durch TLRs erkannten extrazellulären Liganden aktivieren die Signaltransduktion von NF- κ B. Die intrazellulären Ereignisse induzieren die Zytokin-Sekretion der Antigen-präsentierenden Zellen (APC), genauso wie die Expression costimulatorischer Moleküle auf deren Oberfläche. Die Interaktion zwischen costimulatorischem Rezeptor und T-Zell-Rezeptor führt zur Bildung Antigen-spezifischer T-Effektorzellen. (Inohara et al. 2003)

1.6.3. Initiation der TLR-Signaltransduktion durch Adaptormoleküle

TLRs sind eine Familie von Rezeptoren der Immunerkennung (pattern recognition) des Immunsystems, die eine Vielfalt verschiedener pathogener Mikroorganismen, wie z.B. Bakterien, Viren und Pilze erkennen. Nach der Erkennung des jeweiligen mikrobiellen Ligandenmoleküls aktivieren TLRs spezifische intrazelluläre Signalwege. Dies geschieht durch Kopplung an rezeptornahe Adaptormoleküle (siehe Abb. 8) und führt über die Transkriptionsfaktoren NF- κ B oder auch HIF-1 α zur Aktivierung der Transkription von Genen, die weitere angeborene Immunreaktionen initiieren, sowie adaptive

Immunantworten in Gang setzen. Der initiale Schritt der Signaltransduktion ist die Interaktion der Toll-IL-1-resistance (TIR)-Domäne mit intrazellulären Adaptormolekülen, die ebenfalls TIR-Domänen aufweisen. Bisher wurden fünf solcher Adapter beschrieben. Dies sind myeloid differentiation primary response gene 88 (MyD88), toll-interleukin 1 receptor (TIR) domain containing adaptor protein (TIRAP), TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- β (Trif), Toll-IL-1-resistance domain-containing-inducing-interferon β -related adaptor molecule (TRAM) und der negative Regulator des TRIF-abhängigen TLR-Signaling sterile-alpha and armadillo motif containing protein (SARM) (O'Neill et al. 2007). Die verschiedenen TLRs unterscheiden sich in der Verwendung der Adaptormoleküle. TLR4 bindet vier der bekannten aktivierenden Adapter: MyD88, das die gleichzeitige Bindung von TIRAP erfordert (Yamamoto et al. 2002), sowie TRIF, das gemeinsam mit TRAM rekrutiert werden muss (Fitzgerald et al. 2003). Dadurch werden bei TLR4 als einzigem TLR sowohl ein MyD88-abhängiger als auch ein MyD88-unabhängiger (TRIF-abhängiger) Signaltransduktionsweg aktiviert. TLR2 bindet Trif nicht (Mitchell et al. 2007). MyD88 wurde 1990 ursprünglich als ein Protein isoliert, welches während der Differenzierung von M1-myeloischen Leukämiezellen induziert wurde. 1997 entdeckte man dessen Funktion. MyD88 war in das Signaling des Typ 1-IL-1-Rezeptors sowie in das verschiedener TLRs involviert. Analysen an TIRAP-defizienten Mäusen ergaben, dass TIR-Domäne-enthaltende Moleküle, nämlich Trif, die Spezifität der verschiedenen TLR-Signalwege vermittelt (Akira et al. 2004, O'Neill et al. 2007).

Die meisten anderen TLR führen nur zu MyD88-abhängiger Signaltransduktion, wobei der Ko-Adapter Mal nicht in allen Fällen erforderlich ist. TLR3 ist als einziger TLR ausschließlich TRIF-abhängig (O'Neill & Bowie 2007). Die Funktion des Adaptors SARM besteht in der negativen Regulation des TRIF-abhängigen Signalwegs von TLR3 und TLR4 durch direkte Bindung an TRIF (Carty et al. 2006). Die Verwendung unterschiedlicher Adaptormoleküle sowie Abweichungen in der nachfolgenden Signaltransduktion der verschiedenen TLR ermöglichen eine auf das aktivierende Pathogen abgestimmte Reaktion der Zelle. Eine weitere Feinabstimmung ermöglichen Wechselwirkungen und

related kinases (ERK1/2), Jun amino-terminal kinases (JNKI/II/III), p38 proteins (p38 $\alpha/\beta/\gamma/\delta$) und ERK5. Eine der meist erforschten Funktionen des MAPK-Signaling ist die Regulation der Genexpression als Antwort auf extrazelluläre Stimuli. JNKs phosphorylieren Jun-Proteine, wobei dadurch die Transkriptionsfähigkeit der Zelle gefördert wird, ohne die DNA-Bindung zu beeinflussen. Obwohl die Transkriptionsfaktoren eines der wichtigsten Ziele darstellen, ist nur ein Teil des MAPK-Pools im Zellkern zu finden, der Rest bleibt im Zytoplasma zurück. So können MAPK die Genexpression auch durch einen posttranslationalen Mechanismus im Zytoplasma regulieren. MAPK kontrollieren auch das Überleben der Zelle. Während die EKR1/2-Aktivierung an das Überleben gekoppelt ist, sind JNK und p38 an der Induktion der Apoptose beteiligt (Chang et al. 2001).

1.7.2. PI3K

PI3K sind ebenfalls an der Kontrolle verschiedener Zellmechanismen beteiligt, wie dem Zellwachstum, dem Überleben der Zelle, dem zytoskelettalen Remodeling sowie der Funktion intrazellulärer Organellen. Sie kommen ubiquitär in der Zellmembran vieler Zelltypen vor und interagieren als wichtige second messenger im intrazellulären Signaling verschiedener Prozesse. Sie sind anhand ihrer strukturellen Charakteristika und Substratspezifitäten in vier Klassen eingeteilt: I_A, I_B, II und III (Koyasu 2003). Die bedeutendste Funktion nehmen die PI3K im Zusammenhang mit dem Immunsystem ein. Sie regulieren z.B. das Überleben von Thymozyten und die T-Zell-Produktion (Swat et al. 2006) sowie nach Aktivierung der T-Zell-Rezeptoren die Zelldifferenzierung zu CD4⁺- oder CD8⁺- T-Zellen (Rodriguez-Borlado et al. 2003). Mäuse, welche eine Mutation in einer Isoform der PI3K aufweisen zeigen eine beeinträchtigte CD4⁺-T₁-Helferzellen-Antwort nach einer Infektion mit *Leishmania* (Liu et al. 2009). PI3K spielen auch im Allergiegesehen eine bedeutende Rolle. Sie agieren als ein wichtiger downstream-Effektor von hochaffinen Rezeptoren im IgE-Signaling in Mastzellen und regulieren die Degranulation und Migration jener Zellen (Endo et al. 2009).

1.7.3. Rho GTPasen

Rho GTP(Guanosintriphosphat)asen bilden eine Untergruppe der Ras-Superfamilie von 20-30 kDa monomeren GTP-bindenden Proteinen, welche ein breites Spektrum zellulärer Funktionen, wie Reorganisation des Aktinzytoskelettes, Membrantransport- mechanismen (Sekretion, Phagozytose, Pinozytose), Regulation der Transkription und Zellwachstums induzieren (Bishop et al. 2000, Arbibe et al. 2000, Xue et al. 2006, Ridley 2006). Studien weisen darauf hin, dass Rho GTPasen auch in viele Aspekte der Tumorbiologie involviert sind, wie der Tumorgenese, der Metastasierung, der Kontrolle der Zellzyklus und der Apoptose. Es wurden bisher mehr als 20 Mitglieder der Rho GTPasen-Familie identifiziert, wobei Rac1, Cdc42 und RhoA Schlüsselpositionen in der Tumorangiose einnehmen (Xue et al. 2006). Jede dieser Rho GTPasen zeigt einen Wechsel in ihrer Molekularstruktur auf. Die aktive GTP-gebundene Form ist in der Lage, mit anderen Effektormolekülen zu interagieren. Eine intrinsische GTPase führt diese aktive Form wieder in eine inaktive GDP (Guanosindiphosphat)-gebundene Form zurück (Bishop et al. 2000).

1.8. Fragestellung

DCs sind die aktivsten professionellen Antigen-präsentierenden Zellen. Im Rahmen von Infektionen nehmen diese Zellen wichtige Funktionen in der Generierung einer Immunantwort ein, wie beispielsweise der Ausschüttung von Zytokinen oder der Aktivierung von T-Lymphozyten. Sie stellen das zentrale Bindeglied zwischen angeborener und adaptiver Immunität dar. Myeloische Zellen erwartet oft im Rahmen einer Entzündung in den infizierten Geweben ein Milieu mit reduziertem Sauerstoffgehalt. Um sich an diese Bedingungen adaptieren zu können, haben sie eine Überlebensstrategie entwickelt, welche die Beteiligung von HIF-1 α erfordert. HIF-1 α ist ein Transkriptionsfaktor, welcher unter hypoxischen Bedingungen in vielen Geweben induziert wird und die Aktivierung verschiedenster Gene reguliert, unter ihnen die Gene für VEGF. Es ist bekannt, dass dieser Signalweg auch unter normalen Sauerstoffpartialdruck durch bakterielle Bestandteile aktiviert wird.

In Vorversuchen konnte gezeigt werden, dass DCs in der Lage sind, große Mengen an VEGF als Antwort auf bakterielle Bestandteile zu sezernieren. Für die vorliegende Arbeit ergeben sich nun folgende offene Fragen:

1. Über welche Mechanismen erfolgt die Signaltransduktion von der Adhäsion und Phagozytose von *Y. enterocolitica* zur Sekretion von VEGF?
2. Sind die TLR 2 und 4 sowie die Adaptermoleküle MyD88 und Trif im Rahmen einer Infektion von DCs mit *Y. enterocolitica* für die Aktivierung von HIF-1 α und VEGF notwendig?
3. Induzieren die proinflammatorischen Zytokine TNF- α und IL-1 β die VEGF-Sekretion?
4. Stellt die Phagozytose den Trigger für die Ausschüttung von VEGF dar oder gibt es von Yersinien gebildete lösliche Faktoren, welche eine VEGF-Sekretion induzieren?
5. Sind NOD-Proteine an der Induktion der VEGF-Sekretion beteiligt?
6. Welchen Einfluss hat VEGF während der Infektion von DCs mit *Y. enterocolitica* auf die Oberflächenexpression costimulatorischer Moleküle wie MHCII, CD40 und CD86?

Zur Beantwortung dieser Fragen wurden unter Verwendung von DCs (aus dem Knochenmark einer Maus isoliert) zellbiologische, proteinbiochemische und molekularbiologische Untersuchungen durchgeführt.

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Geräte

Agarose-Gel-Elektrophoresekammern	BioRad, München
Analysenwaage BP610, PT1200	Sartorius AG, Göttingen
Electrophoresis Mini Trans-Blot Module	BioRad, München
ELISA-Reader	Tecan, Crailsheim
ELISA-Washer	Tecan, Crailsheim
FACSCalibur™	Becton Dickinson, Heidelberg
Filmentwickler Curix 60	AGFA, Köln
Mehrkanalpipette	Eppendorf, Hamburg
Mikroskop Telaval 31	Carl Zeiss, Jena
Micromat Mikrowellenherd	AEG, Frankfurt am Main
Multipette	Eppendorf, Hamburg
Neubauer-Zählkammer	Superior, Lauda- königshofen
PCR-Thermocycler T3	Biometra, Göttingen
Photometer	Eppendorf, Hamburg
Plattenschüttler	Multimed Wicker, Kirchheim/Teck
Schüttelinkubator	Infors AG, Bottmingen, Schweiz
Spannungsquellen für Elektrophorese (Power Pac 300)	BioRad, München
Steril-Arbeitsbank	BDK Luft- und Raumfahrttechnik, Sonnenbühl
Thermomixer Comfort	Eppendorf, Hamburg
Ultra-Turax T8-Homogenisator	Ika-Werke, Staufen

Vortexer	Heidolph Instruments, Schwabach
Wasserbad	Memmert, Schwabach
Zellkultur-Brutschrank BBD 6220	Heraeus, Hanau
Zentrifugen: Eppendorf 5417R	Eppendorf, Hamburg
Multifuge 3 S-R	Heraeus, Hanau

2.1.2. Verbrauchsmaterialien

AnaeroGen™	Oxoid, Wesel
Blotting Papier	Filtrak, Wiesa
Einmalküvetten	Sarstedt, Berlin
ELISA-Platten	NUNC, Roskilde, Dänemark
Eppendorf-Gefäße	Eppendorf, Hamburg
Cellulosenitrat-Membran (Whatman-Papier)	Schleicher & Schüll, Dassel
Clear Blue X-Ray Film	Pierce, Bonn
Combitips	Eppendorf, Hamburg
Kanülen	BD Biosciences, Heidelberg
Mikrotiterplatten (Flach-, Spitzboden)	Greiner, Nürtingen
Pipettenspitzen: 10 µl (weiß)	BRAND, Wertheim
200 µl (gelb)	Sarstedt, Berlin
1000 µl (blau)	Sarstedt, Berlin
Pipettenspitzen (gestopft, DNase-, RNasefrei)	Biozym, Oldendorf
Plastik-Petrischalen (steril, unbeschichtet)	Greiner, Nürtingen
Röhrchen (15ml, steril)	Greiner, Nürtingen
Röhrchen (50ml, steril)	Becton Dickinson, Heidelberg
Rundbodenröhrchen (5ml, steril)	Becton Dickinson, Heidelberg
Spritze (10ml)	Braun, Melsungen
Transwell-Einsätze (0,4µm Porengröße)	BD Biosciences, Heidelberg

Zellkulturpipetten (5ml, 10ml, 25ml, 50ml)	Costar, Bodenheim
Zellschaber	Costar, Bodenheim
Zellsieb (Porengröße 70 µm)	BD Biosciences, Heidelberg

2.1.3. Chemikalien

7-AAD (7-Amino-Actinomycin D)	BD Biosciences, Heidelberg
Acrylamid / Bisacrylamid (Rotiphoresegel 30)	Roth, Karlsruhe
Agarose	Eurobio, Les Iles Ulies, Frankreich
APS (Ammoniumpersulfat)	Merck, Darmstadt
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
BSA (Rinderserumalbumin)	Biomol, Hamburg
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
FCS (fötale Kälberserum)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Glycin	Roth, Karlsruhe
Glycerol	Merck, Darmstadt
LPA (Lysophosphatidic Acid)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Methanol	Merck, Darmstadt
MDP (N-Acetylmuramyl-L-alanyl-D- isoglutamine Hydrate)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Natriumpyruvat	Biochrom, Berlin
nicht essentielle Aminosäuren	Biochrom, Berlin
Orange G Auftragepuffer	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
PBS (Phosphate Buffered Saline) Dulbecco (+ CaCl ₂ , MgCl ₂)	Gibco, Karlsruhe
PerCP Streptavidin	BD Biosciences, Heidelberg
PMA (Phorbol-12-myristate-13-acetate)	Calbiochem, Schwalbach
PMSF (Phenylmethansulfon-Säurefluorid)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Ponceau S	Serva, Heidelberg
SDS (Sodium Dodecyl Sulfat)	Roth, Karlsruhe

TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Tri-DAP (L-alanyl- χ -D-glutamyl-meso-diamino-pimelic Acid)	InvivoGen, Karlsruhe
Tris	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Triton X-100	AppliChem, Darmstadt
Trypan-Blau	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Tween 20	Merck, Darmstadt

2.1.4. Antibiotika

Kanamycin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Nalidixinsäure	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Penicillin / Streptomycin	Biochrom, Berlin
Gentamicin	ICN Biomedicals, Costa Mesa, USA

2.1.5. Antikörper

VEGF-ELISA

Capture Antibody	R&D Systems, Wiesbaden
Detection-Antibody (Mouse VEGF)	R&D Systems, Wiesbaden

HIF-1 α Westernblot

Anti-HIF-1 α	Novus Biologicals, Littleton, USA
Anti-Rabbit-Immunglobulin, HRP-konjugiert (Sekundärantikörper)	Dako Cytomation, Hamburg

Durchflusszytometrie

Allophycocyanin (APC)-Anti-Maus-CD11c	NatuTec, Frankfurt am Main
APCHamster IgG1, λ_1 Isotypkontrolle	BD Biosciences, Heidelberg
Fluorescein Isothiocyanate (FITC)- Anti-Maus-CD40	BD Biosciences, Heidelberg
FITC Hamster IgM, λ_1 Isotypkontrolle	BD Biosciences, Heidelberg

Biotin (Bio)-Anti-Maus-CD86	BD Biosciences, Heidelberg
PerCP Ratte IgG2a, κ Isotypkontrolle	BD Biosciences, Heidelberg
Phycoerythrin (PE)-Anti-Mouse-I-A/I-E	BD Biosciences, Heidelberg
PE Ratte IgG2b, κ Isotypkontrolle	BD Biosciences, Heidelberg
Anti-Maus VEGF	R&D Systems, Wiesbaden

2.1.6. Zytokine

Die in dieser Arbeit verwendeten rekombinanten Zytokine wurden von R&D Systems; Wiesbaden-Nordenstadt bezogen.

rekombinanter mouse Tumornekrosefaktor- α (rmTNF- α)

rekombinantes mouse Interleukin-1 β (rmIL-1 β)

rekombinantes mouse VEGF₁₂₀ (rmVEGF)

rekombinantes mouse VEGF₁₆₄ (rmVEGF)

2.1.7. Inhibitoren

Small GTPases

TcdB-10463 (Inhibitor der RhoA-, Rac1-, Cdc42-GTPasen),
freundlicherweise von Prof. Ingo Just, Hannover, zur Verfügung gestellt

MAP-Kinasen

SP 600125 (Inhibition von JNK-1/2/3), Calbiochem, Schwalbach

SB 203580 (Inhibitor von p38), Calbiochem, Schwalbach

PI3-Kinase

Wortmannin (Inhibitor der PI3-Kinasen, MAP-Kinase), Sigma-Aldrich,
Taufkirchen

Ly 294002 (spezifischer Inhibitor der PI3-Kinase), Calbiochem,
Schwalbach

Zytoskelett/Phagozytose

Cytochalasin D (Inhibition der Polymerisation der Aktinfilamente),
Sigma-Aldrich Taufkirchen

LPA-Antagonist

Ki 16425, Sigma-Aldrich, Taufkirchen

2.1.8. Bakterienstämme und –medien

Stämme:

Yersinia enterocolitica pYV-

Serotyp 0:8, plasmidloses Derivat von *Y. enterocolitica* WA-314; Nal^R
(Heesemann et al., 1987)

Yersinia enterocolitica pYV- Δ inv

Serotyp 0:8, plasmidloses Derivat von *Y. enterocolitica* WA-314, Deletion
des Invasingens durch Kanamycinkasette; Kan^R, Nal^R
(Ruckdeschel et al. 1996)

Escherichia coli mpk2

Serotyp H:8, kommensaler, kolitogener Stamm
(Waidmann et al. 2003)

Kulturmedien

LB-Medium (Luria-Bertani-Medium)	10,0 g Bacto Trypton 5,0 g Bacto Hefeextrakt 5,0 g NaCl ad 1 l H ₂ O; pH 7,5
Einfriermedium für Bakterien	20 % Glycerol in LB-Medium

Alle Medien werden nach ihrer Herstellung autoklaviert und bei Raumtemperatur gelagert.

2.1.9. Größenstandards

Page Ruler (unstained Protein Ladder für den Western-Blot) Fermentas, St.Leon-Rot

1 kb Plus DNA Ladder™ (für PCR) Invitrogen, Karlsruhe

2.1.10. Zellkultur

Die Medien für die Zellkultur wurden steril angesetzt und bei 4 °C gelagert. Das fötale Kälberserum (FCS) wurde vor dessen Benutzung 30 min bei 56 °C im Wasserbad Komplement-inaktiviert.

Kulturmedium zum Kultivierung der DCs

500 ml RPMI 1640

10 % FCS

100 U/ml Penicillin/Streptomycin

1 mM Natriumpyruvat

1 % nicht essentielle Aminosäuren

2 mM L-Glutamin

50 µM β-Mercaptoethanol

200 U/l GM-CSF; Eigenproduktion durch Maus-Myelomzellen P3X63

Für Infektionsexperimente wurden Medien ohne Antibiotika verwendet.

Kulturmedium zur Infektion der DCs

500 ml RPMI 1640

2 % FCS

1 mM Natriumpyruvat

1 % nicht essentielle Aminosäuren

2 mM L-Glutamin

50 µM β-Mercaptoethanol

200 U/l GM-CSF

2.1.11. Puffer und Lösungen

Puffer zur Herstellung von Kernextrakten

Puffer A

- 10 mM Tris, pH 7,5
- 5 mM MgCl₂
- 10 mM KCl
- 1 M DTT
- 0,5 M Na₃VO₄
- 0,2 M PMSF
- 1 : 500 Protease-Inhibitor

Puffer C

- 20 mM Tris, pH 7,5
- 1,5 mM MgCl₂
- 0,42 M KCl
- 1 M DTT
- 0,5 M Na₃VO₄
- 0,2 M PMSF
- 1 : 500 Protease-Inhibitor
- 20 % Glycerol

Complete Proteinase Inhibitor

- 1 Tablette in 2 ml Milliporewasser
- Roche, Mannheim

Puffer und Lösungen für die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Western-Blot

SDS-Probenpuffer (5x)
(Lämmli Puffer)

- 312,5 mM Tris HCl, pH 6,8
- 50 % Glycerol
- 10 % (w/v) SDS
- 250 mM DTT
- 0,5 % (w/v) Bromphenolblau

SDS-Laufpuffer	50 mM Tris 384 mM Glycin 0,1 % SDS ad 1000 ml Milliporewasser
Lösung für ein Sammelgel	500 µl 30 % Acrylamid-Stammlösung 380 µl 1 M Tris, pH 6,8 30 µl 10 % SDS 30 µl 10 % APS 3 µl TEMED 2,1 ml Milliporewasser
Lösung für ein 8%iges Trenngel	2,7 ml 30 % Acrylamid-Stammlösung 2,5 ml 1 M Tris, pH 8,8 100 µl 10 % SDS 100 µl 10 % APS 6 µl TEMED 4,6 ml Milliporewasser
Blot-Puffer	25 mM Tris, pH 8,3 192 mM Glycin 20 % Methanol 0,025-0,015 % SDS ad 1000 ml Milliporewasser
Waschpuffer	25 mM Tris/HCl, pH 7,5 150 mM NaCl 0,05 % Tween 20 ad 1000 ml Milliporewasser
Blockierungspuffer	5 % Magermilchpulver in Waschpuffer

Ponceau S – Arbeitslösung 1 Teil Ponceau S – Stammlösung (2 % Ponceau S, 30 % Trichloressigsäure, 30 % Sulfosalicylsäure) + 9 Teile Aqua bidest

Lösungen zum Entwickeln von Western-Blots: Enhanced Chemiluminescence (ECL) - Detektionslösung

Luminol 0,22 g Luminol
ad 5 ml DMSO

Cumarinsäure 0,075 g Cumarinsäure
ad 5 ml DMSO

Lösung A 250 µl Luminol
220 µl Cumarinsäure
ad 25 ml Tris/HCl (100 mM, pH 8,5)

Lösung B 25 µl 30 % H₂O₂
ad 25 ml Tris/HCL (100 mM, pH 8,5)

Puffer und Lösungen für den VEGF-ELISA

PBS GIBCO, Karlsruhe
Waschpuffer 250 µl Tween 20 in 500 ml PBS
Reagent Diluent R&D Systems, Wiesbaden
(1% BSA in PBS)
Mouse VEGF-Standard R&D Systems, Wiesbaden
Streptavidin-HRP R&D Systems, Wiesbaden
Substratlösung A und B BD Biosciences, Heidelberg
Stopplösung 1 M H₂SO₄

Lösungen für die Proteinbestimmung

BCA Protein Assay Reagent A und B Pierce, Bonn

Puffer für die Isolierung von DCs

Erythrozytenlysepuffer	150 mM NH ₄ CL
	10 mM NaHCO ₃
	10 mM EDTA-Natriumsalz
	ad 1000 ml Milliporewasser

Puffer für die Agarose-Gelelektrophorese

5xTBE-Puffer	54 g Tris-Base
	27,5 g Borsäure
	20 ml 0,5 M EDTA, pH 8,0
	ad 1000 ml Milliporewasser

2.1.12. Oligonukleotide

Für die PCR wurden die in Tab. 4 aufgeführten Primer eingesetzt, welche von der Thermo Fisher Scientific GmbH, Ulm synthetisiert wurden.

Tab. 4: in dieser Arbeit verwendete Oligonukleotide

Bezeichnung	Primer-Sequenz (5' → 3')
NOD1-fw	AAG CAT TTC TGC TAC CCG GAG
NOD1-rev	AAA GAC ATC GGT CAG GGT CAC
NOD2-fw	AGC TGC TAT GTG TTC TCA GC
NOD2-rev	CTG GAG ATG TTG CAG TAC
mbetaActin-fw	GAA ATC GTG CGT GAC ATC AAA G
mbetaActin-rev	AGT TTC ATG GAT GCC TGT ACA G

2.1.13. Kits

Duo Set® ELISA mouse VEGF	R&D Systems, Wiesbaden-Nordenstadt
RNeasy Mini Kit	QIAGEN, Hilden
QuantiTect Reverse Transcription Kit	QIAGEN, Hilden

2.1.14. Mäuse

Die C57BL/6x129Sv- und TLR2^{-/-}x4^{-/-}-Mäuse wurden unter spezifischen pathogenfreien (SPF)-Bedingungen in unserer Aufzuchtstation in einem Überdruck-Käfig gehalten und erhielten unbegrenzt Wasser und Futter.

2.1.15. Sonstiges

Magermilchpulver	Lasana, Everswinkel
LPS (Salmonella minnesota R595)	Calbiochem, Schwalbach

2.1.16. Computerprogramme

Tecan magellan 2.5	Tecan Austria GmbH, Salzburg, Österreich
GraphPad Prism 4.00	GraphPad Software Inc., San Diego, USA
Gel Doc 1000	Bio Rad, München
Summit Version 4.3.	Dako, Fort Collins, USA

2.2. Methoden

2.2.1. Mikrobiologische Methoden

2.2.1.1. Herstellung von Bakterienstocks

Die Bakterienstämme wurden als Glycerin-Kryokulturen aufbewahrt. Zur Herstellung dieser Glycerin-Stocks wurden die jeweiligen Stämme in antibiotikahaltigem LB-Medium über Nacht bei 27 °C angezüchtet, 5 min bei 5000 g zentrifugiert, das Pellet im Einfriermedium (siehe 2.1.8.) resuspendiert und die Aliquots bei -20 °C gelagert.

2.2.1.2. Vorbereitung der Bakterien zur Infektion von DCs

Die Bakterien wurden bei 27 °C im LB-Medium (siehe 2.1.8.) mit dem entsprechenden Antibiotikum (1:1000) über Nacht auf einem Schüttler mit 200 UpM angezüchtet. Am nächsten Tag wurden die Bakterien 1:20 in frisches antibiotikahaltiges LB-Medium überimpft und für 2-3 h bei 37 °C in den Schüttelinkubator gestellt. Nach dieser Bebrütung wurde die Subkultur bei 5000 g, 5 min und Raumtemperatur (RT) zentrifugiert, die Bakterien einmal in PBS gewaschen und anschließend das Pellet in 1-2 ml PBS resuspendiert.

Zur Bestimmung der genauen Bakterienkonzentration wurde die optische Dichte bestimmt. Eine OD_{600nm} von 1,0 entspricht einer Konzentration von circa 5×10^8 Bakterien pro ml. Für die Infektion der DCs wurden die Yersinien mit einer MOI (multiplicity of infection) von 10 verwendet.

2.2.2. Zellbiologische Methoden

2.2.2.1. Isolierung von DCs aus dem Knochenmark einer Maus

Das Töten der Maus sowie die Entnahme der Knochen wurden im Tierstall durchgeführt. Eine mindestens 6 Wochen alte, bevorzugt männliche Maus (wegen der höheren DC-Ausbeute) wurde zuerst mit CO₂ begast. Um sicher zu

gehen, dass die Maus nicht nur vom Gas betäubt ist und während der Prozedur erwacht, wurde anschließend der Genickbruch vollzogen. Die Maus wurde auf das vorher angerichtete Präparierbrett auf dem Rücken liegend mit Nadeln befestigt und mit 70 % Isopropanol desinfiziert. Dann wurde die Haut aufgeschnitten und der Bereich vom Hüft- bis zum Sprunggelenk vom Fell befreit. Der Oberschenkelmuskel wurde von seiner Sehne getrennt und von dem darunter liegenden Knochen entfernt. Der jetzt freiliegende Knochen wurde vom Hüftgelenk abgetrennt, das gesamte Bein bis zum Sprunggelenk herauspräpariert und dieses in einem Falcon-Röhrchen mit sterilem PBS bis zu seiner Weiterverarbeitung im Labor aufbewahrt.

Die Isolation von DCs wurde unter einer Steril-Arbeitsbank durchgeführt. Die Knochen wurden in eine sterile Petrischale gegeben, am Kniegelenk durchtrennt und noch vorhandene Muskulatur mit einem in 70 % Isopropanol getränkten Zellstofftuch abgerieben. Damit das Knochenmark frei zugänglich wurde, entfernte man jeweils die Gelenksbereiche der Knochen. Mit einer Kanüle und einer mit PBS gefüllten Spritze wurde das Knochenmark aus dem Knochen gespült und die Zellsuspension in einem Falcon-Röhrchen aufgefangen. Nach Zentrifugation dieser Suspension bei 400 g, 5 min wurde der Überstand abgesaugt, das Pellet im Erythrozytenlysepuffer resuspendiert und 3-5 min bei RT inkubiert. Danach wurde die Lyse mit PBS + 2 % FCS abgestoppt, die Zellsuspension durch ein Sieb gegeben und die Bestimmung der Zellzahl mit Trypan-Blau durchgeführt: 2×10^6 Zellen pro Petrischale wurden ausgesät. Die Zellsuspension wurde erneut bei 400 g, 5 min zentrifugiert, das Zellpellet im auf 37 °C vorgewärmten Kulturmedium (siehe 2.1.10.) resuspendiert und die berechnete Menge an DCs sowie 10 ml Medium pro Petrischale zugegeben.

2.2.2.2. Kultivierungsbedingungen

Alle Arbeiten mit Zellkulturen wurden unter einer Steril-Arbeitsbank durchgeführt. Lösungen und Materialien wurden bereits steril vom Hersteller bezogen oder sterilfiltriert. Die DCs wurden im Zellkultur-Brutschrank bei 37 °C,

5 % CO₂ und 95 % relative Luftfeuchtigkeit angezüchtet. Die Kultivierung der DCs erfolgte im Zellkulturmedium (siehe 2.1.10.) in sterilen Petrischalen.

Nach der Isolation der DCs aus dem Knochenmark (siehe 2.2.2.1.) wurden die Petrischalen unter den oben genannten Bedingungen 3 Tage bei 37 °C bebrütet. Am 3. Tag wurde in jede Petrischale 10 ml Medium (siehe 2.1.10.) zugegeben und bei 37 °C weiter bebrütet. Am 6. Tag wurden die DCs nochmals gefüttert. Aus jeder Petrischale wurde 10 ml Medium abpipettiert und in einem Falcon-Röhrchen gesammelt. Nach Zentrifugation bei 400 g, 5 min wurde der Überstand abgesaugt, das Pellet in entsprechender Menge im auf 37 °C vorgewärmten Medium resuspendiert und davon jeweils 10 ml zurück in die Petrischalen gegeben. Diese wurden bei 37 °C weiter bebrütet. Am 8. Tag folgten die Versuche.

2.2.2.3. Bestimmung der Lebendzellzahl mit Trypan-Blau

Zur Bestimmung der Zellzahl pro ml Zellsuspension sowie zur Unterscheidung lebender und toter Zellen wurden 90 µl Zellsuspension in 10 µl Trypan-Blau gemischt und in eine Neubauer-Zählkammer gebracht (0,1 mm; 0,0025 mm²). Während tote Zellen den Farbstoff aufnehmen und tiefblau gefärbt sind, erscheinen vitale Zellen im mikroskopischen Bild hell, da sie in der Lage sind den Farbstoff auszuschließen. Es wurden in den vier äußeren Eckquadraten die lebenden Zellen ausgezählt, der Mittelwert gebildet, dieser mit dem Kammerfaktor (1×10^4 /ml) und dem Trypan-Blau-Verdünnungsfaktor multipliziert.

2.2.2.4. Infektion von DCs mit Bakterien

Zur Bestimmung der Antwort der DCs auf bestimmte Bakterienstämme im Hinblick auf die VEGF-Sekretion oder die HIF-1 α -Produktion wurde wie folgt vorgegangen: Am 8. Tag nach der Isolation der DCs und deren Anzucht (2.2.2.2.) wurde das gesamte Medium aus allen Petrischalen abgenommen und in ein Falcon-Röhrchen überführt. Nach Zentrifugation bei 400 g, 5 min und Verwerfen des Überstandes wurden alle Pellets in einer entsprechenden Menge Kulturmedium (siehe 2.1.10.) resuspendiert und in einem Falcon-Röhrchen

gepoolt. Dann erfolgte die Zellzahlbestimmung mit Trypan-Blau (siehe 2.2.2.3.). Je nach Ansatz wurden folgende Zellzahlen ausgesät:

⇒ 6-well-Platte (für Western-Blot): 1×10^7 DCs in 3 ml Medium Endvolumen

⇒ 24-well-Platte (für ELISA): 5×10^5 DCs in 0,5 ml Medium Endvolumen

Danach wurden die Platten in den Zellkultur-Brutschrank gestellt.

Jetzt wurden die Bakterien, welche nun 2-3 h auf dem Schüttler bei 37 °C anwuchsen, für die Infektion der DCs vorbereitet (siehe 2.2.1.4.). Nach dem Waschen, Vermessen und Berechnen wurde das entsprechende Volumen Bakteriensuspension in das vorgesehene well pipettiert und die DCs für 1 h im Brutschrank inkubiert. Nach dieser Inkubationszeit wurden 5 µl pro 24-well und 30 µl pro 6-well Gentamicin zugegeben (1:100). Gentamicin tötet alle Bakterien außerhalb der Zelle ab, welche noch nicht phagozytiert wurden. Die Platten wurde wieder in den Brutschrank zurückgestellt und je nach Fragestellung des Versuches für mehrere Stunden inkubiert.

2.2.2.5. Infektionsversuche nach Vorinkubation der DCs mit spezifischen Inhibitoren

Für Versuche mit spezifischen Inhibitoren (siehe 2.1.7.) wurden diese in antibiotikafreiem Medium auf die gewünschte Konzentration eingestellt und eine halbe Stunde vor Infektion der DCs zugefügt.

2.2.2.6. Zytokin-Assay

In diesem Versuch wurden DCs in einem Zytokinhaltigen Milieu, welches entweder rm TNF- α oder rm IL-1 β in verschiedenen Konzentrationen enthielt, inkubiert und im Anschluß die VEGF-Sekretion bestimmt.

5×10^5 DCs einer C57BL/6x129SV- sowie einer TLR2^{-/-}x4^{-/-}-Maus wurden in 500 µl Medium bzw. Zytokinhaltigem Medium jeweils als Triplets in eine 24-well-Platte pipettiert. Nach 24 h Inkubation im Brutschrank (37 °C / 5 % CO₂-Gehalt / 95 % Luftfeuchtigkeit) wurden die Überstände für den folgenden VEGF-ELISA abgenommen. Versuche unter hypoxischen Bedingungen erfolgten unter Verwendung eines Anaerobiertopfes. Das Prinzip dieses Verfahrens beruht auf

einer chemischen Entfernung des Sauerstoffs. In einem luftdicht verschlossenen durchsichtigen Topf aus Kunststoff wird der verbleibende atmosphärischen Sauerstoff mit Hilfe von AnaeroGen™ Beutel absorbiert und gleichzeitig Kohlendioxid entwickelt.

2.2.2.7. Invasions-Assay

Um die Invasion bestimmter Yersinienstämme in DCs zu bestimmen wurden zunächst 5×10^5 DCs einer TLR2^{-/-}x4^{-/-} - Maus in 500 µl Medium pro well, jeweils als Duplettansatz, in einer 24-well-Platte ausgesät. Ein zweiter identischer Ansatz erfolgte für die VEGF-Bestimmung. Bevor die DCs mit Ye pYV- sowie Ye pYV- inv- infiziert wurden, gab man entsprechende Inhibitoren, welche die Phagozytoseeigenschaft der DCs beeinflussen sollen, eine halbe Stunde vor Infektion in gewünschter Konzentration dem antibiotikafreiem Medium zu. Die Bakterien wurden wie in 2.2.1.2. beschrieben vorbereitet. Für die Infektion der DCs wurden die Yersinien mit einer MOI von 50 verwendet. Die Platte wurde für 5 min bei 400 g zentrifugiert und für 1 h bei 37 °C bebrütet. Anschließend wurden 5 µl pro well Gentamicin (100 µg/ml) zugegeben, um Bakterien, welche noch nicht phagozytiert wurden, abzutöten. 4 h nach der Infektion wurden die kompletten Ansätze pro well, welche zur Invasionsbestimmung angesetzt waren, in Eppendorfgefäße überführt und zentrifugiert (400 g, 5 min, 21 °C), das Pellet in 1 ml warmen PBS gewaschen und diese Suspension nochmals zentrifugiert. Die im Pellet enthaltenen DCs wurden im Anschluss mit je 1 ml PBS/1%-Triton X-100 lysiert. Eine Verdünnungsreihe der lysierten Zellen von 1:10 bis 1:100000 wurde hergestellt und je 100µl der unverdünnten Proben sowie der Verdünnungsstufen auf antibiotikafreien MH (Müller-Hinton)-Platten ausplattiert, zwei Tage bei 27 °C bebrütet und durch Auszählen die Menge an intrazellulären Bakterien (CFU, colony forming unit) ermittelt. Die Überstände zur VEGF-Bestimmung wurden 24 h nach Infektion der DCs abgenommen und VEGF (siehe 2.2.4.2.) gemessen.

2.2.2.8. Transwell-Assay

Mit Hilfe von Transwell-Experimenten wollten wir überprüfen, ob die HIF-1 α -Aktivierung und daraus resultierende VEGF-Sekretion über einen Zell-Zell-Kontakt-abhängigen Mechanismus oder über lösliche Faktoren vermittelt wird. Der Transwell-Einsatz teilt das well in zwei Kompartimente, welche nur durch eine mikroporöse Membran (Porengröße 0,4 μ m) voneinander getrennt sind. Im unteren Kompartiment befinden sich die DCs, im oberen die Yersinien, LPS, LPA oder DFO (Positivkontrolle). Die Membran soll einen direkten Kontakt zwischen Yersinien und DCs verhindern (Abb. 9).

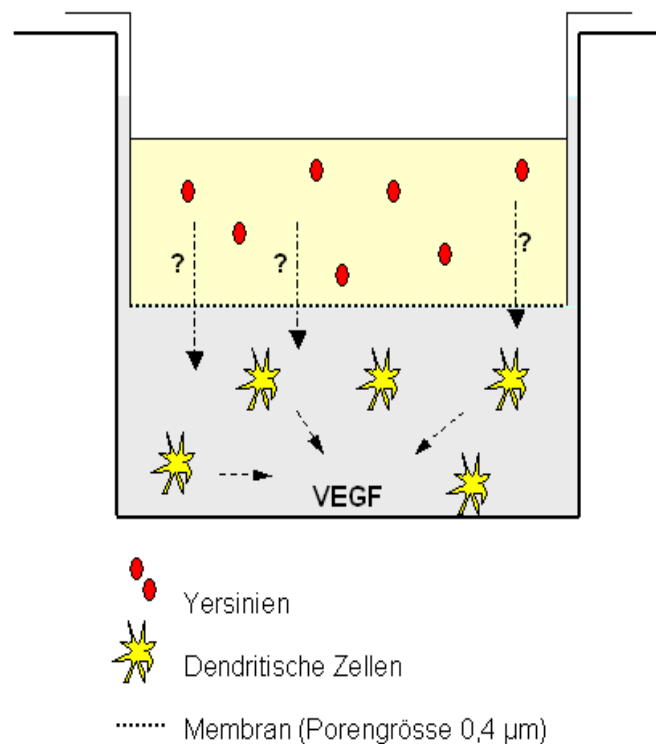


Abb. 9: Transwell-Assay

Es wurden zunächst 5×10^5 DCs einer C57BL/6x129SV- sowie TLR2^{-/-}x4^{-/-} - Maus in 1 ml Medium pro well, jeweils als Duplettansatz, in einer 24-well-Platte ausgesät. Bevor die DCs mit Ye pYV+, Ye pYV- sowie Ye pYV- inv- infiziert wurden, gab man den Inhibitor eine halbe Stunde vor Infektion in gewünschter

Konzentration dem antibiotikafreiem Medium zu. Die Bakterien wurden wie in 2.2.1.2. beschrieben vorbereitet. Für die Infektion der DCs wurden die Yersinien mit einer MOI von 10 verwendet. Die Bakterien sowie LPS, LPA und DFO wurden in den Transwell-Einsatz pipettiert, welcher dann ins well eingesetzt wurde. Die Platte inkubierte 24 h nach Infektion bei 37 °C. Danach wurde der Transwell-Einsatz entfernt und das Medium im unteren Kompartiment für die Bestimmung von VEGF verwendet sowie jeweils 100 µl für die Reinheitskontrolle auf Müller-Hinton (MH)-Platten ausgespatelt und zwei Tage bei 27 °C bebrütet.

2.2.2.9. Durchflusszytometrie (FACS-Analyse)

Die Durchflusszytometrie stellt ein optisches Meßsystem für einzelne in einem Flüssigkeitsstrom fokussierte Zellen dar. Mit ihrer Hilfe können Oberflächenmoleküle quantitativ bestimmt werden. Als Grundlage dient die Antigen-Antikörper-Reaktion, welche mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern durchgeführt wird. Zur Analyse werden die mit Antikörpern markierten DCs durch hydrodynamische Fokussierung aneinandergereiht an einem gebündelten Laserstrahl geeigneter Wellenlänge vorbeigeleitet, welcher den Fluoreszenzfarbstoff anregt. Dessen Emission, welche durch einen Photodetektor registriert wird, verhält sich proportional zur Menge an gebundenem Antikörper. Somit kann in unseren Experimenten eine Aussage über die Expression von Oberflächenmolekülen gemacht werden. Zusätzlich Informationen über Kerngröße (FSC) und Granularität (SSC) der Zelle erhält man durch Lichtbeugung und -streuung.

Die Infektion von 1×10^6 DCs einer C57BL/6x129SV- sowie TLR2^{-/-}x4^{-/-} - Maus mit LPS, Ye pYV- und Escherichia coli mpk2 (E.coli mpk2) erfolgte wie in 2.2.2.4. beschrieben. Modulation der Versuche mit rmVEGF (1:1 Mischung aus rmVEGF₁₂₁ und rmVEGF₁₆₄, Endkonzentration 20 ng/ml) und Anti-VEGF. (Endkonzentration 1 µg/ml). 24 h nach Infektion der DCs wurde die FACS-Färbung angeschlossen.

1 h nach der Zugabe von Gentamicin wurden die Proben in je ein Falcon überführt, zentrifugiert (400 g, 5 min, 4 °C) und das Pellet in 1 ml FACS-Puffer

(PBS + 2 % FCS) gelöst. Danach wurden 5×10^5 DCs pro Ansatz in den Napf einer vorbeschrifteten 96er Mikrotiter-Spitzboden-Platte pipettiert. Nach Zentrifugation (400 g, 5 min, 4 °C) Absaugen des Überstandes. Anschließend Zugabe von 50 µl in FACS-Puffer verdünnter Antikörper-Lösung.

- Anti-CD40-FITC bzw. Isotyp 1:100
- Anti-MHCII-PE bzw. Isotyp 1:800
- Anti-CD86-Bio bzw. Isotyp 1:100
- Anti-CD11c-APC bzw. Isotyp 1:200.

Inkubation für 25 min bei 4 °C im Dunkeln (Kühlschrank). Danach zweimaliges Waschen der Proben mit FACS-Puffer. Die Proben, welche mit biotinyliertem Anti-CD86 versehen sind, müssen zur Detektion noch mit einem Farbstoff, in unserem Fall PerCP gekoppelt werden. Weitere Inkubation für 15 min bei 4 °C im Dunkeln. Danach zweimaliges Waschen der Proben mit FACS-Puffer. Das Pellet nun in 200 µl FACS-Puffer aufnehmen und die Suspension in die zur FACS-Analyse geeigneten Rundbodenröhrchen überführen. Bei der Messung unfixierter Proben wurden tote Zellen direkt vor der Analyse durch Anfärben mit 7-AAD (5 µl pro 1×10^6 DCs) ausgeschlossen. Die Fluoreszenzintensitäten wurden im Zweiparameter-Punktdiagramm (Dot Plot) dargestellt. Die Messung erfolgte am Durchflusszytometer FACSCalibur™ mit Hilfe der Cell Quest Software. Es wurden 50.000 Zellen gemessen. Um unspezifische Fluoreszenz auszuschließen, wurden jeweils Färbungen mit Antikörperkontrollen (Isotypkontrollen) durchgeführt. Für die Auswertung der Zellanalyse diente das Programm Summit Version 4.3.

2.2.3. Proteinbiochemische Methoden

2.2.3.1. Herstellung von Kernextrakten zur Untersuchung von HIF-1 α

Zum Nachweis von HIF-1 α wurden aus den zuvor infizierten DCs Kernextrakte hergestellt. Mit einem Spatel wurden die am Boden haftenden Zellen abgekratzt und die gesamte Zellsuspension in ein 15 ml-Falcon-Röhrchen überführt. Nach Zentrifugation bei 400 g, 5 min wurde der Überstand abgesaugt, das Pellet in 1 ml eiskaltem PBS resuspendiert und die Suspension in ein Eppendorfgefäß

gegeben. Dieses wurde bei 400 g, 5 min zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand gründlich vom Pellet abgenommen. Die DCs wurden bei -80 °C eingefroren, wenn eine Bearbeitung der Zellen zu einem späteren Zeitpunkt erfolgte.

Zu den DCs wurde 100 µl Puffer A (siehe 2.1.11.) zugegeben und 10 min auf Eis inkubiert. Danach wurden die Zellen 5-7 sek mit dem Ultra-Turrax lysiert. Die im Lysat enthaltenen Zellkerne wurden bei 4 °C, 12000 g, 10 min abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 100 µl Puffer C (siehe 2.1.11.) aufgenommen und 30 min bei 4 °C inkubiert. Nach dieser Einwirkzeit erfolgte nochmals eine Zentrifugation bei 4 °C, 20000 g, 30 min. Der nun erhaltene Überstand, welcher sämtliche Proteine des Zellkerns, darunter eventuell auch HIF-1 α enthält, wurde nun in ein neues Eppendorfgefäß überführt.

2.2.3.2. Proteinbestimmung nach Pierce

Um die Proteinkonzentration zu bestimmen, wurden die Proben zunächst 1:10 mit Milliporewasser verdünnt. Diese Vorverdünnungen sowie der BSA-Standard wurden dann 1:20 mit der Pierce-Lösung (50 Teile Lösung A, 1 Teil Lösung B) verdünnt, gemischt und 30 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde die Absorption der Lösungen bei 562 nm bestimmt. Mit dem Standard, welcher bekannte Mengen Rinderserumalbumin enthielt, wurde eine Eichgerade erstellt, mit deren Hilfe über die Absorption der Kernextrakt-Proben deren Proteinmenge bestimmt wurde.

2.2.3.3. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese von Proteinen

Die Auftrennung von Proteinfractionen erfolgte mittels diskontinuierlicher SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE). Bei diesem Verfahren werden die Proteine unter denaturierenden Bedingungen nach ihrer Masse getrennt. Durch den Zusatz von SDS als anionisches, amphipathisches Detergenz im Überschuss werden die Proteine nicht nur gelöst und denaturiert, sondern auch in eine negative Gesamtladung überführt, was ihnen ein einheitliches Verhältnis von Ladung zur Masse verleiht. Die mit SDS beladenen, gestreckten

Aminosäureketten nehmen eine lineare Konformation ein, was den Einfluss der nativen Oberflächenstruktur auf die Wanderungseigenschaften der Proteine aufhebt. Damit hängt die elektrophoretische Beweglichkeit allein von der Größe des Moleküls und der Porengröße des Gels ab. Aufgrund ihrer negativen Ladung wandern die Proteine im elektrischen Feld zur Anode, wobei man eine Auftrennung ausschließlich in der Reihenfolge der Molekulargewichte erhält. Der Trennbereich kann über die Acrylamidkonzentration variiert werden. Diese liegt zwischen 2 % und 30 %, wobei im Netzwerk des Polyacrylamids große Moleküle stärker retardiert werden als kleine. Zur optimalen Darstellung von HIF-1 α mit einer Molekülgröße von 116 kDa wurde ein Trenngel mit einer 8%igen Acrylamidkonzentration gewählt.

Für die Elektrophorese wurden kleine Gele in einer BioRad-Apparatur verwendet. Die Gießapparatur wurde nach Angaben des Herstellers zusammengesetzt. Acrylamid/Bisacrylamid, Tris-Puffer, Milliporewasser und SDS-Lösung wurden nach im unter 2.1.11. aufgeführten Schema gemischt und die Polymerisation durch Zugabe von TEMED und APS eingeleitet. Zuerst wurde das Trenngel in eine Vertikalkammer (10,5 cm x 7,5 cm x 1,0 mm) bis zu 2/3 des Endvolumens gefüllt und mit 70 % Isopropanol überschichtet, um eine glatte Trennfläche zu erhalten. Nach der Polymerisation (10-15 min) und Entfernung des Isopropanols wurde das Sammelgel in das verbleibende Volumen der Gelkammer gegossen und ein 10-Taschen-Kamm (1,0 mm) eingesetzt. Nach erneuter Polymerisation (10-15 min) erfolgte der Probenauftrag in die Geltaschen des zuvor entfernten Kammes. Die Proben wurden zuvor mit 5 x SDS-Probenpuffer (siehe 2.1.11.) versetzt und für 10 min gekocht. Die Elektrophorese erfolgte in 1 x SDS-Elektrophoresepuffer (siehe 2.1.11.) bei einer konstanten Stromstärke von 30 mA für ein Gel für ca. 40 min. Nach erfolgter Elektrophorese wurde das Gel für den Western-Blot weiterverwendet.

2.2.3.4. Western-Blot (Immunoblot)

Blotting ist der Transfer von großen Molekülen auf die Oberfläche einer immobilisierenden, proteinbindenden Membran. Die durch die SDS-

Polyacrylamid-Gelelektrophorese (siehe 2.2.3.3.) aufgetrennten Proteine können aufgrund der negativen Ladung des gebundenen SDS elektrophoretisch weiter auf eine Nitrozellulose-Membran übertragen werden. Im Anschluß können die geblotteten Proteine, in unserem Fall HIF-1 α , über eine spezifische Antikörperreaktion nachgewiesen werden.

Der Proteintransfer von den SDS-Gelen auf eine Nitrozellulose-Membran erfolgte nach der Tank-Blot-Methode. Dabei wurden Gel und Membran übereinander gelegt und von beiden Seiten mit je einer Lage Blotting-Filterpapier und je einem Schwamm bedeckt. Diese Schichtung wurde in eine BioRad-Blotkammer eingesetzt. Der Proteintransfer erfolgte im Blot-Puffer (siehe 2.1.11) bei konstanter Stromstärke von 300 mA für 60 min. Das im Puffer enthaltene Methanol unterstützt die Bindefähigkeit der Blotfolie und verhindert das Quellen des Geles. Die Effizienz des Transfers wurde durch reversible Proteinfärbung mit Ponceau S – Arbeitslösung (siehe 2.1.11.) überprüft; der Farbstoff konnte mit Aqua bidest anschließend wieder entfernt werden.

Zur Abdeckung der unbesetzten Bindungsstellen auf der Membran werden makromolekulare Substanzen verwendet, die an der Nachweisreaktion nicht beteiligt sein dürfen. Die Membran wurde entweder für 1 h bei RT oder über Nacht bei +4 °C im Blockierungspuffer (siehe 2.1.11.) auf einem Gelschüttler inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit Waschpuffer für jeweils 5 min wurde die Membran zur Detektion für 1 h mit dem Primärantikörper anti-HIF-1 α (1:500 mit Blockierungspuffer) unter Schütteln bei RT inkubiert; wahlweise auch bei +4 °C über Nacht. Nach erneutem Waschen mit Waschpuffer für 5 min zur Entfernung von nicht oder unspezifisch gebundenen Antikörper wurde die Membran mit einem Sekundär-Antikörper, welcher mit Meerrettich-Peroxidase konjugiert war (anti-rabbit, 1:1000 in Blockierungspuffer) für 1 h auf dem Gelschüttler inkubiert. Nach dem letztmaligen Waschen der Membran (3 x 5 min) mit Waschpuffer, wurde diese mit ECL-Reagenz (siehe 2.1.11.) für 1 min inkubiert und anschließend zwischen 2 Tageslichtprojektorfolien in eine Entwicklerkassette eingelegt. Zur Detektion der Chemolumineszenz wurde im Dunkeln für 1-10 min ein Film belichtet, welcher anschließend maschinell entwickelt wurde.

2.2.4. Bestimmung der Zytokinkonzentration in Zellkulturüberständen über ELISA

2.2.4.1. Gewinnung von Zellkulturüberständen

Die VEGF-Konzentration wurde in Zellkulturüberständen mit einem enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) bestimmt. Die Überstände wurden 24 h nach der Infektion der DCs abgenommen, in eine Flachboden-Mikrotiterplatte überführt und entweder gleich im Anschluß im ELISA aufgetragen oder bis zur weiteren Untersuchung bei -20°C gelagert.

2.2.4.2. VEGF-ELISA

Um VEGF in Zellkulturüberständen nachweisen zu können wurde ein VEGF-ELISA durchgeführt. Die im Zellkulturüberstand extrem geringen Konzentrationen der Proteine im Pikogrammereich erfordern eine hohe Sensitivität des ELISA. Das zu messende Zytokin reagiert in einer Antigen-Antikörper-Reaktion als Antigen mit einem monoklonalen Primärantikörper (capture antibody), welcher in den Vertiefungen der ELISA-Platte haftet. Ein jetzt hinzugefügter, enzymgekoppelter (in unserem Fall biotinylierter) Sekundärantikörper (detection antibody) bindet an das am Primärantikörper haftende Zytokin. Danach erfolgt die Zugabe von Streptavidin, das mit Meerrettich-Peroxidase konjugiert ist. Dieses bindet wiederum an den Sekundärantikörper. Anschließend wird die Substratlösung zugegeben, das Substrat wird durch die Peroxidase umgesetzt und es kommt zu einer Farbreaktion, deren Intensität sich proportional zur Zytokinkonzentration verhält. Dieser Farbumschlag kann photometrisch gemessen werden und anhand einer Standardkurve mit rekombinanten Zytokinen (in unserem Fall recombinant mouse VEGF) wird die absolute Konzentration ermittelt.

Die Durchführung des VEGF-ELISA erfolgte nach den Angaben des Herstellers. Zum Nachweis von VEGF im Überstand wurden die ELISA-Platten zuerst mit 100 µl capture antibody beschichtet. Dieser Antikörper inkubierte bei 4°C über Nacht. Nach dreimaligem Waschen mit Waschpuffer wurde der ELISA für 1 h

mit Reagent Diluent (1 % BSA in PBS) geblockt, um unbesetzte Bindungsstellen abzudecken. Nach dem zweiten Waschschrift mit Waschpuffer wurden 100 µl Zellkulturüberstand und Standard (Verdünnungsreihe hergestellt) in die jeweiligen Vertiefungen pipettiert und für 2 h bei RT inkubiert. Nach dem dritten Waschschrift mit Waschpuffer wurden 100 µl detection antibody hinzugefügt und wieder 2 h bei RT inkubiert. Nach dem vierten Waschschrift mit Waschpuffer erfolgte die Inkubation mit 100 µl Streptavidin für 20 min bei RT im Dunkeln. Nach dem fünften Waschschrift mit Waschpuffer wurde 100 µl Substratlösung dazu gegeben und die ELISA-Platte bei RT im Dunkeln inkubiert. Nach dieser 20minütigen Inkubationszeit wurde die Farbreaktion mit einer Stopplösung (1 M H₂SO₄) beendet. Anschließend wurde die Absorption photometrisch im ELISA-Reader bei 540 nm gemessen und anhand der Standardkurve die VEGF-Konzentration bestimmt.

2.2.5. Molekularbiologische Methoden

2.2.5.1. RNA-Isolierung aus DCs

Zur Isolation von RNA aus DCs wurde der RNeasy Mini Kit verwendet. Die Durchführung der RNA-Isolierung erfolgte nach den Angaben des Herstellers. Alle Arbeits- und Zentrifugationsschritte wurden bei RT durchgeführt. Für die RNA-Isolierung und die Reverse Transkription wurde DEPC-behandeltes Wasser verwendet, um die enthaltenen RNasen zu inaktivieren.

Für die Isolation der RNA aus Gesamtzelllysaten wurden DCs in 6-well-Platten mit 5×10^6 DCs pro well in 2 ml Medium (siehe 2.1.10.) ausgesät. 2 h bis 24 h nach einer Infektion mit Bakterien wurden die Zellen mit einem Zellschaber vom Boden abgelöst, in ein 15 ml-Falcon-Röhrchen überführt, bei 400 g 5 min zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und das Pellet in 1 ml PBS resuspendiert. Anschließend wurde es in ein RNase-freies Eppendorfgefäß gegeben und erneut zentrifugiert (5 min, 400 g). Nach Abnehmen des Überstandes wurde jede Probe in 350 µl RTL-Puffer, welcher 1:100 mit β-Mercaptoethanol verdünnt wurde, lysiert und 2 bis 3 min inkubiert. Jetzt wurden die Lysate gleich weiter verarbeitet oder bei -80 °C eingefroren. Nach Zugabe

von je 350 µl 70%igem Ethanol wurde die Suspension auf eine Säule gegeben und 20 sek bei 8000 g zentrifugiert. Anschließend wurde die Säule einmal mit RW1-Puffer (20 sek, 8000 g) und zweimal mit RPE-Puffer (20 sek, 8000 g) gewaschen. Um die Säule zu trocknen wurde sie 1 min bei 14000 g zentrifugiert. Zum Eluieren der RNA wurde 30 µl RNase-freies Wasser direkt auf die Säule pipettiert, 1 min bei RT inkubiert und 1 min bei 8000 g zentrifugiert. Im Anschluß wurde die RNA bis zur weiteren Verarbeitung bei -80 °C aufbewahrt oder direkt mit der Konzentrationsbestimmung fortgefahren.

2.2.5.2. Quantifizierung der RNA

Um in allen Proben die gleiche RNA-Konzentration zu erhalten, muss in jeder Probe der RNA-Gehalt gemessen werden, da die isolierte RNA-Menge variiert, d.h. abhängig von der ursprünglichen Zellzahl in der Probe ist. Die Quantifizierung erfolgte photometrisch bei 260 nm. Die optische Dichte (OD) von 1,0 entspricht einer Konzentration von 40 µg/ml.

Alle Proben wurden 1:20 in 10 mM Tris (pH 8) verdünnt, welcher ebenfalls als Nullwertabgleich diente. Der RNA-Gehalt der Probe wurde wie folgt berechnet:
Gemessener OD_{260nm}-Wert x Verdünnungsfaktor 20 x 40 µg/ml

2.2.5.3. Reverse Transkriptase Reaktion (RT-PCR)

Um die Transkription eines Gens nachzuweisen, muss die mRNA untersucht werden. Bei der Amplifikation von DNA durch die PCR (Polymerase-Kettenreaktion) werden spezifische DNA-Polymerasen verwendet, welche DNA-abhängig sind, d.h. sie sind nicht in der Lage, RNA zu amplifizieren. NOD1- bzw. NOD2-mRNA kann nicht direkt über die konventionelle PCR vervielfältigt werden. Deshalb wird zunächst mit Hilfe der Reversen Transkriptase, einer RNA-abhängigen DNA-Polymerase, mRNA in cDNA umgeschrieben. Im Anschluss kann die cDNA als Template für eine PCR verwendet werden.

Die Prozedur der QuantiTect Reverse Transcription (Kit siehe 2.1.13.) ist in zwei Hauptschritte unterteilt. Als erstes wurde die genomische DNA eliminiert und danach erfolgte die reverse Transkription. Anhand der photometrisch

bestimmten Konzentration der RNA (siehe 2.2.5.2.) wurde nun das entsprechend berechnete Volumen für die einzusetzende Menge an RNA und RNase-freiem Wasser mit gDNA Wipeout Buffer als Ansatz pipettiert. Dieser inkubierte 2 min bei 42 °C im Heizblock. Der gDNA Wipeout Buffer baut die genomische DNA ab. Nach der Elimination konnte sofort die reverse Transkription angeschlossen werden. Der Probe wurde ein reverse-transcription master mix hinzugefügt. Dieser beinhaltet alle Komponenten, welche für die cDNA-Erststrangsynthese erforderlich sind. Nach einer Inkubationszeit von 15 min bei 42 °C folgte die Inaktivierung des Enzyms Reverse Transkriptase für 3 min bei 95 °C. Im Anschluß wurde das Template für die konventionelle PCR eingesetzt oder bei nicht sofortiger Verarbeitung bei -20 °C aufbewahrt.

Im Gegensatz zu anderen Methoden sind zusätzliche Schritte wie RNA-Denaturierung, Primer Annealing und RNase H-Verdau nicht mehr notwendig.

2.2.5.4. Polymerase-Kettenreaktion

Mit Hilfe einer thermostabilen DNA-Polymerase wird, ausgehend von Primern (synthetischen Oligonukleotiden), ein neuer DNA-Strang an einer einzelsträngigen Matrizen-DNA vom 3'-Ende ausgehend synthetisiert. Durch die Wahl eines gegenläufig orientierten Primerpaares kann man gezielt die DNA-Sequenz zwischen den beiden Primern vervielfältigen. Durch die zyklische Wiederholung der einzelnen Reaktionsschritte wird die Matrize exponentiell amplifiziert.

Ein PCR-Zyklus beginnt mit der thermischen Denaturierung des zu amplifizierenden DNA-Doppelstranges bei 94 °C. Es entstehen zwei Einzelstränge. Danach erfolgt die Hybridisierung. Hier wird die Temperatur auf 51 °C (bzw. 39 °C) gesenkt. Die Primer haben jetzt die Gelegenheit an die komplementären Sequenzen der Matrizen-DNA zu hybridisieren. Im Anschluss wird die Temperatur auf das Arbeitsoptimum der Taq-Polymerase erhöht (72 °C). Es wird die Amplifikation des zwischen den Primern gelegenen Sequenzabschnittes durchgeführt.

Die Zusammensetzung des Reaktionsansatzes und das verwendete Temperaturprofil entsprachen folgendem Schema:

Ansatz der PCR für 1x Mastermix:

	NOD1/2	β -Actin
PCR-H ₂ O	37,6 μ l	37,6 μ l
10x PCR-Puffer	5,0 μ l	5,0 μ l
Nukleotide (10 mM)	1,0 μ l	1,0 μ l
Primer-fw (10 μ M)	1,0 μ l	1,0 μ l
Primer-rev (10 mM)	1,0 μ l	1,0 μ l
Taq-Polymerase (5 U/ μ l)	0,4 μ l	0,4 μ l
MgCl ₂ (25 mM)	2,0 μ l	
MgCl ₂ (15 mM)		2,0 μ l

Temperaturprofil der eingesetzten semiquantitativen PCR's :

	NOD1	NOD2	β -Actin
Denaturierung	94 °C 120 sek	94 °C 120 sek	94 °C 120 sek
Denaturierung	94 °C 30 sek	94 °C 30 sek	94 °C 30 sek
Annealing	51 °C 30 sek	39 °C 30 sek	51 °C 30 sek
Elongation	72 °C 45 sek	72 °C 45 sek	72 °C 30 sek
Elongation	72 °C 300 sek	72 °C 300 sek	72 °C 300 sek
Pause	4 °C	4 °C	4 °C
Zyklen	28	28	25

Je 10 μ l eines PCR-Ansatzes wurden im Anschluss über die Agarose-Gelelektrophorese (siehe 2.2.5.5.) analysiert. Bei späterer Verarbeitung erfolgte die Lagerung bei -20 °C.

2.2.5.5. Agarose-Gelelektrophorese

Agarosegele werden verwendet, wenn man große Poren für die Analyse von Molekülen über 10 nm Durchmesser benötigt. Agarose ist ein Polysaccharid und wird aus roten Meeresalgen hergestellt. Je nach Größe der aufzutrennenden DNA-Fragmente wird eine Agarosekonzentration von 0,7 %

bis 1,5 % in 0,5x TBE-Puffer eingestellt. Für die NOD1- , NOD2- und β -Actin-PCR wurde ein 1,5% Gel hergestellt. Die Agarose wurde durch Aufkochen in 0,5x TBE-Puffer gelöst und nach Abkühlung auf ca. 50 °C in das Bett einer Horizontal-Gelelektrophorese-Kammer gegossen. Dort geliert es beim Abkühlen. 10 μ l PCR-Produkt, gemischt mit 2-3 μ l 20% Orange G, sowie 4 μ l 1 kb Plus DNA-Ladder (zur Kontrolle der Größe der PCR-Produkte) wurden in die Geltaschen geladen. Als Laufpuffer wurde 0,5x TBE verwendet. Die Gelelektrophorese erfolgte ca. 45 min bei 80 V. Das Gel wurde anschließend 15 min in einer Ethidiumbromid-Lösung (1 μ g/ml) gefärbt, 10 min in H₂O_{dest.} entfärbt und mit Hilfe einer Geldokumentationsanlage (Gel Doc 1000) unter UV-Licht (254 nm) fotografiert.

2.2.6. Statistik

Alle Versuche wurden mindestens dreimal unabhängig voneinander wiederholt und ergaben vergleichbare Ergebnisse. Die Berechnung der Standardabweichung erfolgte über das Programm GraphPad Prism 4.00.

3. Ergebnisse

3.1. LPS und *Y. enterocolitica* induzieren über Toll-like Rezeptoren HIF-1 α und VEGF

3.1.1. LPS induziert die HIF-1 α Aktivierung und die nachfolgende VEGF Sekretion in DCs der Maus über einen TLR-abhängigen Weg

Aus der Literatur ist bekannt, dass LPS in verschiedenen Zellen zu einer vermehrten Transkription von HIF-1 α führt. Um dies auch für DCs darzustellen, inkubierten wir 5×10^5 DCs aus dem Knochenmark einer Wildtyp- und TLR2^{-/-}x4^{-/-}-Maus zunächst über 24 h mit *Salmonella minnesota* LPS 100 ng/ml. Als etablierte Positivkontrolle wurde Deferoxaminmesilat (DFO) verwendet (Abb. 10). DFO, ein Chelatbildner, welcher den eisenabhängigen Prolylhydroxylasen (PDH) Eisen vorenthält, simuliert die stark reduzierte Funktion der PDHs unter hypoxischen Bedingungen.

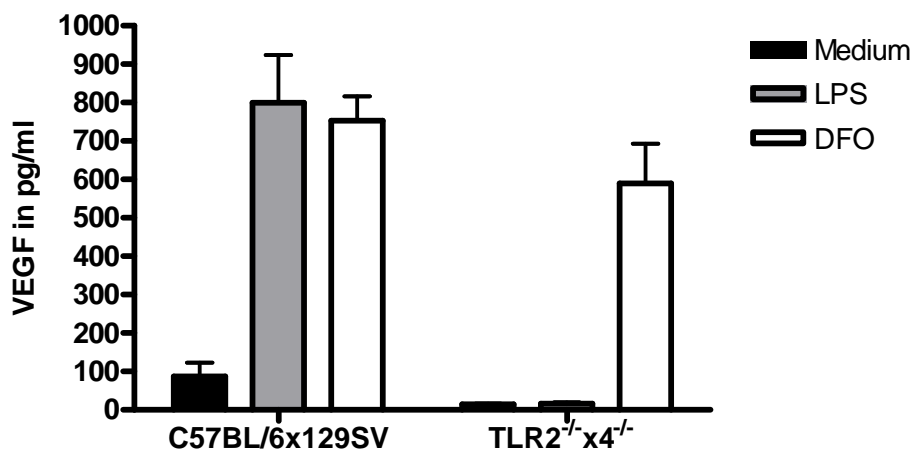


Abb. 10: VEGF Sekretion nach Inkubation mit LPS

Dendritische Zellen aus dem Knochenmark der C57BL/6x129SV- und TLR2^{-/-}x4^{-/-}-Maus wurden mit LPS (100 ng/ml), DFO (200 μ M) oder Medium inkubiert. 1 h nach Infektion wurden die extrazellulären Bakterien durch Zugabe von Gentamicin (100 μ g/ml) abgetötet. Die sekretierte Menge an VEGF im Überstand wurde mittels ELISA 24h nach Infektion bestimmt. C57BL/6x129SV: Wildtyp Maus; TLR2^{-/-}x4^{-/-}: Toll-like Rezeptoren 2 und 4 Knockout Maus

Nach Inkubation von Wildtyp DCs mit LPS oder DFO zeigte sich ein deutlicher Anstieg der VEGF-Konzentrationen. In den TLR2^{-/-}x4^{-/-}-DCs führt dagegen die

Anwesenheit von DFO, nicht jedoch von LPS zu einer signifikant erhöhten VEGF-Sekretion. In den Proben mit LPS überstiegen die VEGF-Werte nicht die der Mediumkontrolle (Negativkontrolle). TLR2^{-/-}x4^{-/-} DCs sind also grundsätzlich in der Lage, VEGF zu sezernieren. Dies geschieht jedoch im Fall von DFO über einen TLR-unabhängigen Mechanismus. Wir folgern daraus, dass die LPS-vermittelte VEGF-Induktion TLR-abhängig ist.

3.1.2. *Y. enterocolitica* induziert die HIF-1 α Aktivierung und die nachfolgende VEGF-Sekretion in DCs der Maus über einen TLR-unabhängigen Weg

Um zu überprüfen, welchen Einfluss lebende Bakterien auf DCs und deren VEGF-Sekretion haben, wurden als nächstes Wildtyp- und TLR2/4-defiziente DCs, mit verschiedenen *Y. enterocolitica*-Stämmen, welchen das Plasmid bzw. Invasin fehlte, inkubiert (Abb. 11).

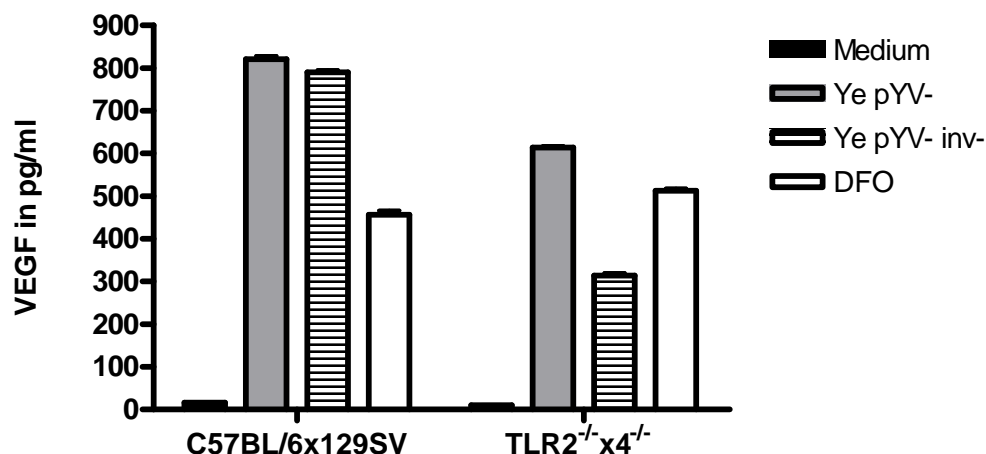


Abb. 11: VEGF Sekretion nach Inkubation mit *Y. enterocolitica* pYV- und pYV- inv- Dendritische Zellen aus dem Knochenmark der C57BL/6x129SV- und TLR2^{-/-}x4^{-/-} - Maus wurden mit Ye pYV- und Ye pYV- inv- (MOI 10) bzw. DFO (200 μ M) inkubiert. 1 h nach Infektion wurden die extrazellulären Bakterien durch Zugabe von Gentamicin (100 μ g/ml) abgetötet. Die sekretierte Menge an VEGF im Überstand wurde mittels ELISA 24h nach Infektion bestimmt. C57BL/6x129SV: Wildtyp Maus; TLR2^{-/-}x4^{-/-}: Toll-like Rezeptoren 2 und 4 Knockout Maus, pYV: *Yersinia* Virulenzplasmid, inv: Invasin, MOI: Multiplicity of infection

Es zeigten sich sowohl in den Überständen der TLR2^{-/-}x4^{-/-} als auch den Wildtyp-DCs, dass die Anwesenheit bakterieller Zellbestandteile die Sekretion von VEGF deutlich steigert. Das Proteinlevel von VEGF ist bei den TLR2^{-/-}x4^{-/-} -

DCs im Vergleich zu den Wildtyp-DCs niedriger und bei dem Invasin-defizienten Stamm zeigt sich eine Reduktion bis zu 45%. Die vorliegenden Daten lassen daher den Schluss zu, dass die Induktion von VEGF durch *Y. enterocolitica* neben LPS über die TLR2 und TLR4 auch über einen TLR-unabhängigen Mechanismus vermittelt wird.

Die Expression von VEGF während der Angiogenese wird hauptsächlich über HIF-1 α reguliert. Um zu überprüfen, ob LPS und *Y. enterocolitica* HIF-1 α induzieren, wurden 1×10^7 Wildtyp- und TLR2^{-/-}x4^{-/-}-DCs mit den Bakterien infiziert, die nukleären Proteine 8h nach der Infektion extrahiert und HIF-1 α im Westernblot dargestellt (Abb. 12).

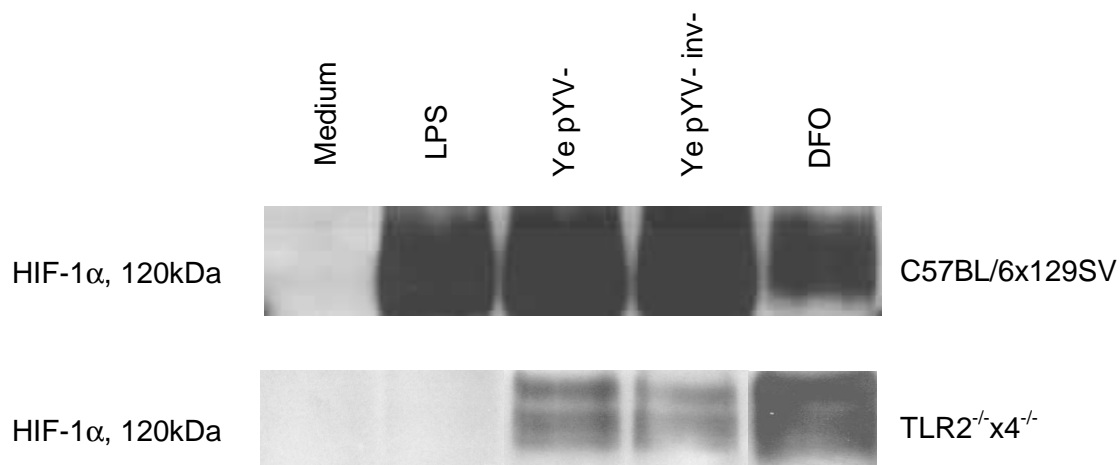


Abb. 12: Detektion von HIF-1 α nach Inkubation mit LPS und *Y. enterocolitica* pYV- sowie pYV- inv-

Dendritische Zellen aus dem Knochenmark der Wildtyp- und TLR2^{-/-}x4^{-/-}-Maus wurden mit LPS (1 μ g/ml), Ye pYV- und Ye pYV-inv- (MOI 10) und DFO (200 μ M) inkubiert. 1 h nach Infektion der DCs wurden extrazelluläre Bakterien durch Zugabe von Gentamicin (100 μ g/ml) abgetötet und weiter inkubiert. Die Proteinextraktion erfolgte 8h nach Beginn der Infektion. Auftrennung durch SDS-PAGE und Darstellung der HIF-1 α -Bande bei ca. 120 kDa.

C57BL/6x129SV: Wildtyp Maus; TLR2^{-/-}x4^{-/-}: Toll-like Rezeptoren 2 und 4 Knockout Maus, pYV: *Yersinia* Virulenzplasmid, inv: Invasin, MOI: Multiplicity of infection

In den Wildtyp-DCs konnte nach Zugabe von LPS, Yersinien und DFO eine HIF-1 α -Bande nachgewiesen werden. Bei den TLR2^{-/-}x4^{-/-}-DCs fehlt die Bande bei LPS. LPS fördert die HIF-1 α -Akkumulation in Wildtyp-DCs, nicht in TLR2^{-/-}x4^{-/-}-DCs. Wir schließen daraus, dass LPS und Yersinien die VEGF-Genexpression über die transkriptionale Aktivierung von HIF-1 α induzieren.

3.2. *Y. enterocolitica* induziert VEGF in MyD88^{-/-}-DCs MyD88-unabhängig/Trif-abhängig und in Trif^{-/-}-DCs Trif-unabhängig / MyD88-abhängig

Immer mehr Studien weisen auf, dass verschiedene TLR-Agonisten, wie z.B. LPS, ein Signal in Abwesenheit von MyD88 oder Trif hervorrufen können. Während die VEGF-Sekretion in infizierten Wildtyp-DCs unabhängig von den TLR2 und TLR4 läuft, wollten wir wissen, ob andere TLRs an der Interaktion zwischen *Y. enterocolitica* und DC involviert sind. Deshalb untersuchten wir, ob in DCs, in denen die Adapterproteine MyD88 bzw. Trif fehlen, die Sekretion von VEGF ausgelöst wird. Es wurden 5×10^5 MyD88^{-/-}- und Trif^{-/-}-Zellen für die Infektion mit *Y. enterocolitica* und LPS ausgesät. 24 h nach der Infektion wurde der Zellkulturüberstand abgenommen und mittels ELISA auf die Konzentration von VEGF untersucht (Abb. 13).

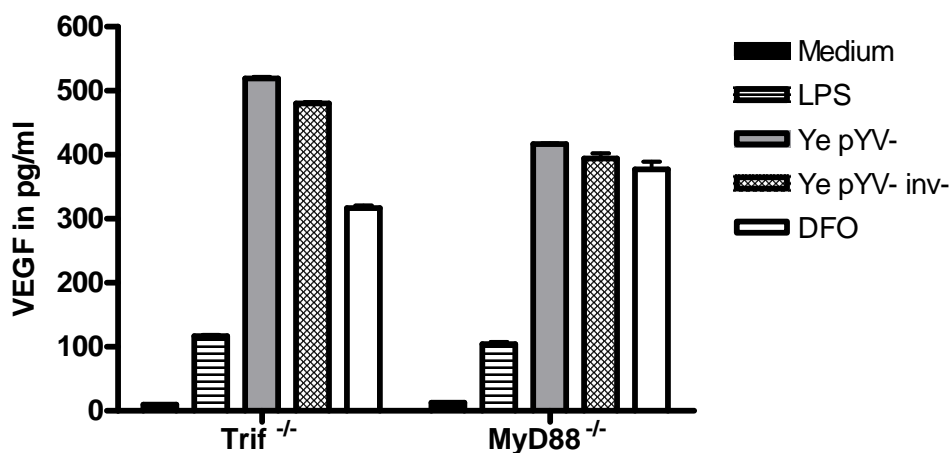


Abb. 13: VEGF Sekretion nach Inkubation mit *Y. enterocolitica* pYV- und pYV- inv- Dendritische Zellen aus dem Knochenmark der Trif^{-/-} und MyD88^{-/-} - Maus wurden mit LPS (100 ng/ml), Ye pYV- und Ye pYV- inv- (MOI 10) bzw. DFO (200 μ M) inkubiert. 1 h nach Infektion wurden die extrazellulären Bakterien durch Zugabe von Gentamicin (100 μ g/ml) abgetötet. Die sekretierte Menge an VEGF im Überstand wurde mittels ELISA 24 h nach Infektion bestimmt. Trif^{-/-} und MyD88^{-/-}: Knockout der entsprechenden Adaptermoleküle, pYV: *Yersinia* Virulenzplasmid, inv: Invasin, MOI: Multiplicity of infection

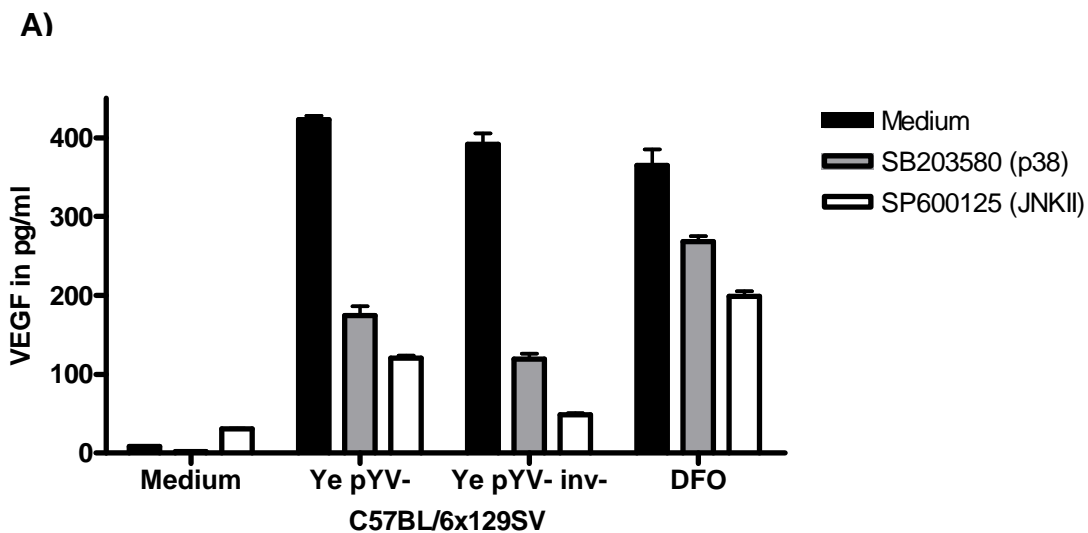
Wie schon in den TLR2^{-/-}x4^{-/-} -DCs sind in den beiden Zelltypen deutlich signifikante Anstiege der VEGF-Sekretion zu sehen, besonders nach Infektion mit *Y. enterocolitica*. Ein Indiz dafür, dass andere TLRs in diesem Fall keine

Rolle spielen, ist die Tatsache, dass die Abwesenheit der für das TLR-Signaling wichtigen Adaptermoleküle Trif und MyD88 keine Änderung der VEGF-Sekretion hervorrufen.

3.3. Die intrazelluläre Signaltransduktion bakteriell infizierter DCs verläuft über ausgewählte Kinasen und GTPasen

3.3.1. VEGF-Sekretion in *Y. enterocolitica* infizierten DCs ist abhängig von MAPK

Es ist bekannt, dass verschiedene Mitglieder der Familie der MAPK in das HIF-1 α /VEGF-Signaling involviert sind. Es lag daher nahe, die Rolle der MAPK auch im Infektionsmodell an DCs zu untersuchen. 5×10^5 Wildtyp- oder TLR2 $^{-/-}$ x4 $^{-/-}$ DCs wurden, nach einer Vorinkubation mit entsprechenden MAPK-Inhibitoren für 30min, in einem Kulturmedium, mit *Y. enterocolitica* pYV- bzw. pYV- inv- oder DFO inkubiert. Wir nutzen spezifische Inhibitoren gegen p38 und JNK II (Abb. 14)



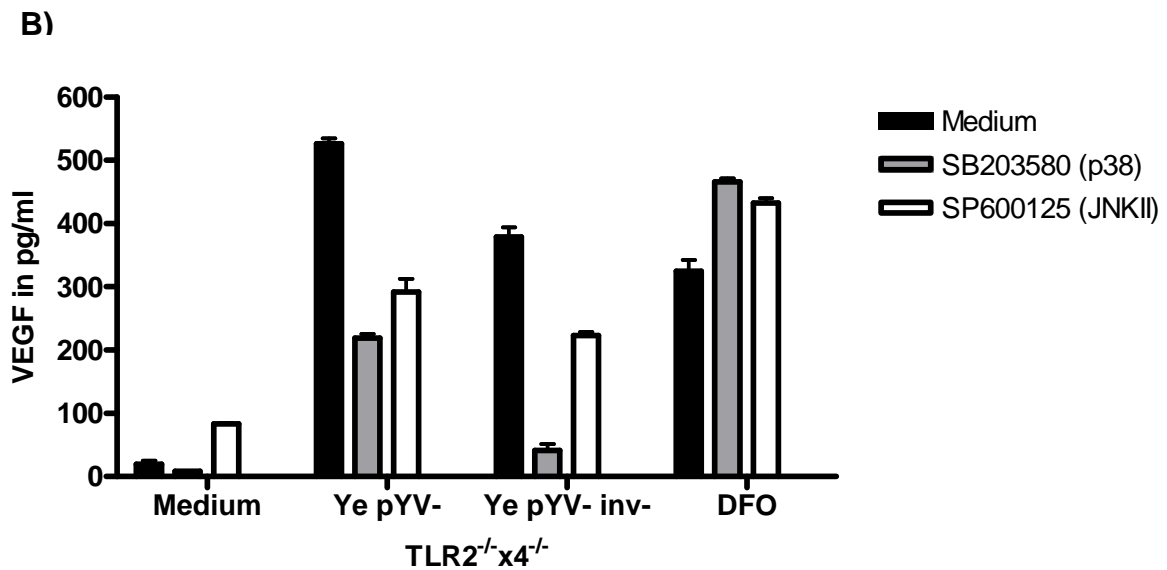


Abb. 14: VEGF Sekretion nach Inkubation mit *Y. enterocolitica* pYV- und pYV- inv- unter Zugabe von MAPK-Inhibitoren

Dendritische Zellen aus dem Knochenmark der 14A) Wildtyp- und 14B) $TLR2^{-/-}x4^{-/-}$ - Maus wurden mit Ye pYV- und Ye pYV- inv- (MOI 10) bzw. DFO (200 μ M) inkubiert. 30 min vor Infektion der Zellen wurde mit SB203580 (2 μ M) und SP600125 (20 μ M) vorinkubiert. 1 h nach Infektion wurden die extrazellulären Bakterien durch Zugabe von Gentamicin (100 μ g/ml) abgetötet. Die sekretierte Menge an VEGF im Überstand wurde mittels ELISA 24 h nach Infektion bestimmt.

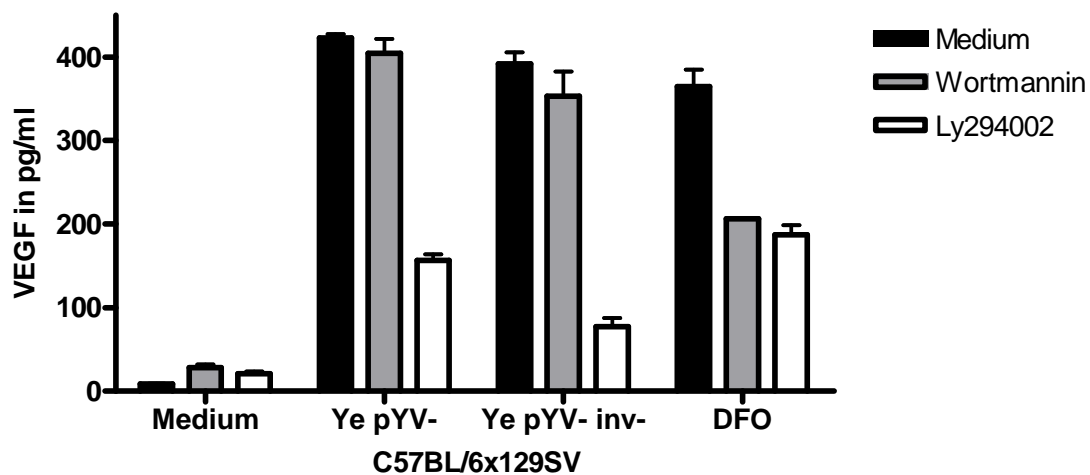
C57BL/6x129SV: Wildtyp Maus; $TLR2^{-/-}x4^{-/-}$: Toll-like Rezeptoren 2 und 4 Knockout Maus, pYV: *Yersinia* Virulenzplasmid, inv: Invasin, MOI: Multiplicity of infection, MAPK: Mitogen-activated protein kinases

Bei der Wildtyp-DCs zeigen sich signifikante Reduktionen der VEGF-Konzentration über 50% bei den infizierten Zellen, wenn diese mit einem MAPK-Inhibitor vorbehandelt wurden. Der Einfluss des JNK II-Inhibitors führt sogar zu einer Reduktion von VEGF bis zu 70%. Bei den $TLR2^{-/-}x4^{-/-}$ -DCs sind ebenfalls deutlich signifikante Unterschiede zwischen Mediumkontrolle und den mit MAPK-Inhibitoren vorbehandelten DCs anhand der reduzierten VEGF-Konzentration zu sehen. Die VEGF-Induktion in der mit Inhibitoren versehenen DFO-Kontrolle in den Wildtyp-DCs scheint MAPKinasen-abhängig zu verlaufen. Die VEGF-Konzentration der mit Inhibitoren vorbehandelten Positivkontrolle der $TLR2^{-/-}x4^{-/-}$ -DCs sind gegenüber dem Mediumwert erhöht. Dies zeigte sich nur in diesem und nicht in den anderen beiden unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen. Es lässt sich hieraus ableiten, dass die Infektion von DCs mit *Y. enterocolitica* zu einer MAPKinasen-vermittelten Induktion von HIF-1 α und VEGF führt.

3.3.2. VEGF Sekretion in *Y. enterocolitica* infizierten DCs ist abhängig von PI3K

PI3K stellen Vermittler zwischen der Zelle und bestimmten Faktoren wie Wachstumsfaktoren, Hormone oder Integrinen zur Zellstimulation dar. Um die Rolle von PI3K-induzierter VEGF-Sekretion zu analysieren, wurden Wildtyp- und TLR2^{-/-}x4^{-/-}-DCs, nach einer Vorinkubation mit den PI3K-Inhibitoren Wortmannin und Ly294002 für 30 min, in einem Kulturmedium mit *Y. enterocolitica* pYV- bzw. pYV- inv- oder DFO inkubiert (Abb. 15).

A)



B)

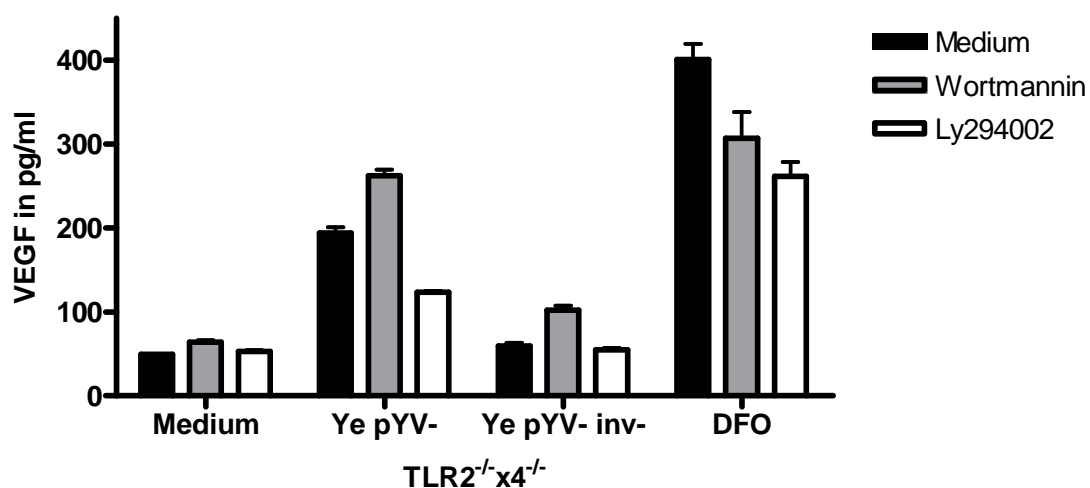


Abb. 15: VEGF Sekretion nach Inkubation mit *Y. enterocolitica* pYV- und pYV- inv- unter Zugabe von PI3K-Inhibitoren

Dendritische Zellen aus dem Knochenmark der 15A) Wildtyp- und 15B) TLR2^{-/-}x4^{-/-} - Maus wurden mit Ye pYV- und Ye pYV- inv- (MOI 10) bzw. DFO (200 µM) inkubiert. 30 min vor Infektion der Zellen wurde mit Wortmannin (200 nM) und Ly294002 (20 µM) vorinkubiert. 1 h nach Infektion wurden die extrazellulären Bakterien durch Zugabe von Gentamicin (100 µg/ml) abgetötet. Die sekretierte Menge an VEGF im Überstand wurde mittels ELISA 24 h nach Infektion bestimmt.

C57BL/6x129SV: Wildtyp Maus; TLR2^{-/-}x4^{-/-}: Toll-like Rezeptoren 2 und 4 Knockout Maus, pYV: *Yersinia* Virulenzplasmid, inv: Invasin, MOI: Multiplicity of infection, PI3K: phosphatidylinositol-3 kinase

Bei Vorinkubation der entsprechenden Ansätze mit dem unspezifischen Inhibitor Wortmannin waren in den Versuchen lediglich Tendenzen zu einer verminderten VEGF-Sekretion im Vergleich zur Mediumkontrolle zu sehen, bei den TLR2^{-/-}x4^{-/-} -DCs nach Infektion mit *Y. enterocolitica* sogar eine geringe Erhöhung. Nur die Verwendung des spezifischen PI3K-Inhibitors wie Ly294002 führt zu einer signifikanten Reduktion der Konzentrationen von VEGF bei den infizierten DCs. Die durch DFO induzierte VEGF-Sekretion scheint PI3K-abhängig zu verlaufen. Es lässt sich hieraus ableiten, dass die Infektion von DCs mit *Y. enterocolitica* zu einer PI3K-vermittelten Induktion von HIF-1α und VEGF führt.

3.3.3. VEGF Sekretion in *Y. enterocolitica* infizierten DCs ist abhängig von Rho GTPasen

Rho GTPasen wie Rho, Rac oder Cdc42 sind wichtige intrazelluläre Mediatoren, welche Signale von Tyrosinkinase-assoziierten Rezeptoren empfangen und weiterleiten. Um die Beteiligung der Kinasen am VEGF-Signaling zu analysieren, wurden Wildtyp- und TLR2^{-/-}x4^{-/-} -DCs, nach einer Vorinkubation mit einem entsprechenden GTPasen-Inhibitor, dem *Clostridium difficile* Toxin B (TcdB-10463), für 30 min, in einem Kulturmedium mit Ye pYV- bzw. pYV- inv- oder DFO inkubiert (Abb. 16). Toxin B ist ein Inhibitor des Rho-GTPasen Signalweges, welcher die GTPasen RhoA, Rac1 und CDC42 inhibiert.

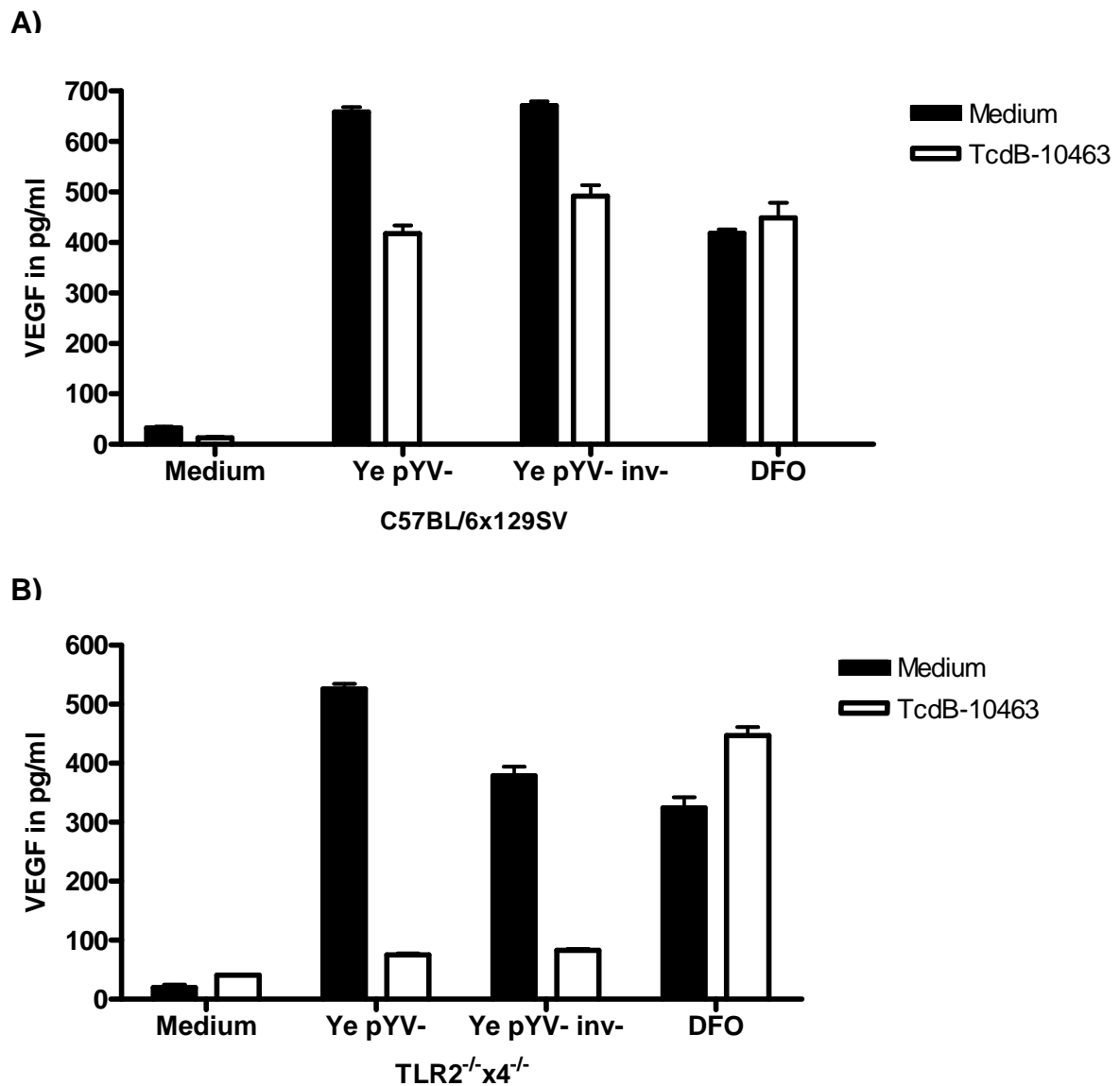


Abb. 16: VEGF Sekretion nach Inkubation mit *Y. enterocolitica* pYV- und pYV- inv- unter Zugabe eines Rho GTPasen-Inhibitors

Dendritische Zellen aus dem Knochenmark der 16A) Wildtyp- und 16B) TLR2^{-/-}x4^{-/-} - Maus wurden mit Ye pYV- (MOI 10), Ye pYV- inv- (MOI 10) bzw. DFO (200 µM) inkubiert. 30 min vor Infektion der Zellen wurde mit TcdB-10463 (20 ng/ml) vorinkubiert. 1 h nach Infektion wurden die extrazellulären Bakterien durch Zugabe von Gentamicin (100 µg/ml) abgetötet. Die sekretierte Menge an VEGF im Überstand wurde mittels ELISA 24 h nach Infektion bestimmt. C57BL/6x129SV: Wildtyp Maus; TLR2^{-/-}x4^{-/-}: Toll-like Rezeptoren 2 und 4 Knockout Maus, pYV: *Yersinia* Virulenzplasmid, inv: Invasin, MOI: Multiplicity of infection

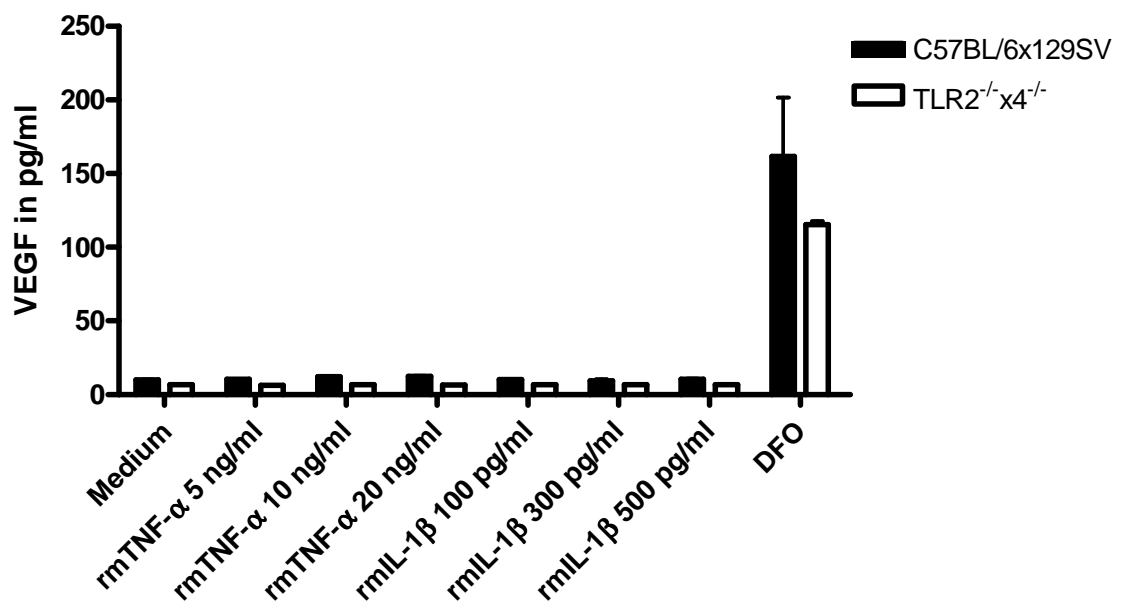
Deutlich zu erkennen sind die signifikanten Unterschiede der VEGF-Konzentrationen zwischen Mediumkontrolle und der mit Toxin B vorinkubierten infizierten Zellen. Bei den TLR2^{-/-}x4^{-/-} -DCs zeigt sich sogar eine Reduktion von VEGF um das 4-5fache. Die durch DFO induzierte VEGF-Sekretion in den DCs scheint nicht Rho GTPasen-abhängig zu verlaufen. Es lässt sich aus unseren

Versuchen ableiten, dass die Infektion von DCs mit *Y. enterocolitica* zu einer Rho GTPasen-vermittelten Induktion von HIF-1 α und VEGF führt.

3.4. Die Induktion von VEGF wird nicht durch Zytokine wie TNF- α oder IL-1 β vermittelt

Einige Studien zeigen, dass Zytokine wie IL-1 β und TNF- α in der Lage sind, in verschiedensten Zellen HIF-1 α zu induzieren und die Sekretion von VEGF zu stimulieren. Es soll daher in einem Experiment geprüft werden, ob in Wildtyp- und TLR2 $^{-/-}$ x4 $^{-/-}$ -DCs lösliche Faktoren wie Zytokine für die Stimulation von HIF-1 α und VEGF auslösen können. 5×10^5 DCs der Wildtyp- bzw. TLR2 $^{-/-}$ x4 $^{-/-}$ -Maus wurden unter Zugabe verschiedener Konzentrationen rekombinanter Zytokine über 24 h inkubiert. Die VEGF-Konzentration wurde mittels ELISA im Überstand bestimmt (Abb. 17).

A)



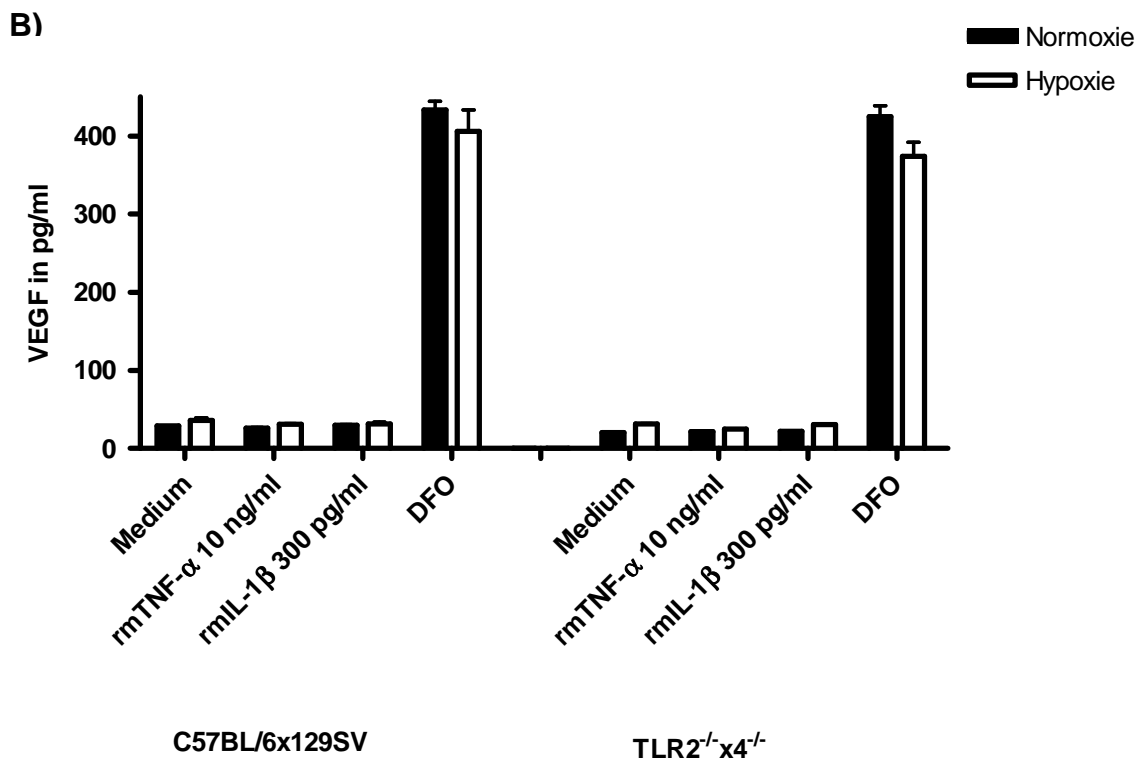


Abb. 17: VEGF Sekretion nach Inkubation von rmTNF- α sowie rmIL-1 β

A) Dendritische Zellen aus dem Knochenmark der C57BL/6x129SV- und TLR2^{-/-}x4^{-/-}-Maus wurden mit rm TNF- α (5, 10, 20 ng/ml), rm IL-1 β (100, 300, 500 pg/ml) bzw. DFO (200 μ M) unter normoxischen Bedingungen inkubiert. Die sekretierte Menge an VEGF im Überstand wurde mittels ELISA 24 h nach Infektion bestimmt. B) Dendritische Zellen aus dem Knochenmark der C57BL/6x129SV- und TLR2^{-/-}x4^{-/-}-Maus wurden mit rm TNF- α (10 ng/ml), rm IL-1 β (300 pg/ml) bzw. DFO (200 μ M) unter normoxischen oder hypoxischen Bedingungen inkubiert. Die sekretierte Menge an VEGF im Überstand wurde mittels ELISA 24 h nach Infektion bestimmt.

C57BL/6x129SV: Wildtyp Maus; TLR2^{-/-}x4^{-/-}: Toll-like Rezeptoren 2 und 4 Knockout Maus, rm: rekombinant mouse, TNF: Tumornekrosefaktor, IL: Interleukin

Die Abbildung 17A zeigt, dass keine nennenswerten VEGF-Anstiege nach Inkubation der DCs mit verschiedenen Konzentrationen an rekombinanten Zytokinen zu sehen sind. Nun analysierten wir in einem weiteren Versuch, ob Zytokine in Kombination mit Hypoxie einen Einfluss auf die VEGF-Sekretion haben. Jedoch sind auch unter hypoxischen Bedingungen die Konzentrationen an VEGF auf dem Level der Mediumkontrolle (Abb. 17B).

Als Fazit lässt sich erkennen, dass die Zytokine IL-1 β und TNF- α weder unter Normoxie noch Hypoxie in der Lage sind, die Sekretion von VEGF in DCs der Maus zu induzieren.

3.5. Trotz Hemmung der Phagozytose ist die VEGF-Sekretion induzierbar

Nun stellten wir die Hypothese auf, dass Yersinien der oberflächliche Kontakt mit DCs ausreicht, um VEGF zu induzieren, ohne dass eine Phagozytose stattfinden muss. Diesen Sachverhalt demonstrierten wir mit Hilfe des Invasionsassays und der Bestimmung von VEGF. 5×10^5 TLR2 und 4-defiziente DCs wurden ausgesät, 30 min mit Inhibitoren der Phagozytose vorinkubiert, mit *Y. enterocolitica* infiziert und die Zellen im Anschluss gewaschen, lysiert und in einer Verdünnungsreihe auf MH-Platten ausplattiert. Nach 2 Tagen Bebrütung bei 27 °C wurde die colony forming unit (CFU) anhand der gewachsenen Kolonien bestimmt. In einem Extraansatz, Aussaat siehe 2.2.2.4., wurde aus den Überständen VEGF mittels ELISA ermittelt (Abb. 18, 19).

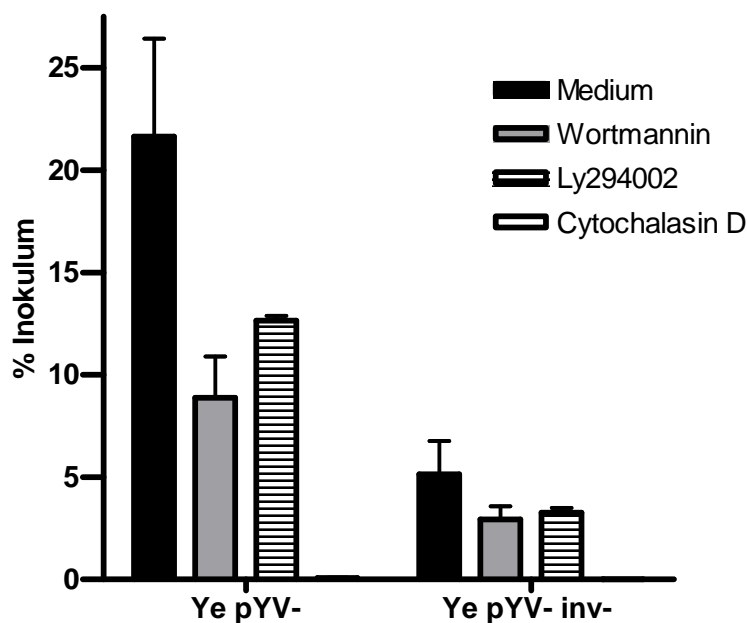


Abb. 18: Prozentualer Anteil der inokulierten Bakterien nach Inkubation mit *Y. enterocolitica* pYV- und pYV- inv- unter Zugabe von Phagozytose-Inhibitoren

Dendritische Zellen aus dem Knochenmark der TLR2^{-/-}x4^{-/-} - Maus wurden mit Ye pYV- und Ye pYV- inv- (MOI 50) inkubiert. 30 min vor Infektion der Zellen wurde mit Wortmannin (100 nM), Ly294002 (50 µM) und Cytochalasin D (1 µg/ml) vorinkubiert. 1 h nach Infektion wurden die extrazellulären Bakterien durch Zugabe von Gentamicin (100 µg/ml) abgetötet. 4 h nach Infektion wurde die DCs gewaschen, lysiert und die Proben ausplattiert. 2 d nach Bebrütung Bestimmung der CFU.

TLR2^{-/-}x4^{-/-}: Toll-like Rezeptoren 2 und 4 Knockout Maus, pYV: *Yersinia* Virulenzplasmid, inv: Invasin, MOI: Multiplicity of infection, CFU: colony forming unit

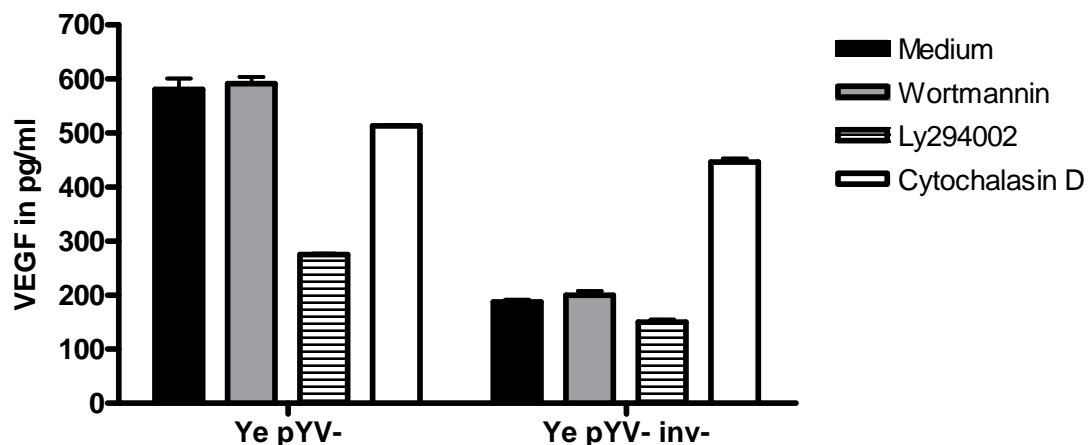


Abb. 19: VEGF Sekretion nach Inkubation mit *Y. enterocolitica* pYV- und pYV- inv- unter Zugabe von Phagozytose-Inhibitoren

Dendritische Zellen aus dem Knochenmark der $TLR2^{-/-}x4^{-/-}$ - Maus wurden mit Ye pYV- und Ye pYV- inv- (MOI 10) inkubiert. 30 min vor Infektion der Zellen wurde mit Wortmannin (100 nM), Ly294002 (50 μ M) und Cytochalasin D (1 μ g/ml) vorinkubiert. 1 h nach Infektion wurden die extrazellulären Bakterien durch Zugabe von Gentamicin (100 μ g/ml) abgetötet. Die sekretierte Menge an VEGF im Überstand wurde mittels ELISA 24 h nach Infektion bestimmt.

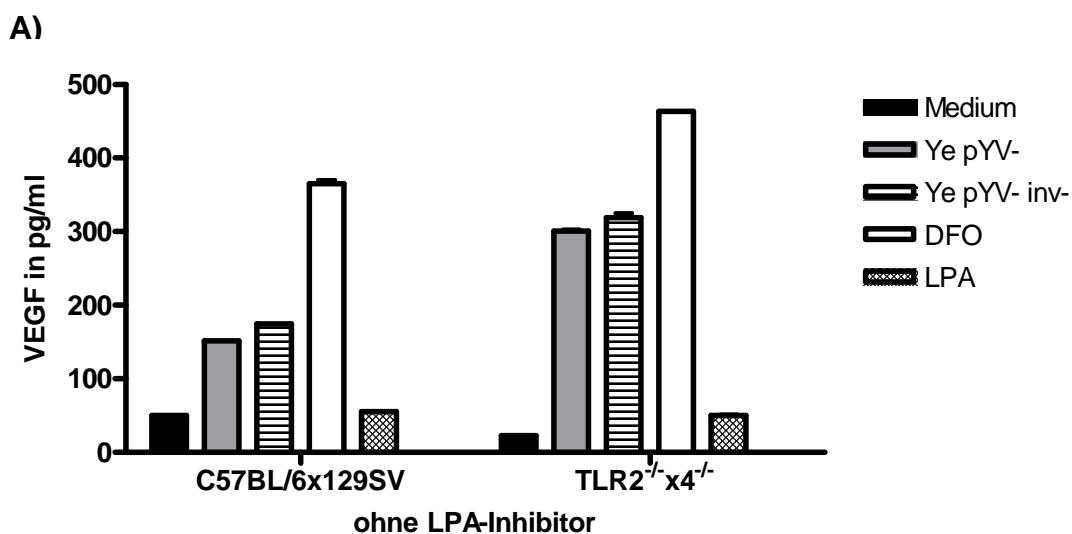
$TLR2^{-/-}x4^{-/-}$: Toll-like Rezeptoren 2 und 4 Knockout Maus, pYV: *Yersinia* Virulenzplasmid, inv: Invasin, MOI: Multiplicity of infection

Wie aus Abb. 18 ersichtlich, hemmt das Aktin-Mikrofilament depolymerisierende Cytochalasin D die Invasion von *Y. enterocolitica* in $TLR2^{-/-}x4^{-/-}$ -DCs fast vollständig. Die mit Ye pYV- infizierten DCs weisen im Medium eine 22%ige und nach Behandlung mit Wortmannin eine 8%ige, mit Ly294002 eine 13%ige und mit Cytochalasin D sogar eine <1%ige Phagozytoserate auf. Die mit Ye pYV-inv- infizierten $TLR2^{-/-}x4^{-/-}$ -DCs weisen im Medium eine noch niedrigere Rate von 5 % und nach Behandlung mit Wortmannin von 3 %, mit Ly294002 von 3 % und mit Cytochalasin D von <1 % auf. Aus den VEGF-Konzentrationen kann man schließen, dass trotz Hemmung der Phagozytose die VEGF-Sekretion nicht äquivalent dazu sinkt. Bei Verwendung von Wortmannin ist gar kein Effekt (was wir aus den Versuchen von 3.2. schon kennen) und bei Cytochalasin D ist sogar eine erhöhte VEGF-Konzentrationen in den mit Ye pYV- inv- behandelten Zellen zu erkennen. Die mit Ly294002 vorbehandelten und mit Ye pYV- inv- infizierten Zellen zeigen im Vergleich zur Mediumkontrolle keine signifikante Reduktion. Als Ergebnis lässt sich zusammenfassen, dass ein oberflächlicher Kontakt der Yersinien mit DCs ausreicht, um die Sekretion von

VEGF aktivieren zu können. Eine Phagozytose ist zur Induktion nicht notwendig.

3.6. Yersinien können ohne direkten Kontakt mit DCs VEGF induzieren

Des weiteren stellte sich uns die Frage: Wenn Zytokine keine Rolle in der Induktion von VEGF spielen und Phagozytose nicht notwendig ist, um die VEGF-Sekretion zu aktivieren, gibt es dann andere gebildete lösliche Faktoren, wie z.B. Lysophosphatidylsäure (LPA), welche eine VEGF-Sekretion auslösen, ohne dass ein direkter Kontakt zwischen DCs und Yersinien besteht? LPA spielt eine wichtige Rolle in der Vermittlung der Zellproliferation, Tumordinvasion und Angiogenese. Es soll daher in einem Transwell® Assay untersucht werden, ob 5×10^5 Wildtyp- und TLR2^{-/-}x4^{-/-}-DCs, welche keinen direkten Kontakt zu *Y. enterocolitica* haben, VEGF sezernieren, welches 24 h nach Infektion im Überstand mittels ELISA bestimmt wird. Als Reinheitskontrolle wurden jeweils 100 µl des verwendeten Überstandes auf MH-Platten ausplattiert, 2 Tage bei 27 °C bebrütet und auf Bakterienwachstum kontrolliert. Um einen eventuellen LPA-Effekt zu beweisen, wurde neben dem ersten Ansatz ohne LPA-Antagonist ein weiterer Versuch mit Zugabe des LPA-Antagonisten Ki16425 durchgeführt (Abb. 20).



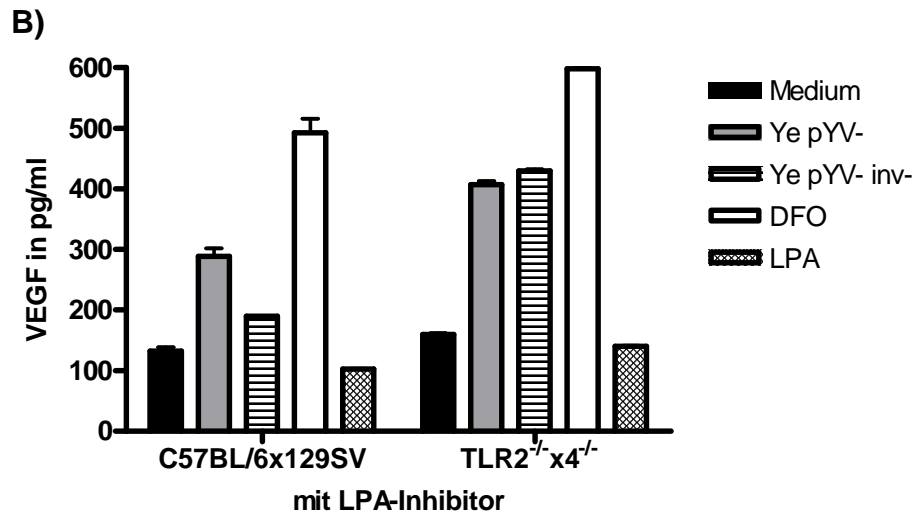


Abb. 20: VEGF Sekretion nach Inkubation mit *Y. enterocolitica* pYV- und pYV- inv- unter Zugabe von LPA-Antagonist im Transwell® Assay

Dendritische Zellen aus dem Knochenmark der C57BL/6x129SV- und TLR2^{-/-}x4^{-/-} - Maus wurden mit Ye pYV- , Ye pYV- inv- (MOI 10) bzw. DFO (200 µM) inkubiert. Im zweiten Ansatz (siehe Abb. 20B) wurde LPA-Antagonist (KI 16425, 5µM) zugegeben. Die sekretierte Menge an VEGF im Überstand wurde mittels ELISA 24 h nach Infektion bestimmt.

C57BL/6x129SV: Wildtyp Maus; TLR2^{-/-}x4^{-/-}: Toll-like Rezeptoren 2 und 4 Knockout Maus, pYV: *Yersinia* Virulenzplasmid, inv: Invasin, MOI: Multiplicity of infection, LPA: Lysophosphatidylsäure

In den Abbildungen 20A/B kann man erkennen, dass die Yersinien in beiden DC-Typen zu einem signifikanten Anstieg der VEGF-Konzentration führen. Die Proteinkonzentrationen von VEGF in den mit LPA behandelten Zellen liegt im Niveau der jeweiligen Mediumkontrolle. Der Vergleich der Proben mit und ohne LPA-Antagonist zeigt keine wesentlichen Unterschiede.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass Yersinien auch ohne direkten Kontakt mit DCs VEGF induzieren können, ein LPA-Effekt ist aber auszuschließen.

3.7. Synergistische Stimulation der DCs mit LPS und NOD-Agonisten führt zur VEGF-Sekretion

Das angeborene Immunsystem beruht auf der schnellen Erkennung und Eliminierung eindringender bzw. phagozytierter Pathogene. TLRs stellen eine Klasse der Membranrezeptoren dar, welche extrazelluläre Keime aufspüren und verschiedene Signalkaskaden triggern, um eine Immunantwort auszulösen. In letzter Zeit wurden intrazelluläre Rezeptoren, die sogenannten NODs entdeckt, welche ebenfalls Strukturen der bakteriellen Zellwand erkennen und in das Immunsystem involviert sind. Aus der Literatur ist bekannt, dass humane DCs und Monozyten durch Stimulation mit NOD-Agonisten mit einer Zytokinsekretion reagieren. Es sollte daher analysiert werden, ob die NOD-Rezeptoren der Maus-DCs in die VEGF-Sekretion involviert sind. 5×10^5 DCs einer $TLR2^{-/-}x4^{-/-}$ - Maus wurden mit NOD-Agonisten unterschiedlicher Konzentration inkubiert und VEGF im ELISA bestimmt.

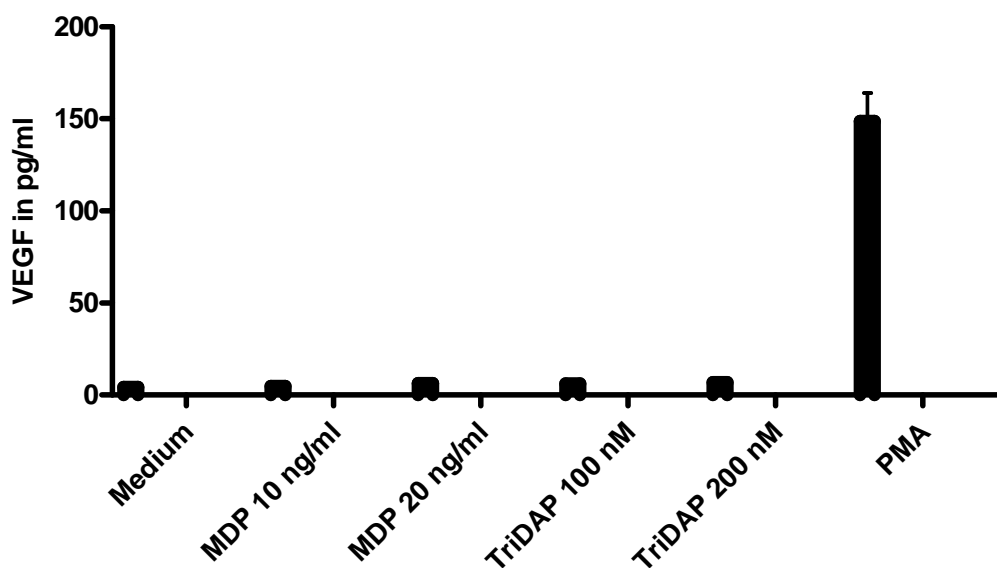


Abb. 21: VEGF Sekretion nach Inkubation mit dem NOD1-Agonisten (TriDAP) und dem NOD2-Agonisten (MDP)

Dendritische Zellen aus dem Knochenmark der $TLR2^{-/-}x4^{-/-}$ - Maus wurden mit MDP (10, 20 ng/ml), TriDAP (100, 200 nM) und PMA (100 ng/ml) inkubiert. Die sekretierte Menge an VEGF im Überstand wurde mittels ELISA 24h nach Infektion bestimmt.

$TLR2^{-/-}x4^{-/-}$: Toll-like Rezeptoren 2 und 4 Knockout Maus, NOD: nucleotide-binding oligomerization domain, MDP: Muramyl dipeptide, TriDAP: L-alanyl-y-D-glutamyl-meso-diaminopimelic acid, PMA: Phorbol-12-myristate-13-acetate

Als Positivkontrolle wurde PMA gewählt - ein unspezifischer Proteinkinase C-Aktivator, welcher VEGF induziert. Die NOD-Agonisten MDP und TriDAP führen in Maus-DCs nicht zu einer Steigerung der VEGF-Sekretion. Aus diesem Grund wurde durch die Bestimmung der mRNA-Expression zunächst überprüft, ob NOD-Rezeptoren überhaupt in DCs exprimiert werden. Es wurden 5×10^6 Wildtyp-DCs mit Ye pYV- und LPS für 10 h inkubiert und diese Zellen im Anschluss für die RNA-Isolation verwendet. Die erhaltene mRNA wurde quantifiziert, in cDNA umgeschrieben und das Produkt für die NOD-PCR eingesetzt (siehe 2.2.5.). Zur Kontrolle der PCR diente das housekeeping gene β -Aktin (siehe Abb. 22).

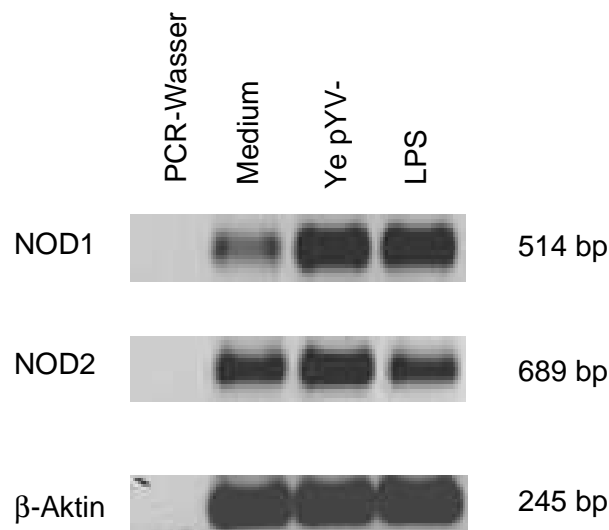


Abb. 22: NOD1/2-mRNA-Expression in DCs nach Inkubation mit *Y. enterocolitica* pYV- und LPS

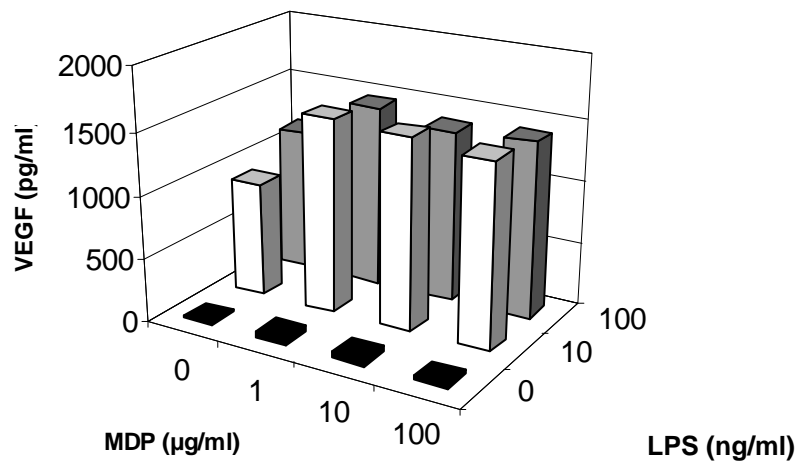
Dendritische Zellen aus dem Knochenmark C57BL/6x129SV - Maus wurden mit Ye pYV- (MOI 10) und LPS (100 ng/ml) inkubiert. 1h nach Infektion wurden die extrazellulären Bakterien durch Zugabe von Gentamicin (100 μ g/ml) abgetötet. 10 h nach Infektion wurde aus den DCs die mRNA isoliert, quantifiziert, in cDNA umgeschrieben und eine PCR angeschlossen. Das PCR-Produkt wurde über die Agarosegelelektrophorese aufgetrennt und mit Ethidiumbromid detektiert.

C57BL/6x129SV: Wildtyp-Maus, pYV: Yersinia Virulenzplasmid, LPS: Lipopolysaccharid, MOI: Multiplicity of infection, NOD: nucleotide-binding oligomerization domain

Wie in Abb. 22 anhand der Banden zu sehen ist, wird die mRNA der NOD-Proteine in unbehandelten und infizierten Wildtyp-DCs exprimiert, nach Inkubation mit Ye pYV- und LPS verstärkt (NOD1). Jetzt überprüfen wir, ob

LPS synergistisch mit NOD-Agonisten die VEGF-Sekretion in Wildtyp-DCs induziert (siehe Abb. 23).

A)



B)

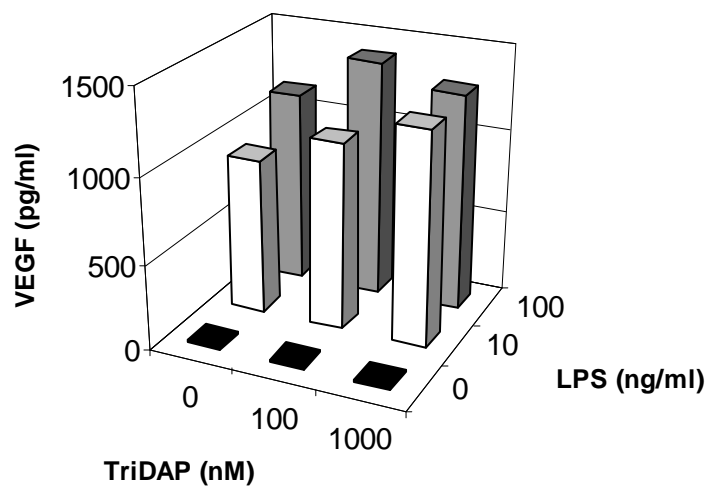


Abb. 23: VEGF Sekretion nach Inkubation mit LPS unter Zugabe eines NOD1-Agonisten (TriDAP) und eines NOD2-Agonisten (MDP)

Dendritische Zellen aus dem Knochenmark der C57BL/6x129SV - Maus wurden mit LPS (0, 10, 100 ng/ml), 23A) MDP (0, 1, 10, 100 ng/ml) und 23B) TriDAP (0, 100, 1000 nM) inkubiert. Die sekretierte Menge an VEGF im Überstand wurde mittels ELISA 24 h nach Infektion bestimmt.

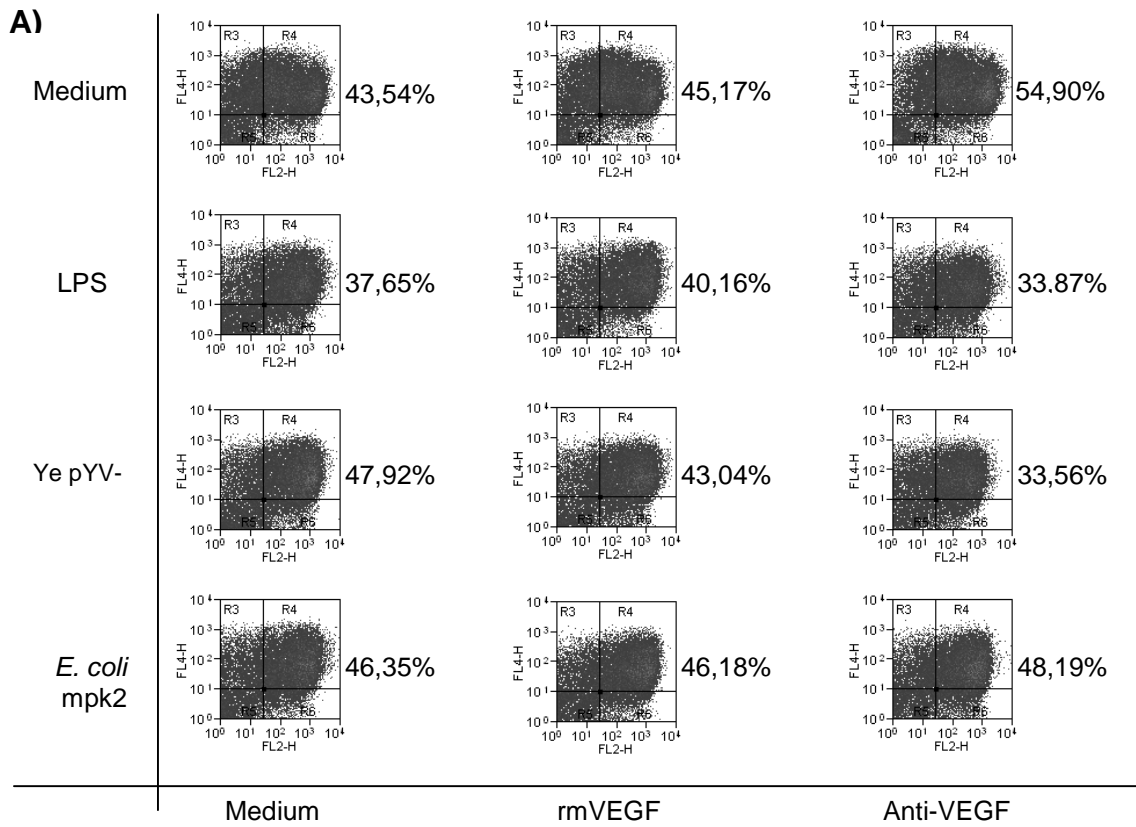
C57BL/6x129SV: Wildtyp-Maus, LPS: Lipopolysaccharid, NOD: nucleotide-binding oligomerization domain, MDP: Muramyl dipeptide, TriDAP: L-alanyl-γ-D-glutamyl-meso-diaminopimelic acid

In Abb. 23A/B ist zu sehen, dass MDP und TriDAP ohne Zugabe von LPS keine nennenswerte VEGF-Sekretion zu verzeichnen hat. Mit LPS-infizierte DCs zeigen eine VEGF-Produktion, was schon aus den Versuchen von 1.1 bekannt ist. MDP und TriDAP induzieren jedoch im Synergismus mit LPS signifikante Anstiege der VEGF-Proteinkonzentration.

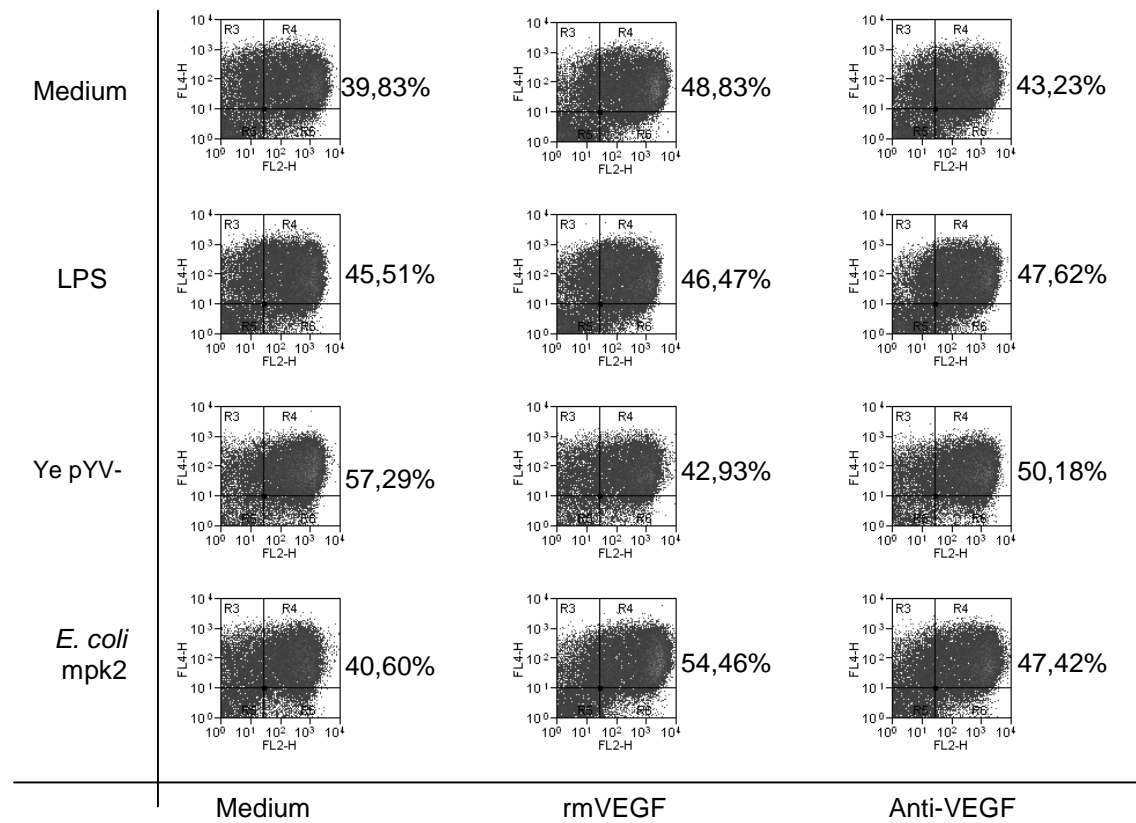
3.8. VEGF beeinflusst nicht die Expression costimulatorischer Moleküle auf den DCs

Aus der Tumorbilogie ist bekannt, dass VEGF die Reifung und Funktion von DCs hemmt. Um die Auswirkung von VEGF während der Infektion mit *Y. enterocolitica* auf die Antigenpräsentation zu überprüfen, wird im *in vitro* Infektionsmodell der Einfluss dieses Wachstumsfaktors auf die Oberflächenexpression costimulatorischer Moleküle wie MHCII, CD40 und CD86 untersucht und die Daten mittels Durchflusszytometrie erhoben. Des Weiteren wird die Wirkung von rmVEGF und blockierenden Anti-VEGF Antikörpern im Hinblick auf eine eventuell veränderte Expression von typischerweise bei der Maturation und Antigenpräsentation exprimierten Oberflächenmoleküle analysiert. Um unspezifische Fluoreszenz auszuschließen, wurden jeweils Färbungen mit Isotypkontrollen durchgeführt.

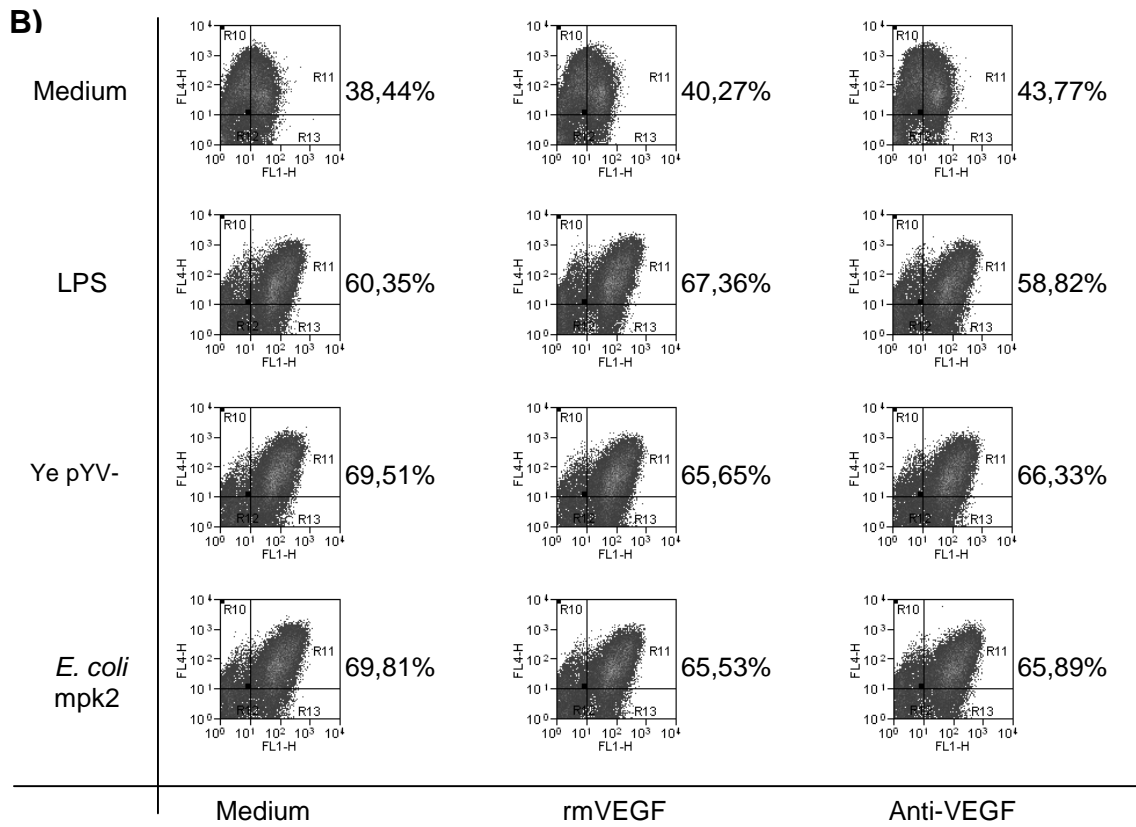
1×10^6 DCs einer C57BL/6x129SV- sowie TLR2^{-/-}x4^{-/-} - Maus wurden mit LPS, Ye pYV- und *E.coli* mpk2 infiziert. Modulation der Versuche mit rmVEGF (1:1 Mischung aus rmVEGF₁₂₁ und rmVEGF₁₆₄, Endkonzentration 20 ng/ml) und Anti-VEGF. (Endkonzentration 1 µg/ml). 24 h nach Infektion der DCs wurde die FACS-Färbung abgeschlossen (Abb. 24).



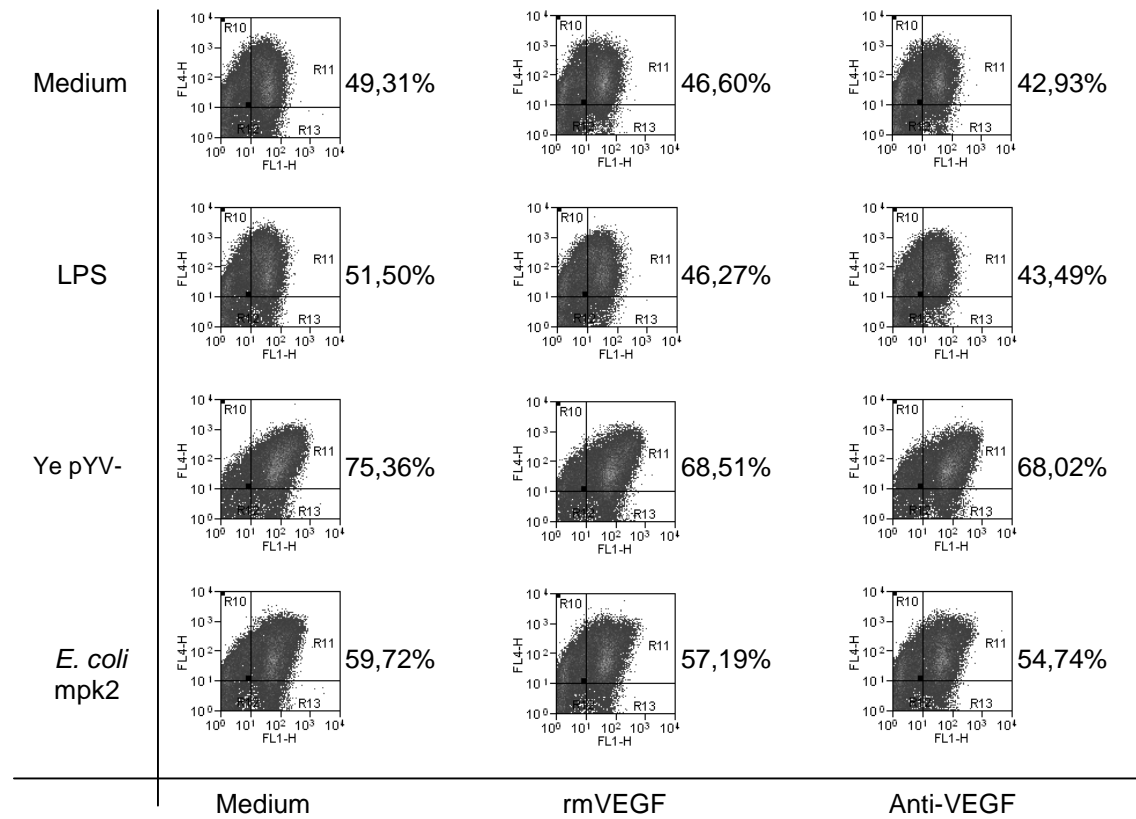
C57BL/6x129SV: MHCII-Expression (Flt4: CD11c, Flt2: MHCII)



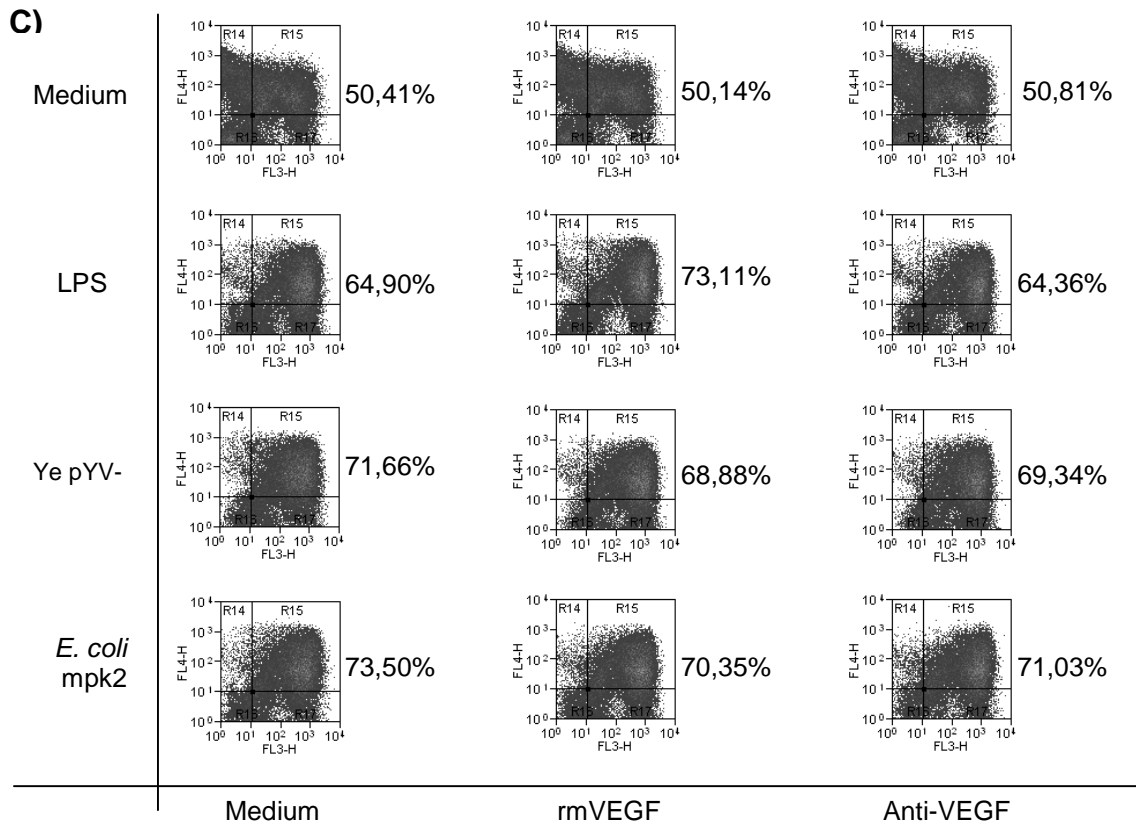
TLR2^{-/-}x4^{-/-}: MHCII-Expression (Flt4: CD11c, Flt2: MHCII)



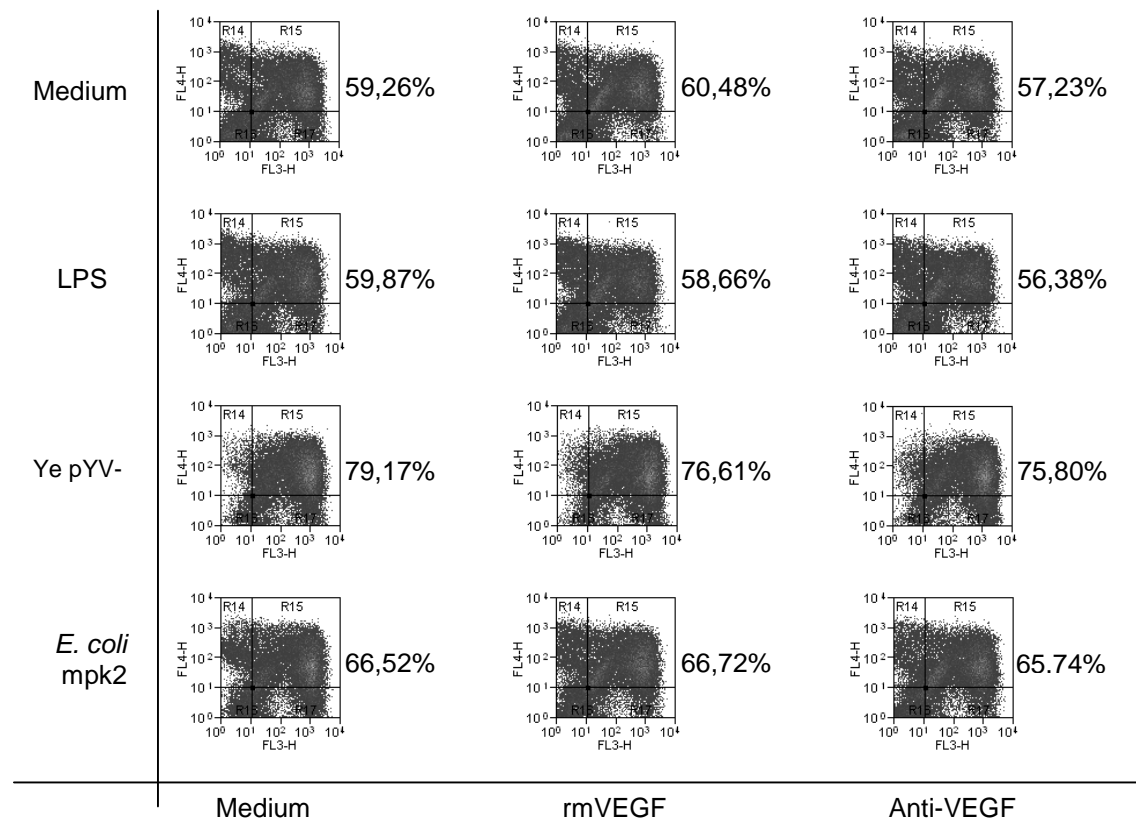
C57BL/6x129SV: CD40-Expression (Flt4: CD11c, Flt1: CD40)



TLR2^{-/-}x4^{-/-}: CD40-Expression (Flt4: CD11c, Flt1: CD40)



C57BL/6x129SV: CD86-Expression (Flt4: CD11c, Flt3: CD86)



TLR2^{-/-}x4^{-/-}: CD86-Expression (Flt4: CD11c, Flt3: CD86)

Abb. 24: Expression costimulatorischer Moleküle

Dendritische Zellen aus dem Knochenmark der C57BL/6x129SV- und TLR2^{-/-}x4^{-/-}-Maus wurden mit LPS (1 µg/ml), Ye pYV- und *E.coli* mpk2 infiziert. Zur Modulation des Versuches erfolgte die Inkubation Medium und unter Zugabe von rmVEGF oder Anti-VEGF. 24 h nach Inkubation erfolgte die FACS-Färbung und Bestimmung von im 24A) MHCII, 24B) CD40 und 24C) CD86 mittels Durchflusszytometrie.

C57BL/6x129SV: Wildtyp-Maus, TLR2^{-/-}x4^{-/-} : Toll-like Rezeptoren 2 und 4 Knockout Maus, LPS: Lipopolysaccharid, pYV: *Yersinia* Virulenzplasmid, MOI: Multiplicity of infection, mpk: Menschenplasmakoagulase, rm: rekombinant mouse

Die gemessenen Fluoreszenzintensitäten wurden im Zweiparameter-Punktdiagramm (Dot Plot) dargestellt und nach Abzug der Isotypenkontrolle (unspezifischer Fluoreszenz) prozentual berechnet. Dabei wurde auf dem Kanal Flt1: CD40, Flt2: MHCII, Flt3: CD86 und Flt4: CD11c gemessen. Die jeweiligen Prozentwerte geben die DC-Population an, welche positiv in den Merkmalen CD11c sowie des entsprechend untersuchten costimulatorischen Molekül ist. Myeloide dendritische Zellen ähneln den Monozyten und weisen das Oberflächenmerkmal CD11c auf.

In den mit LPS- und Bakterien-infizierten Wildtyp-DCs wird die Expression von CD40 und CD86 gegenüber den unbehandelten Zellen gesteigert. Die Expression von MHCII bleibt bei den *Yersinia*- und *E.coli*-infizierten DCs auf dem Level der Mediumkontrolle und bei LPS sinkt dessen Expression. Wenn TLR2^{-/-}x4^{-/-}-DCs mit LPS, *Yersinia* und *E.coli* inkubiert werden, wird die Expression der costimulatorischen Moleküle nur in Bakterien-behandelten Zellen hochreguliert, da die Bakterien die Expression der Oberflächenmoleküle TLR-unabhängig und LPS nur TLR-abhängig induzieren können. Durch Zugabe von rmVEGF wird die Expression costimulatorischer Moleküle weder in den Wildtyp- noch in den TLR2^{-/-}x4^{-/-}-DCs signifikant gehemmt. Auch eine Inkubation mit Antikörpern, welche das VEGF abbinden und eine eventuell hemmenden Wirkung von VEGF aufheben sollen, zeigen keine deutliche Steigerung der Expression der Oberflächenmarker. Dieses Ergebnis zeigt, dass VEGF keinen Einfluss auf die Expression der costimulatorischen Moleküle auf die hier verwendeten DCs hat.

4. Diskussion und Ausblick

4.1. Die Induktion von HIF-1 α und VEGF über Toll-like Rezeptoren
HIF sowie VEGF finden in den letzten Jahren immer mehr Beachtung, da sie in verschiedenen Bereichen, wie z.B. der Tumor- und Infektionsbiologie, des Zellmetabolismus sowie -wachstums, der Adhäsion und der Angiogenese eine tragende Rolle spielen. Bekannt ist, dass unter Hypoxie hohe Level von HIF-1 α im Nukleus detektierbar sind. Jedoch zeigen nun immer mehr Studien, dass auch unter normoxischen Bedingungen HIF-1 α nachzuweisen ist.

Verschiedene TLRs, besonders TLR 2, 4, 7 und 9, führen zu einer erhöhten Synthese und Freisetzung von VEGF, wenn sie mit aktivierenden Liganden wie LPS in Berührung kommen (Frantz et al. 2005). Matsushita et al. (1999) zeigten in ihren Versuchen mit humanen Monozyten, dass diese nach Stimulation mit *Escherichia coli* LPS VEGF sezernieren. Die in unseren Versuchen verwendeten Wildtyp-DCs bilden ebenfalls nach Kontakt mit LPS VEGF. Pinhal-Enfield et al. (2003) führten Experimente mit TLR4^{+/+} sowie TLR4^{-/-} - Mausmakrophagen durch, welche nach Inkubation mit *Escherichia coli* LPS, einem TLR4-Liganden, keine signifikanten VEGF-Anstiege zu verzeichnen haben. Nur im Synergismus mit einem Adenosinrezeptoragonisten zeigt sich bei den TLR4^{+/+} - Makrophagen ein deutlicher VEGF-Anstieg. TLR2- und TLR4-defiziente DCs weisen in unseren Versuchen nach LPS-Kontakt keine VEGF-Sekretion auf. Aufgrund des fehlenden Rezeptors kann das LPS-Signal nicht vermittelt werden, um die VEGF-Sekretion zu induzieren. Jedoch können Yersinien in TLR2^{-/-}x4^{-/-} - DCs TLR-unabhängig die Bildung von VEGF induzieren. Dem Yersinienstamm Ye pYV- inv- fehlt das *inv*-Gen, welches für ein Außenmembranprotein, dem Invasin, kodiert. Dadurch wird die Internalisation in die Zelle erschwert. Das Invasin bindet an β_1 -Integrine und triggert eine Signalkaskade, welche zur Aktivierung von NF- κ B und, neben anderen proinflammatorischen Zytokinen, zur Produktion von IL-8 führt (Schulte et al. 2000). Vorstellbar ist, dass auch HIF-1 α und VEGF über β_1 -Integrine aktiviert werden. In den Versuchen mit TLR2^{-/-}x4^{-/-} - DCs ist nach der Infektion

mit Ye pYV- inv- eine deutlich niedrigere VEGF-Sekretion zu sehen als bei Ye pYV-, welche das Invasin-Protein noch besitzen.

LPS, ein potenter inflammatorischer Faktor, wirkt als starker Stimulator der Genexpression in Makrophagen. Sowohl TLR2 wie auch TLR4 sind in die durch LPS ausgelösten Reaktionen des Organismus involviert. Versuche mit TLR2-defizienten Hamstermakrophagen zeigten, dass die Expression von TLR2 zwar ausreichend aber nicht notwendig für eine Antwort auf Endotoxin ist (Heine et al. 1999). Takeuchi et al. (1999) untersuchten die Rolle von TLR4 bei der Entwicklung eines Endotoxin-Schockes. Es wurden hohe Dosen LPS intraperitoneal in Wildtyp-, TLR2- und TLR4-defiziente Mäuse injiziert. Es zeigt sich, dass TLR4-defiziente, aber nicht TLR2-defiziente Mäuse für einen LPS-induzierten Schock hochempfindlich sind. Die TLR4-Funktion scheint für die LPS-Resistenz verantwortlich zu sein. Endotoxin-tolerante Mäuse weisen eine Mutation im *Tlr4*-Gen auf (Qureshi et al. 1999). Hoshino et al. (1999) zeigten in TLR4^{-/-} - Makrophagen eine beeinträchtigte LPS-Empfindlichkeit, welche sich darin äußert, dass die Makrophagen als Reaktion auf *E. coli*-LPS geringe Level an TNF- α und auf *S. minnesota*-LPS keine detektierbaren Level aufweisen.

Aus dem Knochenmark isolierte Mausmakrophagen weisen nach LPS-Kontakt eine gesteigerte HIF-1 α -Expression auf (Blouin et al. 2004). Dieses Ergebnis deckt sich mit unseren Experimenten an Wildtyp-DCs, welche nach einer LPS-Behandlung die Expression von HIF-1 α induzieren. In TLR2^{-/-}x4^{-/-} - DCs kann aufgrund des fehlenden Rezeptors das LPS-Signal nicht vermittelt werden, um die HIF-1 α -Aktivierung zu induzieren. Infiziert man HeLa-Zellen oder HUVECs mit *Bartonella henselae*, findet man eine deutliche Aktivierung von HIF-1 α (Kempf et al. 2005). In einer weiteren Arbeit von Peyssonnaud et al. (2005) konnte gezeigt werden, dass sowohl grampositive Bakterien wie Gruppe A Streptokokken und Methicillin-resistente *Staphylococcus aureus* (MRSA) als auch gramnegative Bakterien wie *Pseudomonas aeruginosa* oder *Salmonella Typhimurium* in der Lage sind, in Mausmakrophagen HIF-1 α zu induzieren. Dadurch wird auch die Produktion wichtiger Immuneffektorproteine wie Proteasen aus Granula, antimikrobielle Peptide, Stickstoffmonoxid (NO) und TNF- α beeinflusst. Frede et al. (2006) demonstrierten an humanen Monozyten

eine signifikant erhöhte HIF-1 α -Akkumulation in mit LPS-behandelten Zellen. Nishi et al. (2008) zeigten an humanen myeloischen Leukämiezellen, dass die LPS-vermittelte HIF-1 α -Aktivierung TLR4-abhängig induziert wird. Diese Zellen wurden unter normoxischen Bedingungen verschiedenen Konzentrationen an LPS ausgesetzt und die HIF-1 α -Expression mittels eines Immunoblots dargestellt. Durch die Transfektion von *small interfering RNA* (siRNA) gegen TLR4 wird dessen Expression verringert bzw. gehemmt, was zu einer aufgehobenen LPS-induzierten HIF-1 α -Proteinakkumulation führt. Peyssonnaud et al. (2007) zeigten ebenfalls in ihrer Studie, dass die Produktion von HIF-1 α in Mausmakrophagen TLR4-abhängig vermittelt wird. Es wurden aus dem Knochenmark isolierte Wildtyp- und TLR4-defiziente Makrophagen mit LPS sowie zwei gramnegativen Stämmen, *S. Typhimurium* und *P. aeruginosa*, infiziert und HIF-1 α mittels Westernblot detektiert. Die Analysen ergaben bei den beiden Bakterienstämmen eine gegenüber dem Proteinlevel der Wildtypmaus reduzierte und bei LPS eine stark reduzierte Expression von HIF-1 α in den TLR4^{-/-}-Makrophagen. Die in dieser Arbeit ermittelten Ergebnisse zeigen, dass die mit Yersinien infizierten TLR2^{-/-}x4^{-/-}-DCs ebenfalls eine HIF-1 α -Expression, wenn auch im Vergleich zu den Wildtyp-DCs schwächer ausgeprägt. Diese Resultate demonstrieren, dass Yersinien die VEGF-Genexpression über die transkriptionale Aktivierung von HIF-1 α TLR-unabhängig induzieren.

In mononukleären konditionalen Knockout Zellen führt die Abwesenheit von HIF-1 α zu einem stark reduzierten ATP-Pool. Dies äußert sich in einer deutlichen Verschlechterung der Aggregation, der Beweglichkeit und der Invasivität der mononukleären Zellen und schwächt deren Fähigkeit, Bakterien abzutöten (Cramer et al. 2003). Das zeigt die wichtige Rolle von HIF-1 α für die Zell-vermittelte Entzündungsreaktion auf.

Die Sepsis ist immer noch die führende Todesursache auf Intensivstationen. Therapeutische Versuche mit Protein C, hochdosierten Steroiden, TNF- α -, IL-1, Prostaglandin- oder Bradikinin-Antagonisten haben keine erfolgreichen Ergebnisse geliefert (Efron et al. 2003). HIF-1 α stellt eine äußerst

entscheidende Determinante in der Entwicklung der Sepsis dar. Es fördert die Produktion proinflammatorischer Zytokine wie TNF- α , IL-1, IL-4, IL-6 und IL-12, welche im Frühstadium der Sepsis schon kritische Werte erreichen. Die HIF-1 α -Deletion in Mausmakrophagen schützt vor LPS-induzierter Mortalität und hemmt die im Rahmen der Sepsis auftretende Hypotension und Hypothermie (Peyssonnaud et al. 2007). Die Inhibition der HIF-1 α -Aktivität zeigt somit eine neue therapeutische Möglichkeit im Kampf gegen die LPS-induzierte Sepsis auf.

4.2. Die Rolle von MyD88 und Trif im Rahmen der Induktion der Zytokinproduktion

Die TLR-Familie erkennt verschiedene pathogenspezifische molekulare Strukturen. TLR2 erfasst grampositive Zellwandkomponenten während TLR4 LPS, eine Komponente gramnegativer Bakterien erkennt. MyD88 ist ein Adaptermolekül, welches als Bindeglied im TLR-Signaling erscheint. Aber nicht nur MyD88, sondern auch das an den TLR4 gekoppelte Adapterprotein Trif spielt eine wichtige Rolle bei der Bildung einer Immunantwort durch DCs. Obwohl sich MyD88 zunächst bei der durch die TLR-Aktivierung ausgelösten Signaltransduktionen als ein wichtiger und benötigter Baustein präsentierte, weisen immer mehr Studien auf, dass verschiedene TLR-Agonisten, wie z.B. LPS, auch ein Signal in Abwesenheit von MyD88 hervorrufen können. So zeigten Akira et al. (2000) und Kaisho et al. (2001 und 2002), dass die LPS-induzierte Hochregulation costimulatorischer Moleküle (CD40, CD80, CD86) von DCs und die folgende T-Zell-Aktivierung TLR4-abhängig und MyD88-unabhängig (Trif-abhängig) von statten geht. Kawai et al. (2001) demonstrierten in ihren Versuchen, dass die durch LPS ausgelöste Bildung von Interferon- β (IFN- β) und die Aktivierung von NF- κ B in Makrophagen und DCs, vermittelt über TLR4, MyD88-unabhängig verläuft. Diese Beobachtungen deuten darauf hin, dass es noch andere Adapterproteine geben muss, welche zur Induktion und Aktivierung verschiedener Zytokine oder Transkriptionsfaktoren führen. In diesem Kontext wurde Trif identifiziert, welches in MyD88-unabhängigen Signalwegen involviert ist. De Trez et al. (2005) beschrieben ebenfalls eine

durch *E. coli*-induzierte TLR4-Trif-abhängige, MyD88-unabhängige DC-Reifung, aber auch verstärkte Apoptose. Dies weist auf eine mögliche Rolle von Trif in der Entwicklung der adaptiven Immunabwehr hin, welche während einer *E. coli*-Septikämie durch die massive DC-Apoptose beeinträchtigt ist.

Björkbacka et al. (2004) verdeutlichten in ihren Versuchen die Rolle von MyD88, indem die Mehrheit der durch LPS oder *E. coli* induzierten Genexpressionen MyD88-unabhängig verlaufen. Wildtyp und MyD88-defiziente Mausmakrophagen wurden mit LPS stimuliert und die Zytokine TNF- α und RANTES mittels ELISA bestimmt. Es zeigt sich, dass die Induktion von TNF- α MyD88-abhängig und die von RANTES MyD88-unabhängig verläuft.

Die Produktion pro- sowie antiinflammatorischer Zytokine als Antwort auf den TLR4-Liganden LPS war in Trif-defizienten Makrophagen reduziert (Yamamoto et al. 2003). Mäuse, in welchen beide Adaptermoleküle (MyD88 und Trif) ausgeknockt waren, zeigten einen kompletten Verlust der Aktivierung von NF- κ B sowie eine fehlende Sekretion verschiedener Zytokine. Dieses Ergebnis legt nahe, dass beide (MyD88- und Trif-abhängige) Signaltransduktionswege für die maximale Induktion pro- und antiinflammatorischer Zytokine auf eine LPS-Antwort erforderlich sind. Weighardt et al. (2004) identifizierten Trif als den Hauptregulator der TLR4-getriggerten Expression von Genen in DCs. In Trif-defizienten DCs zeigt sich eine signifikante Herunterregulation verschiedener Gene.

In dieser Arbeit konnte dargelegt werden, dass die Abwesenheit der für das TLR-Signaling wichtigen Adaptermoleküle Trif und MyD88 keine Änderung der VEGF-Sekretion hervorrufen, wenn DCs mit Yersinien infiziert werden. Die Induktion von VEGF scheint in MyD88^{-/-} - DCs MyD88-unabhängig/Trif-abhängig und in Trif^{-/-} - DCs Trif-unabhängig/MyD88-abhängig zu verlaufen. Yersinien können im Gegensatz zu LPS die VEGF-Sekretion auch TLR-unabhängig, und somit unabhängig von den Adaptermolekülen MyD88 und Trif induzieren. Dies könnte die gegenüber den mit LPS behandelten DCs um bis zu 75 % höhere VEGF-Konzentration erklären.

TLR4 benötigt zur Induktion der Expression von Zytokinen MyD88-abhängige und MyD88-unabhängig/Trif-abhängige Signale (Akira et al. 2004).

Makrophagen defizient in MyD88 und Trif zeigen eine komplett aufgehobene LPS-induzierte TNF- α -Sekretion bzw. NF- κ B-Aktivierung (Hoebe et al. 2003, O'Neill et al. 2007).

Die in unserem Versuch verwendeten DCs von MyD88- und Trif-defizienten Mäusen zeigen ein vermindertes Ansprechen bzw. Unempfindlichkeit auf LPS. Kawai et al. (1999) legten ebenfalls in ihrer Studie dar, dass MyD88-defiziente Makrophagen einen kompletten Verlust der Ansprechbarkeit auf LPS aufweisen. Dies zeigt sich in einer stark verminderten Zytokinproduktion (IL-6, TNF- α , IL-1 β) sowie MHCII-Expression und der daraus resultierenden verminderten B-Zell-Proliferation. MyD88-Knockoutmäuse sind bei Gabe hoher LPS-Dosen resistent für einen Endotoxin-Schock. Diese Feststellung legt nahe, dass MyD88 eine wichtige Rolle im LPS-Signaling einnimmt. Eine synergistische Aktivierung von MyD88-abhängigen und MyD88-unabhängigen/Trif-abhängigen Stoffwechselwegen könnte die starke immunostimulatorische Induktion eines endotoxischen Schockes durch den TLR4-Liganden LPS erklären (Akira et al. 2004). Weighardt et al. (2002) wiesen eine erhöhte Widerstandsfähigkeit von MyD88-defizienten Mäusen gegenüber einer Sepsis nach einer Infektion mit *S. aureus* nach. Takeuchi et al. (2000) demonstrierten in ihren Experimenten mit TLR2^{-/-} und MyD88^{-/-}-Mäusen, dass diese, im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen, nach Inokulation von *S. aureus* eine höhere Mortalität aufweisen. Versuche mit TLR4- und MyD88-defizienten Makrophagen zeigen eine gewisse Unempfindlichkeit gegenüber LPS auf. Das Erkennen von Bakterien durch die TLR-Familie sowie die Funktion von MyD88 scheinen eine bedeutende Rolle in der Eliminierung eindringender Bakterien im Rahmen der Wirtsabwehr zu spielen.

4.3. Die Rolle der MAPK, PI3K und Rho GTPasen in der Zytokinproduktion im Rahmen einer Entzündung oder der Tumorgenese

Die Expression von HIF-1 α und VEGF spielen eine Hauptrolle in der Förderung der Angiogenese, welche über verschiedene regulatorische Moleküle, die entweder vom Tumor selbst oder den umliegenden normalen Zellen freigesetzt

werden, vermittelt wird und der metabolischen Anpassung verschiedener Tumoren. PI3K/Akt ist ein Bestandteil des Signaling zur Produktion von Onkogenen, Tumorsuppressorgenen und VEGF (Blancher et al. 2001). Die onkogenetische Transformation, bei der das PI3K-Signaling eine wichtige Rolle spielt, ist assoziiert mit einer Zunahme an wachstumsfördernden Onkoproteinen und einem Funktionsverlust an wachstumshemmenden Tumorsuppressorproteinen (Hellwig-Bürgel et al. 2005). Es hat sich in bestimmten Krebszellen gezeigt, dass die Induktion von HIF-1 α und die daraus resultierende transkriptionale Aktivierung von VEGF durch das MAPK-Signaling (Zhong et al. 2000, Blancher et al. 2001, Laughner et al. 2001, Wu et al. 2005) sowie auch PI3K-Signaling (Wu et al. 2005) herbeigeführt wird.

In der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, ob die TLR-unabhängige induzierte HIF-1 α /VEGF-Aktivierung in DCs über PI3K, MAPK oder Rho GTPasen vermittelt wird. Es wurde überprüft, ob die VEGF-Sekretion in denen in dieser Arbeit verwendeten DCs durch die PI3K-Inhibitoren Wortmannin und Ly294002, den MAPK-Inhibitoren SB203580 und SP600125 sowie des Rho GTPasen-Inhibitors TcdB-10463 beeinflusst werden kann. Studien zeigen, dass VEGF in die Pathogenese verschiedener Entzündungen involviert ist, wie z.B. der Osteoarthritis. Bei dieser Erkrankung induzieren Hypoxie und IL-1 die VEGF-Produktion in Chondrozyten durch MAPK - abhängiges Signaling. p38- sowie JNK-Inhibitoren schwächen die HIF-1 α -Expression. Die Aufklärung der Regulationsmechanismen der VEGF-/HIF-1 α -Expression in den Chondrozyten könnte eine Möglichkeit zur Etablierung einer neuen spezifischen Strategie gegen Knorpelabbau bei der Osteoarthritis eröffnen. HIF-1 α reguliert, wie wir bereits wissen, unter hypoxischen Bedingungen viele Gene. Die Expressionen bedeutender hypoxischer Gene wie der Glucosetransporter 1 und VEGF in Makrophagen werden während der Wundheilung oder in der Anwesenheit von LPS gesteigert. Blouin et al. (2003) untersuchte die durch LPS induzierte HIF-1 α -Expression in Knochenmarksmakrophagen der Maus. Sie wurden mit Ly294002 (20 μ M) sowie Wortmannin (100 nM) für 15 min vorinkubiert und mit LPS (1 μ g/ml) für 6 h inkubiert. Beide Inhibitoren hemmten die HIF-1 α -Expression. Aber nicht nur VEGF, sondern auch andere proinflammatorische

Zytokine wie z.B. TNF- α und IL-1 β sind als Mediatoren der LPS-induzierten Entzündung beteiligt und können durch Verwendung des p38-Kinase-Inhibitors SB203580 in ihrer Ausschüttung stark beeinträchtigt werden (Haddad et al. 2001). Und das als Antwort auf eine bakterielle Infektion mit *Y. enterocolitica* sekretierte proinflammatorische Zytokin IL-8 wird durch Wortmannin nicht gehemmt, jedoch die Invasion von *Yersinia* in die HeLa-Zellen (Schulte et al. 1998). HIF-1 α spielt auch eine Rolle in der Aufrechterhaltung der O₂- und Energie-Homöostase. Die immunmodulatorischen Peptide TNF- α und IL-1 β stimulieren die PI3K- sowie MAPK-abhängige Aktivierung von HIF-1 α in normoxischen Zellen, wie z.B. den humanen Tubuluszellen der Niere (Hellwig-Bürgel et al. 2005). HIF-1 α kann neben den Zytokinen auch durch Wachstumsfaktoren, wie dem Insulin, induziert werden. Doronzo et al. (2006) arbeiteten in ihren Experimenten mit humanen glatten Gefäßmuskelzellen, welche, wenn sie mit Insulin stimuliert wurden, VEGF über PI3K- oder MAPK-Stoffwechselwege synthetisierten. Die Insulin-induzierte HIF-1 α -Aktivierung, welche mittels Westernblot dargestellt wurde, verringerte sich durch den Einsatz von dem JNKII-Inhibitor (SP600125) und dem MEK-Inhibitor (PD98059), jedoch nicht durch den p38-Inhibitor (SB203580). Gefäßmuskelzellen, welche eine Insulinresistenz aufwiesen, zeigten einen reduzierten Insulineffekt auf die Expression von VEGF und HIF-1 α , was in einer verminderten Vaskularisierung der Extremitäten beispielsweise resultierte.

Bakterien haben einen Mechanismus entwickelt, dem Wirt über Eisenchelatoren, wie z.B. dem DFO, Eisen zu entziehen. Interessanterweise hat sich in Experimenten gezeigt, dass DFO in Epithelzellen die inflammatorische Zytokinproduktion in Abwesenheit von Bakterien anregt. Markel et al. (2007) experimentierten mit fetalen humanen intestinalen Epithelzellen, welche mit einem Eisenchelator DFO stimuliert wurden und denen zum Vergleich in einem zweiten Ansatz p38-Kinase-, ERK- oder JNK-Inhibitoren zugegeben wurden. 24 h nach Inkubation wurden die Überstände auf VEGF untersucht. Das Resultat zeigte, dass die durch DFO induzierte VEGF-Produktion von denen an der Signaltransduktion beteiligten MAPK (p38, ERK, JNK) abhängig war und DFO wahrscheinlich den gleichen

Stoffwechselweg benötigt, um Zytokine zu induzieren. Diese Beobachtung von DFO wäre mit dem Ergebnis in dieser Arbeit in Einklang zu bringen, da DFO bei Zugabe von MAPK-Inhibitoren in den Wildtyp-DCs eine im Vergleich zur Mediumkontrolle erniedrigte VEGF-Produktion aufweist. Die gesteigerte VEGF-Sekretion in den vorbehandelten TLR-defizienten DCs zeigte sich nur in diesem Versuch, was vermutlich auf einen Pipettier- oder Messfehler zurückzuführen ist, da weitere unabhängig voneinander durchgeführte Versuche eine wie in den Wildtyp-DCs herabgesenkte VEGF-Konzentration in der mit MAPK-Inhibitoren inkubierten Positivkontrolle aufwiesen.

Anhand der Aussagen dieser ganzen Studien ist erkennbar, dass die Aktivierung von HIF-1 α und VEGF unter hypoxischen sowie diversen normoxischen Stimuli zellspezifisch induziert wird. In dieser Arbeit verwendete Wildtyp- und TLR2^{-/-}x4^{-/-} -DCs zeigen signifikante Reduktionen der VEGF-Konzentration, wenn diese mit dem MAPK-Inhibitoren (p38, JNKII), dem spezifischen PI3K-Inhibitor Ly294002 sowie dem Rho GTPasen-Inhibitor Toxin B vorbehandelt wurden. Die Verwendung des unspezifischen PI3K-Inhibitors Wortmannin führte zu keinen signifikanten Abnahme von VEGF. Die Ergebnisse zeigen, dass die Infektion von DCs mit *Y. enterocolitica* zu einer MAPK-, PI3K- sowie Rho GTPasen-vermittelten Induktion von HIF-1 α und VEGF führt

Unser zunehmendes Verständnis der Signal- und Stoffwechselwege, welche in die Regulation der Zytokinproduktion sowie in das Signaling der Immunzellen involviert sind, öffnet eine Tür für die Entdeckung neuer Therapiemöglichkeiten zur Behandlung einer Vielzahl entzündlicher Erkrankungen. Die p38-MAPK-Inhibitoren sind in verschiedenen Erkrankungsmodellen wirksam, eingeschlossen die Entzündung, Arthritis und andere Gelenkerkrankungen, Sepsis sowie Myokardschäden (Lee et al. 2000). In all diesen Fällen korreliert die p38-Aktivierung mit der Initiation und Progression der Erkrankung. Der p38-Kinase-Inhibitor SB203580 hat sich im *in vivo*-Modell der Arthritis und entzündlichen Angiogenese als sehr effektiv erwiesen (Haddad et al. 2001).

Rho GTPasen stellen ebenfalls ein wichtiges Bindeglied in Signaltransduktion dar. Sie können die MAPK-Kaskade induzieren und das Signal in den Zellkern zur Aktivierung diverser Transkriptionsfaktoren überführen. Sie nehmen auch

starken Einfluss auf die Reorganisation des Aktinzytoskelettes. Grassl et al. (2003) und Schmid et al. (2004) identifizierten Rho GTPasen, insbesondere Rac1, als ein Zwischenglied in der *Y. enterocolitica* Invasin-getriggerten IL-8-Synthese in HeLa-Zellen. Ein niedriger O₂-Gehalt kann die Tumorprogression durch Förderung der Angiogenese beeinflussen. In diesem Prozess sind die Rho GTPasen involviert. Xue et al. (2006) zeigten mit Versuchen an humanen Tumorzellen des Magens und der Leber, dass Hypoxie die intrazelluläre Aktivität der Rho GTPasen Rac1 und Cdc42 steigert, welche mit dem Einsatz des PI3K-Inhibitors Ly294002, aber nicht mit dem MAPK-Inhibitor SB203580 blockiert werden kann. Obwohl die Aktivierung von HIF-1 α während eines entzündlichen Geschehens wünschenswert ist, stellt die Suppression von HIF-1 α einen förderlichen Effekt dar, um Tumorangiogenese und -zelladaption an die hypoxische Bedingungen zu unterdrücken.

4.4. Proinflammatorische Zytokine aktivieren HIF-1 α und VEGF

Proinflammatorische Zytokine wie IL-1 β und TNF- α sind von Monozyten oder anderen Zellen sekretierte Proteine als Antwort auf einen entzündlichen Stimulus (Lee et al. 1994). TNF- α stellt eines der wichtigsten proinflammatorischen Zytokine dar, die während einer bakteriellen Infektion von Makrophagen produziert werden. Es initiiert die Produktion einer Palette von weiteren Zytokinen, erhöht die Gefäßpermeabilität und rekrutiert weitere Makrophagen und Neutrophile zum Infektionsherd. Lokal ist es an der Entzündungsreaktion beteiligt, systemisch ist es hauptverantwortlich für die Symptome eines septischen Schocks, ausgelöst durch das LPS Gramnegativer Bakterien (Tracey et al. 1993). IL-1 β , ebenfalls ein Entzündungsmediator, stellt einen zentralen Botenstoff in der Antwort des Wirtsorganismus auf eine Reihe von Fremdeinflüssen dar, wie z.B. dem LPS. Schon wenige Nanogramm des hochwirksamen Zytokins reichen aus, um z.B. Fieber, einen Anstieg der neutrophilen Granulozyten, der Thrombozyten, der Akute-Phase-Proteine und des zirkulierenden IL-6 zu bewirken (www.wikipedia.de). Eine Großzahl an Peptiden sind identifiziert wurden, welche die HIF-1 α -

Akkumulation und HIF-1 α -DNA-Bindung unter normoxischen Bedingungen induzieren können.

Hellwig-Bürgel et al. (1999) zeigten mit Tumorzellen aus der Leber, dass diese unter entweder normoxischen oder hypoxischen Bedingungen in Kombination mit 300 pg/ml IL-1 β einen erhöhten Gehalt an HIF-1 α -Protein aufweisen. Im Gegensatz dazu verursacht TNF- α keine signifikante Akkumulation von HIF-1 α . Jung et al. (2003) fanden in ihren Versuchen mit humanen Lungenkrebszellen heraus, dass IL-1 β unter normoxischen Bedingungen HIF-1 α hochreguliert und VEGF über einen NF- κ B-abhängigen Signalweg gebildet wird. Ein proinflammatorisches Signal (IL-1 β) wird durch die Hochregulation von HIF-1 α , welches zur VEGF-Sekretion führt, in ein onkogenetisches Signal umgewandelt. Somit wurde HIF-1 α als ein ausschlaggebender Transkriptionsfaktor identifiziert, der in das Entzündungsgeschehen sowie die Tumorgenese involviert ist. Zahlreiche Berichte legen dar, dass IL-1 β , welches während einer Entzündung produziert wird, die Tumorzellproliferation stimuliert und die Angiogenese sowie die Tumordinvasion fördert (Jung et al. 2003). Jung und sein Team wiesen in Fibroblasten eine verstärkte Akkumulation von HIF-1 α (jedoch keine Änderung im HIF-1 α -mRNA-Level) nach Inkubation mit TNF- α nach. In proximalen Tubuluszellen der Niere ermittelten El Awad et al. (2000) eine gesteigerte Rate an VEGF-Protein im ELISA nach Inkubation mit 300 pg/ml IL-1 β . Solch ein Effekt zeigt sich nicht bei Behandlung der Zellen mit 10 ng/ml TNF- α . Qian et al. (2004) demonstrierten an humanen Zytotrophoblasten eine durch IL-1 β (9 h Inkubation) in Normoxie induzierte VEGF-Sekretion, wobei die Inkubation von 10 ng/ml IL-1 β eine im ELISA ermittelte VEGF-Konzentration bis 2500 pg/ml (Mediumkontrolle 100 pg/ml) ergibt. Albina et al. (2001) stellten fest, dass in Makrophagen nur Hypoxie und TNF- α , aber nicht IL-1 β zu einer signifikanten Erhöhung von HIF-1 α -Proteinexpression führen. TNF- α kann in primären Entzündungszellen die Akkumulation von HIF-1 α induzieren, verändert aber nicht die Menge an HIF-1 α -mRNA. Diese Beobachtung zeigt, dass HIF-1 α in die Regulation der Genexpression während eines entzündlichen Geschehens involviert ist. Cumberbatch et al. (1997a, b) beschrieben den

positiven Einfluss von IL-1 β und TNF- α auf die Migration und Morphologieentwicklung von epidermalen Langerhans Zellen sowie deren Akkumulation als DCs in den Lymphknoten.

Anhand der Aussagen dieser ganzen Studien lässt sich erkennen, dass die Aktivierung von HIF-1 α und VEGF durch Zugabe von TNF- α oder IL-1 β unter hypoxischen sowie normoxischen Bedingungen zellspezifisch induziert wird. Die Wildtyp- und TLR-defizienten DCs in dieser Arbeit zeigen keinerlei Reaktion im Hinblick auf eine VEGF-Sekretion, wenn sie mit Zytokinen und diversen Umgebungsbedingungen stimuliert werden. Die Induktion von HIF-1 α und VEGF in Maus-DCs wird nicht durch die Zytokine TNF- α oder IL-1 β , welche im Rahmen einer bakteriellen Infektionen entstehen, vermittelt. Im Sinne eines parakrinen oder autokrinen Regulationsmechanismus wäre die Steigerung der Abwehrbemühungen einer Zelle durch Weitergabe der Informationen an benachbarte Zellen des Immunsystems aus Sicht des Wirtsorganismus sinnvoll gewesen.

4.5. Die Phagozytose-unabhängige Produktion von Zytokinen und bakterizider Aktivität verschiedener Zellen des Immunsystems

Die phagozytische Aktivität durch Zellen des angeborenen Immunsystems ist wichtig, um eindringende Pathogene in den Organismus erfolgreich zu eliminieren. Knochenmark-DCs, welche *E.coli* oder *S. Typhimurium* phagozytiert haben, exprimieren definierte Epitope zur Präsentation durch MHC I- und MHC II-Moleküle an der Zelloberfläche. In Anwesenheit von Cytochalasin D, welches in das zytoskelettale System eingreift und die Phagozytose inhibiert, wird die Expression der MHC-Moleküle gehemmt (Svensson et al. 1997). Schulte et al. (1998) zeigten, dass die mit Wortmannin geblockte Invasion von *Y. enterocolitica* in HeLa-Zellen keine Auswirkung auf deren IL-8-Sekretion hat. Die Adhäsion der Yersinien scheint ausreichend zu sein, um die Bildung von IL-8 in den Epithelzellen zu induzieren. Resto-Ruiz et al. (2002) infizierten mit Cytochalasin D vorbehandelten humanen Makrophagen mit *Bartonella henselae* und beurteilten die VEGF-Sekretion bei fehlender Phagozytose. Es wurden keine ersichtlichen Veränderungen der VEGF-, IL-1 β -

und IL-8-Produktion zwischen unbehandelten und mit Cytochalasin D vorbehandelten Zellen beobachtet. Die Cytochalasin D- Konzentration von 1 µg/ml hemmt zwar die Phagozytose, aber nicht die Adhärenz von *B. henselae* an die Makrophagen. Resto-Ruiz und sein Team verwendeten in ihren Versuchen 1×10^6 Zellen/Well und infizierte sie mit *B.henselae* mit einer MOI von 100. Das im Überstand befindliche VEGF wurde mittels ELISA 24 h nach der Infektion gemessen. Diese Beobachtungen deuten darauf hin, dass ein Kontakt zwischen Bakterien und Zelle ausreicht, um die Bildung von VEGF zu induzieren. Diese Beobachtungen konnten in den vorliegenden Versuchen dieser Arbeit auch für *Yersinia*-infizierte DCs bestätigt werden. Da Wortmannin und Ly294002 die Phagozytose von Yersinien in DCs vermindern, scheint die Aktivierung der PI3K für den Invasionsprozess eine Rolle zu spielen. Ein oberflächlicher Kontakt von Yersinien mit DCs reicht aus, um die VEGF-Sekretion zu initiieren. Wenn also nicht die Phagozytose das entscheidende Kriterium für die Induktion der VEGF-Sekretion darstellt, welche anderen Faktoren spielen dann eine Rolle? Die Invasion von *Y. enterocolitica* wird durch das Invasin vermittelt, welches an β_1 -Integrine auf der Zelloberfläche des Wirtes bindet (Isberg und Leong 1990). Eine Invasin-defiziente *Y. enterocolitica*-Mutante besitzt im Gegensatz zum Wildtyp nicht mehr die Fähigkeit zur Invasion in Epithelzellen (Pepe und Miller 1993). Diese Beobachtung kann mit unseren Versuchen nicht bestätigt werden, wobei die in dieser Arbeit verwendeten Zellen DCs und keine Epithelzellen darstellen. Somit richtete sich die Aufmerksamkeit auf die Rolle des Invasins bei der Yersinien-induzierten VEGF-Sekretion durch DCs. Es wurden die Auswirkungen der *inv*-Mutation bei *Y. enterocolitica* in Abhängigkeit der Phagozytose, d.h. mit und ohne Vorinkubation der Proben mit Wortmannin, Ly294002 und Cytochalasin D analysiert. Trotz Hemmung der Invasion von Yersinien sinkt die VEGF-Konzentration nicht äquivalent dazu. Die VEGF-Konzentration sowie der prozentuale Anteil inokulierter Yersinien ist bei den mit *Ye pYV- inv-* infizierten DCs im Vergleich zu den mit *Ye pYV-* behandelten DCs niedriger. Durch das fehlende Invasin wird die Internalisation in die Zelle erschwert und somit die ohnehin durch den Einsatz von Inhibitoren reduzierte Phagozytose weiter

eingeschränkt. Dieses Ergebnis lässt vermuten, dass die Adhäsion der Ye pYV- und die darauf induzierte VEGF-Sekretion TLR2 und 4-unabhängig durch Invasin vermittelt wird, wobei dieser Mechanismus unabhängig der Phagozytose der Yersinien in den in dieser Arbeit verwendeten TLR2^{-/-}x4^{-/-} - DCs geschieht. Ye pYV- inv- weisen trotz fehlenden Invasins eine geringe Phagozytosefähigkeit und induzierte VEGF-Sekretion auf. Im Gegensatz dazu zeigte Kampik 2001 in seiner Dissertation, dass der *inv*-defiziente *Yersinia*-Stamm (Ye pYV- inv-) im Gegensatz zu seinem Mutterstamm (Ye pYV-) nicht mehr in der Lage ist, mit und ohne Hemmung der Invasion der Bakterien, die Zytokin-mRNA-Expression von beispielsweise IL-8, IL-1 β oder TNF- α in HeLa-Zellen zu induzieren.

Die in dieser Arbeit durchgeführten Versuche mit Cytochalasin D vorbehandelten DCs zeigen im Gegensatz zur Mediumkontrolle zwar eine drastisch reduzierte Invasion von Bakterien auf, jedoch fallen die VEGF-Konzentrationen in diesem Kontext unerwartet hoch aus. Cytochalasin D, ein Gift aus Schimmelpilzen, blockiert zytostatisch die Polymerisation der Aktinfilamente und hemmt dadurch die Bakterienaufnahme bei den DCs (Yrild und Wick 2002). Daraus kann geschlossen werden, dass für die Invasion der Yersinien in DCs ein intaktes Aktin-Zytoskelett notwendig ist. Dieser Inhibitor scheint als unerwünschte Nebenwirkung starke Veränderungen in der Zellmorphologie auszulösen, indem sich Zellen z.B. abrunden (Greiffenberg 2000). Möglicherweise sind die DCs durch die Cytochalasin D-induzierte Zellformänderung so stark „gestresst“, dass sie darauf hin vermehrt VEGF und eventuell noch weitere proinflammatorische Zytokine in die Umgebung ausschütten.

Ob Yersinien von Makrophagen phagozytiert werden können oder nicht, hängt von der Präsenz des pYV-Plasmids ab (Cornelis et al. 1998). Mikroskopische Analysen infizierter DCs offenbaren, dass Ye pYV+, nicht jedoch Ye pYV-, das Zytoskelett schädigen und somit die Phagozytosefähigkeit muriner DCs stark beeinträchtigen. Dieser Effekt ist von Pathogenitätsfaktoren, sogenannte Yops, welche auf dem pYV-Plasmid kodiert sind und dem Typ III-Sekretionssystem der Yersinien abhängig (Adkins et al. 2007). Adkins et al. (2008) demonstrierten

ebenfalls den gehemmten Antigenabbau (Ovalbumin) in DCs nach einer Infektion mit *Y. enterocolitica*. Mikroskopische Untersuchungen von Ye pYV-infizierten DCs ergaben, dass in DCs mit weniger oder ohne Anwesenheit intrazellulärer Bakterien der Antigenabbau verstärkt nachweisbar ist. Mit Blockierung der Internalisation von Ye pYV- durch Cytochalasin D zeigte sich, dass der Antigenabbau nicht mehr inhibiert wird, was den Wettkampf zwischen dem Abbau von Bakterien und Ovalbumin verdeutlicht. Die gezielte Zerstörung des Aktin-Zytoskeletts und Hemmung der Phagozytose durch Yersinien in Zellen des angeborenen Immunsystems stellt einen wichtigen pathogenen Mechanismus zur Unterdrückung der Internalisation von Bakterien und deren Vernichtung dar. Yersinien entkommen somit der adaptiven Immunantwort des Organismus (Autenrieth et al. 1993).

Araki et al. (1996) stellten den dosisabhängigen hemmenden Effekt von PI3K-Inhibitoren Wortmannin und Ly294002 auf die Aktin-abhängige Makropinozytose- und Phagozytosefähigkeit von murinen Knochenmarksmakrophagen mittels Fluoreszenzmikroskopie dar. Beide Prozesse erfuhren eine maximale Inhibition bei der Verwendung von 100 nM Wortmannin und 50 μ M Ly294002. Diese Konzentrationsangaben wurden dann auch für unsere Experimente genutzt. Agrawal et al. (2007) bestätigten, dass die mangelhafte Funktion des PI3K/AKT-Signalweges, gehemmt durch Ly294002, in einer erniedrigten Phagozytose und Migration humaner DCs resultiert.

Peyssonnaud et al. (2005) entdeckten in HIF-1 α -defizienten Mausmakrophagen eine verminderte bakterizide Aktivität. Sie verglichen die intrazellulären CFUs von Wildtyp- und HIF-1 α ^{-/-}-Makrophagen unter normoxischen und hypoxischen Bedingungen, welche mit Streptokokken der Gruppe A infiziert waren. HIF-1 α ^{-/-}-Makrophagen zeigten im Vergleich zu Wildtyp-Makrophagen sowohl unter normoxischen als auch hypoxischen Bedingungen eine deutlich reduzierte bakterizide Aktivität. Dieser Effekt indiziert, dass HIF-1 α in das intrazelluläre killing der Makrophagen involviert ist. In Wildtyp-Makrophagen zeigte sich paradoxerweise eine verstärkte Phagozytose und Abtötung der Bakterien unter hypoxischen Bedingungen.

Bakterien und LPS agieren als potente Aktivatoren unkontrollierter Zytokinfreisetzung durch Immunzellen sowie Monozyten und Makrophagen, welche eine potentiell tödliche Immunantwort des Wirts im Rahmen einer Sepsis auslösen können (Zinkernagel et al. 2007). Die erfolgreiche Kontrolle einer Infektion in z.B. peripheren Geweben benötigt eine effektive Abwehr phagozytischer Zellen wie Monozyten oder Makrophagen in Sauerstoffarmer Umgebung. Pharmakologische Ansätze, die HIF-1 α -Aktivität zu manipulieren, sind in den letzten Jahren ausgiebig im Zusammenhang mit der Tumorthherapie und Angiogenese betrachtet wurden. Das Ankurbeln des angeborenen Immunsystems, insbesondere eine gestärkte bakterizide Kapazität von Phagozyten bietet neue Herangehensweisen, therapeutische Strategien gegen Infektionskrankheiten zu entwickeln. Die Entwicklung von Pharmazeutika (HIF-1 α -Agonisten oder vHL-Antagonisten) könnte die mikrobizide Aktivität myeloischer Zellen steigern sowie eine Therapiemöglichkeit im Kampf gegen komplizierte Infektionen mit Antibiotika-resistenten Keimen, besonders bei immunsupprimierten Patienten, darstellen (Peyssonnaud et al. 2005). Zinkernagel et al. (2008) liefern den ersten Beweis, dass der HIF-1 α -Agonist Mimosine die bakterizide Wirkung von humanen Phagozyten gegen *S. aureus* erhöht. Dagegen könnte eine Herunterregulation von HIF-1 α bei bestimmten Erkrankungen wie z.B. den chronischen Entzündungen einen therapeutischen Effekt zeigen (Peyssonnaud et al. 2005).

4.6. Der antientzündliche Effekt des LPA

Die in den vorliegenden Versuchen verwendeten Maus-DCs können VEGF sekretieren, ohne dabei die Yersinien phagozytieren zu müssen. Dadurch entstand die Fragestellung, ob Yersinien lösliche Faktoren sezernieren, welche eine Bildung von VEGF induzieren. Der Fokus in dem folgenden Versuch wurde auf das LPA gelegt, welches von Yersinien sekretiert wird.

LPA stellt ein natürlich vorkommendes wasserlösliches Phospholipid dar, welches ursprünglich als ein Schlüsselmolekül in der Lipidbiosynthese identifiziert wurde (Panther et al. 2002). Als extrazellulär agierendes Signalmolekül wird es von eukaryotischen Zellen produziert und in die

Umgebung abgegeben (Moolenaar 1995) und induziert biologische Reaktionen über G-Protein-gekoppelte LPA-Rezeptoren (Yamada et al. 2005). Es stimuliert das Wachstum von Fibroblasten, Gefäßmuskelzellen, Endothelzellen sowie Keratinozyten und ist dadurch in den Prozess der Wundheilung involviert (Moolenaar 1995). Weitere wichtige biologische Funktionen, welche durch LPA beeinflusst werden, sind die Regulation der Zellproliferation, Zellmigration, Differenzierung und Suppression der Apoptose sowie die Involvierung in die Tumordinvasion und Metastasierung (Lee et al. 2006, Park et al. 2007, Rivera-Lopez et al. 2008). Lee und sein Team demonstrierten die LPA-induzierte VEGF-Sekretion via HIF-1 α -Aktivierung in verschiedenen Tumorzellen (Hepatom, Ovarial-, Prostatakarzinom). Auch in Tumorzellen des multiplen Myeloms kann LPA die mRNA-Expression von VEGF induzieren (Hu et al. 2008). Mit diesen Ergebnissen wird die kritische Rolle von HIF-1 α und VEGF in der LPA-induzierten Tumorzellproliferation und Angiogenese offenbart. Die Entdeckung und Entwicklung von LPA-Rezeptorantagonisten bietet eine neue mögliche therapeutische Strategie die Angiogenese in tumorösen Prozessen und die Tumprogression zu unterbinden.

Wiedmaier et al. (2008) präsentierten die LPA-Rezeptor-abhängige Expression von CYR61 und CT6F, Faktoren, welche eine bedeutende Rolle in der Wundheilung spielen. LPA, von *Yersinia* sekretiert, triggert die CYR61- und CT6F-Expression in Endothelzellen, welche durch Zugabe des LPA-Rezeptorinhibitors geblockt werden kann. In den in dieser Arbeit vollzogenen Experimenten wurde nun überprüft, ob LPA die Sekretion von VEGF induzieren kann. Die Versuche mit und ohne Zugabe des LPA-Rezeptorantagonisten Ki16425 ergaben vergleichbare VEGF-Konzentrationen. Es konnte kein LPA-Effekt nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu führt der Einfluss von LPA auf Mesothelzellen in der Studie von Sako et al. (2006) zu einer gesteigerten VEGF-Sekretion, welche durch Zugabe des LPA-Rezeptorinhibitors Ki16425 gehemmt werden konnte. Es müssen also andere, uns unbekannte lösliche Faktoren / Proteine von den Yersinien abgegeben werden, welche, ohne dass die Bakterien mit den DCs in direkten Kontakt treten, eine Reaktion der Zelle auslösen.

Panther et al. (2002) untersuchten in ihrer Studie den Einfluss von LPA auf DCs im Hinblick auf die Zytokinsekretion, Phagozytosefähigkeit und Expression der Oberflächenmoleküle. Reife und unreife DCs weisen LPA-Rezeptoren auf. In unreifen DCs induziert LPA die Aktinpolymerisation und Chemotaxis. Diese Funktionen gehen bei LPS-gereiften DCs unter LPA-Einfluss verloren, die IL-10-Produktion wird gefördert, die von IL-12 und TNF- α gehemmt. Weiterhin erhöht LPA die Kapazität reifer DCs die Proliferation allogenetischer naiver T-Zellen zu induzieren, während die Differenzierung und Aktivität der T₁-Helferzellen beeinträchtigt wird. Die Expression der Oberflächenmoleküle wie MHCII, CD80 oder CD86 wird durch LPA nicht beeinflusst. Durch die in reifen DCs gesteigerte Produktion von IL-10 und der reduzierten TNF- α -Sekretion wird ein antientzündlicher Effekt von LPA aufgedeckt. Wie oben schon erwähnt, aktiviert LPA G-Protein-gekoppelte Rezeptoren. Fan et al. (2008) stellten die Hypothese auf, dass LPA die LPS-induzierte inflammatorische Antwort durch Aktivierung von G-Protein gekoppelten Signaltransduktionen hemmt. Mausmakrophagen, inkubiert mit LPS und LPA wiesen eine signifikant reduzierte TNF- α -Produktion auf. Diese Entdeckung demonstriert einen antiinflammatorischen Effekt von LPA auf eine Endotoxin-induzierte systemische Entzündung und hat potentiell therapeutische Relevanz in der Behandlung der Sepsis. Die durch Panther und Fan dargestellten Veränderungen in der Zytokinproduktion (IL-10, TNF- α) und die in unseren Versuchen auch ohne LPA-Effekt ausgelöste VEGF-Sekretion, wirken sich in Wundheilungsprozessen sowie der Bekämpfung einer Entzündung vorteilhaft aus.

4.7. Die Rolle der NODs im Immunsystem

NOD1 und NOD2 sind Proteine, welche an der intrazellulären Detektion von Pathogen-assoziierten molekularen Strukturen (PAMP) beteiligt sind (Girardin et al. 2003). Einige Studien haben demonstriert, dass MDP murine und humane Makrophagen und Monozyten zur Produktion von Zytokinen und Chemokinen stimulieren kann (Wolfert et al. 2000). Zusätzlich wurde gezeigt, dass MDP zusammen mit LPS synergistisch die Produktion von inflammatorischen

Zytokinen induziert (Takada et al. 2006). Dies bestätigen auch die Ergebnisse in dieser Arbeit. Eine Kombination von LPS mit NOD-Agonisten induziert merklich die VEGF-Sekretion. Diese Daten indizieren einen eindeutigen synergistischen Effekt von TriDAP bzw. MDP und LPS in Knochenmark-DCs der Maus. Uehara et al. (2005) zeigten mit ihren Versuchen die synergistische IL-8-Sekretion, induziert durch MDP (NOD2-Agonist) oder DMP (NOD1-Agonist) in Kombination mit synthetischen TLR-Agonisten in humanen Monozyten. Diese Ergebnisse zeigen eine besondere Rolle der NODs auf. Die Kombination zweier Signalwege durch extrazelluläre TLR und intrazelluläre NODs könnte zu einer synergistischen Aktivierung des angeborenen und adaptiven Immunsystems führen.

In humanen DCs wird die synergistisch induzierte T1-Helferzellen-Antwort durch eine kombinierte Stimulation von NOD- und TLR-Agonisten ausgelöst; ebenso die IL-8-Sekretion in humanen Monozyten (Takada et al. 2006). MDP führt in humanen Monozyten über einen CD14-, TLR4- und wahrscheinlich TLR2-unabhängigen Signalweg zur IL-18-Produktion, induziert über einen synergistischen Effekt als Antwort auf verschiedene bakterielle Komponenten wie *Salmonella*-LPS oder *S. aureus*-LTA (Yang et al. 2001). Fritz et al. (2005) legten in ihrer Studie das Vermögen des NOD1-Agonisten TriDAP und des NOD2-Agonisten MDP dar, die Freisetzung von Zyto- und Chemokinen in humanen Monozyten und DCs zu induzieren. Auch eine synergistische Stimulation dieser Zellen mit LPS führte zum Teil zu gesteigerten Konzentrationen der Zyto- und Chemokine. Die Expression von NOD1/2-mRNA wies man mittels RT-PCR nach. Die simultane Inkubation von DC mit Agonisten und LPS führte, im Vergleich zur alleinigen Stimulation mit TriDAP bzw. MDP, zu einer gesteigerten Expression von MCHII und CD86 sowie einer geringfügig erhöhten Expression von CD40. Diese Ergebnis verdeutlicht die verstärkende Wirkung von NOD-Agonisten auf die DC-Reifung in Kooperation mit LPS.

Tada et al. (2005) entdeckte, dass NOD1/2-Agonisten in Kombination mit TLR3/4/9-Agonisten synergistisch die Produktion von IL-12 und IFN- γ in humanen DCs induzieren. Van Beelen et al. (2007) demonstrierte an Knochenmark-DCs der Maus, kokultiviert mit T-Helferzellen, dass MDP

zusammen mit anderen TLR-Agonisten (z.B. LPS) die IL-17-, jedoch nicht die IFN- γ -Produktion in den T-Helferzellen fördert. NOD2-defiziente murine Makrophagen und DCs weisen eine beeinträchtigte Induktion von proinflammatorischen Zytokine und Stickstoffmonoxid (NO) während einer Infektion mit *Mycobacterium tuberculosis* auf, sind jedoch nicht empfänglicher für eine Infektion im Vergleich zu Wildtyp-Zellen (Gandotra et al. 2007). NOD2 scheint *in vitro* an der Erkennung von *M. tuberculosis* durch APCs beteiligt, aber *in vivo* für die Ausbildung der Immunantwort entbehrlich zu sein.

Die Identifikation und Charakterisierung der NODs erweitert ständig das Wissen über den zellulären Mechanismus und deren Einfluss im Immunsystem. Ihre Beteiligung in der Pathogenese verschiedener genetischer Erkrankungen, wie z.B. dem Morbus Crohn indiziert, dass diese Proteine eine wichtige Rolle in der Regulation der Immunantwort sowie Entzündungsreaktion spielen. Das Verständnis intrazellulärer Signalwege und die Interaktion zwischen TLRs und NODs könnte zur Entwicklung neuer rationaler Therapiemöglichkeiten führen.

4.8. Die Auswirkung von VEGF auf die Expression costimulatorischer Moleküle auf den DCs sowie der T-Zell-Aktivierung

VEGF stellt einen Schlüsselfaktor in der Angiogenese dar. Er reguliert multiple biologische Funktionen der Endothelzellen, eingeschlossen das Zellwachstum, -migration, -überleben und die Produktion vasoaktiver Mediatoren. VEGF wird von dem meisten Tumorzellen gebildet. Eine beeinträchtigte Funktion der DCs bei der Antigenpräsentation aufgrund einer abnormalen Differenzierung stellt einen wichtigen Mechanismus von Tumoren dar, um dem Immunsystem zu entkommen. Um Behandlungsstrategien, insbesondere Immuntherapien im Kampf gegen Tumoren entwickeln zu können, ist es wichtig, den Eingriff in das Immunsystem, induziert durch VEGF, zu verstehen.

DCs spielen eine Schlüsselrolle in der Regulation der angeborenen und erworbenen Immunantwort. Nach Antigenaufnahme verwandeln sich die unreifen DCs in immunstimulatorische, reife DCs. Die DCs unterlaufen einen Reifungsprozess, der es ihnen ermöglicht, internalisierte Antigene zu

prozessieren und gemeinsam mit MHC-Molekülen zu präsentieren um eine Immunantwort zu initiieren. Dieser Reifungsprozess schließt eine Erhöhung der Expression von MHC- und costimulatorischen Molekülen genauso wie die Synthese von Zyto- und Chemokinen ein. Sie nehmen eine zentrale Rolle in der Wirtsabwehr gegen Tumoren ein. Seit es Berichte gibt, dass VEGF die funktionelle Reifung unreifer DCs inhibiert und die DC-Differenzierung beeinflusst, ist es wichtig den VEGF-induzierten Mechanismus der DC-Dysfunktion aufzuklären. Takahashi et al. (2004) demonstrierten, dass VEGF die LPS-induzierte Reifung von DCs (von humanen Blutmonozyten abgeleitet), d.h. die Hochregulation von costimulatorischen Molekülen hemmt und Apoptose induziert. Jedoch inhibiert es nicht die durch proinflammatorische Moleküle (TNF- α , IL-1 β) induzierte DC-Reifung. Dieses Resultat zeigt, dass VEGF, welches auch von vielen Tumoren produziert werden kann, die Apoptose von DCs induziert. Dies könnte dem Tumor die Möglichkeit bieten, die bedeutende Schnittstelle zwischen angeborenem und adaptiven Immunsystem, nämlich die DCs, auszuschalten. Dikov et al. (2004) beschrieben in ihrer Studie, dass der VEGF-Rezeptor 1 den primären Mediator in der durch VEGF gehemmten DC-Reifung sowie T-Zellstimulation darstellt. Die Zugabe von exogenem VEGF führte im Vergleich zur Mediumkontrolle zu einer reduzierten Expression von CD11c, CD40, CD86 und MHCII in von embryonalen Stammzellen abgeleiteten Maus-DCs. Eine Blockade von VEGF oder VEGF-Rezeptoren durch Antikörper konnte die beeinträchtigte Funktion der DCs wieder herstellen. Diese Aussagen können mit den Ergebnissen in dieser Arbeit nicht bestätigt werden. Die Modulation der Versuche mit rmVEGF sowie Anti-VEGF führen zu keiner signifikanten Veränderung der Expression costimulatorischer Moleküle. Mögliche Gründe dafür könnten die Verwendung von DCs unterschiedlicher Herkunft, der Einsatz verschiedener rmVEGF sowie verschiedene Protokolle zur DC-Anzucht/Verarbeitung und FACS-Färbung sein.

Eine erfolgreiche Tumor-Immunotherapie hängt von der unbeeinträchtigten Funktion der DCs ab, beispielsweise der Stimulation der T-Zellen durch DCs. Laxmanan et al. (2005) stellten eine durch VEGF beeinträchtigte Aktivierung von T-Zellen durch Knochenmark-DCs der Maus, jedoch keine Unterschiede in

der Expression von DC-Markern wie CD80, CD86 und MHCII in An- oder Abwesenheit von VEGF dar. Jedoch besteht laut Laxmanan die Möglichkeit der abnormen oder defizienten Antigenprozessierung durch DCs unter dem Einfluss von VEGF. Ähnliche Ergebnisse lieferten Mimura und sein Team 2007. DCs (aus humanen Monozyten abgeleitet), welche nach LPS-Infektion eine erhöhte Expression von CD80, CD83, CD86 und MHCII aufwiesen, zeigten nach einer VEGF-Behandlung keine Veränderung in ihrem Phänotyp. Allerdings führte VEGF auch in dieser Studie zu einer beeinträchtigten Fähigkeit der DCs T-Zellen zu stimulieren, wobei die VEGF-induzierte DC-Dysfunktion über den VEGF-Rezeptor 2 vermittelt wird. Es wäre also auch interessant zu untersuchen, welche VEGF-Rezeptoren die verwendeten DCs in dieser Arbeit exprimieren und ob VEGF einen Einfluss auf die T-Zell-Aktivierung/Proliferation ausübt. Dies könnte man im Rahmen einer FACS-Analyse (VEGF-Rezeptoren, Proliferationsassay) ermitteln. In einer Studie von Erfurth et al. (2004) wird demonstriert, dass *Y. enterocolitica* in der Lage ist, die T-Zell-Aktivierung zu beeinträchtigen. Erfurth und ihr Team analysierten die T-Zell-Aktivierung und die Expression von Oberflächenmolekülen nach der Infektion von DCs aus dem Knochenmark der Maus mit *Y. enterocolitica*-Stämmen (*Ye pYV+*, *Ye pYV-*). Nach der Inkubation der DCs mit LPS, *Ye pYV-* und *Ye pYV+* zeigte sich die Expression von MHCII im Vergleich zu unbehandelten Zellen merklich erhöht. CD86 und CD80 wurden nach Infektion der DCs mit *Ye pYV-* verstärkt exprimiert, während bei *Ye pYV+* keine Steigerung der Expression zu beobachten war. Dieses Ergebnis zeigt, dass der Wildtyp-Stamm die Reifung von DCs unterdrückt. Die T-Zell-Proliferation wurde vollständig gehemmt, nachdem DCs mit dem Wildtyp-Stamm *Ye pYV+* infiziert waren, während eine T-Zell-Proliferation nach Inkubation mit *Ye pYV-* zu beobachten war. Diese Daten legen nahe, dass Genprodukte, welche auf dem Virulenzplasmid kodiert sind, die DC-Funktion und somit auch die T-Zell-Proliferation beeinflussen. Das Erkennen von Zellwandkomponenten von Gram-positiven und Gram-negativen Bakterien sowie die durch TLR-Interaktion induzierte Reifung der DCs ist wichtig für die Aktivierung des angeborenen und erworbenen Immunsystems. Die in der Studie von De Trez et al. (2005) untersuchte *E.coli-*

induzierte DC-Reifung ist abhängig von TLR2, TLR4 und Trif, aber nicht von MyD88. Die in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse zeigen aber auf, dass in TLR2^{-/-}x4^{-/-}-DCs die *Y. enterocolitica*- sowie *E.coli*-induzierten Expression der Oberflächenmarker CD40 und CD86 gegenüber der Mediumkontrolle erhöht, nach Inkubation mit LPS unverändert, vorliegen. Dies deutet darauf hin, dass die Expression costimulatorischer Moleküle durch Gram-negative Bakterien wie Yersinien TLR2 und 4-unabhängig ausgelöst wird. Michelsen et al. (2001) legten ihren Fokus ebenfalls auf den Einfluss von TLRs und ihren Liganden auf die DC-Reifung. Die Stimulation von TLR4-defizienten Maus-DCs mit dem TLR4-Liganden LPS resultierte in einer beeinträchtigten Hochregulation von MHCII, im Vergleich zu den Wildtyp-DCs. Dagegen war die Expression von CD86 und MHCII in TLR2-defizienten nach Infektion mit LPS nicht beeinflusst; jedoch nach Behandlung mit *Staphylococcus aureus*-Lipoteichonsäure gemindert. Die LPS-induzierte DC-Reifung wird in diesen Versuchen über den TLR4 initiiert. Somit wären TLR4-defiziente DCs in ihrer Antigenpräsentation stark eingeschränkt, wenn sie mit dem entsprechenden Liganden nicht in Kontakt treten können. Die Expression von MHCII in dieser Arbeit ist in den LPS-infizierten TLR2^{-/-}x4^{-/-}-DCs auch im Vergleich zur Mediumkontrolle nicht signifikant hochreguliert. Dagegen zeigt sie bei LPS-behandelten Wildtyp-DCs eine verminderte Expression von MHCII. Dieser Befund passt nicht zu den in der Literatur angegebenen Daten. LPS müsste in Wildtyp-DCs die Expression von MHCII induzieren. Möglicherweise sind die in dieser Arbeit verwendeten DCs durch ihre Vorbehandlung (Mediumwechsel, Versuchsablauf) schon so aktiviert, dass die ohnehin erhöhte basale Expression von MHCII durch weitere Anregung, wie z.B. bakterielle Stimuli, nicht mehr angekurbelt werden kann.

In entzündlichen Geweben, in denen DCs aktiviert werden, herrscht gewöhnlich ein niedriger O₂-Gehalt. Jantsch und sein Team (2008) beschäftigten sich mit der Fragestellung, welchen Effekt die Hypoxie und HIF-1 α auf die Aktivierung und Funktion Knochenmark-DCs der Maus in An- und Abwesenheit eines entzündlichen Stimulus haben. Überraschenderweise aktiviert Hypoxie allein, also ohne ein weiteres entzündliches Signal oder der Anwesenheit von Pathogenen DCs nicht. Sie bilden eine sogenannte Selbsttoleranz aus. In

ischämischen Geweben, z.B. einem Infarkt, sind die DCs häufig mit hypoxischen Bedingungen konfrontiert. Dies könnte dem Schutz vor unkontrollierten Autoimmunreaktionen dienen. Jedoch führt Hypoxie kombiniert mit LPS zu einer signifikant gesteigerten Expression costimulatorischer Moleküle, Sekretion proinflammatorischer Moleküle und Induktion der T-Zell-Proliferation. Der synergistische Effekt von LPS und Hypoxie resultiert in einer anhaltenden Aktivierung der DCs sowie gesteigerten Immunantwort. Ein Knockout von HIF-1 α hemmt deutlich die Glucoseverwertung der DCs, die DC-Reifung und beeinträchtigt die Fähigkeit der DCs T-Zellen zu stimulieren. HIF-1 α und Hypoxie spielen eine bedeutende Rolle im Rahmen der DC-Aktivierung während eines entzündlichen Geschehens. Mancino et al. (2008) zeigten dagegen in ihren Versuchen, dass Hypoxie die Expression von Reifungsmarkern in LPS-infizierten humanen DCs signifikant hemmt und die T-Zell-Proliferation senkt. Im Gegensatz dazu fällt eine stark erhöhte Sekretion proinflammatorischer Zytokine auf, welche durch die autokrine Hypoxie-induzierte VEGF-Sekretion der DCs moduliert und durch Zugabe von Anti-VEGF reduziert wird. Diese Ergebnisse indizieren, dass Hypoxie die Funktion unreifer DCs fördert, aber auch durch die gesteigerte Produktion proinflammatorischer Zytokine die lokale Entzündung sowie die antibakterielle Aktivität weiterer Zellpopulationen verstärkt, um die Progression der Erkrankung zu verhindern. Es ist denkbar, dass die DCs durch diese funktionelle Entkopplung zur Homöostase der einerseits gesteigerten Zytokinproduktion und andererseits verminderten DC-Reifung unter hypoxischen Bedingungen im Gewebe beitragen und eine Autoimmunität verhindern.

5. Zusammenfassung

DCs sind die aktivsten professionellen Antigen-präsentierenden Zellen. Sie fungieren im Rahmen einer Immunantwort als hauptsächliche Vermittler der Aktivierung naiver T-Zellen. Damit stellen sie das zentrale Bindeglied zwischen angeborener und adaptiver Immunität dar. Myeloische Zellen erwartet oft im Rahmen einer Entzündung in den infizierten Geweben ein Milieu mit reduziertem Sauerstoffgehalt. Um sich an diese Bedingungen adaptieren zu können, haben sie eine Überlebensstrategie entwickelt, welche die Beteiligung von HIF-1 α erfordert. HIF-1 α ist ein Transkriptionsfaktor, welcher unter hypoxischen Bedingungen in vielen Geweben induziert wird und die Aktivierung verschiedenster Gene reguliert, unter ihnen die Gene für VEGF. Es ist bekannt, dass dieser Signalweg auch unter normalen Sauerstoffpartialdruck durch bakterielle Bestandteile aktiviert wird. Ziel dieser Arbeit war zum einen die Untersuchung, welche Rolle die TLR 2 und 4 sowie die Adaptermoleküle MyD88 und Trif im Rahmen einer Infektion von DCs mit *Y. enterocolitica* für die Aktivierung von HIF-1 α und VEGF spielen. Hierzu wurden Wildtyp-DCs sowie DCs defizient an TLR 2 und 4, MyD88 und Trif aus dem Knochenmark einer Maus isoliert, entsprechend mit *Y. enterocolitica* oder LPS infiziert und mittels ELISA das Zytokin VEGF quantifiziert bzw. unter Verwendung des Westernblots HIF-1 α identifiziert. An der intrazellulären Detektion von Pathogen-assoziierten molekularen Strukturen sind Proteine wie NOD1 und NOD2 beteiligt. Um eine mRNA-Expression der NOD-Proteine überprüfen zu können, wurde zunächst die mRNA aus den Wildtyp-DCs isoliert, quantifiziert, mittels RT-PCR in cDNA umgeschrieben und im Anschluss die Identifizierung mit einer PCR durchgeführt. Durch synergistische Stimulation der Wildtyp-DCs mit LPS und NOD-Agonisten wurde unter Verwendung des VEGF-ELISA die Induktion VEGF-Sekretion analysiert. Durch Modifikation weiterer Versuche unter Einsatz verschiedener Inhibitoren gegen MAPK-, PI3K- sowie Rho GTPasen konnten die an der Signaltransduktion beteiligten Kinasen und GTPasen ermittelt werden. Zum anderen wurde mit Hilfe des Invasions-Assays und VEGF-ELISA analysiert, ob die Phagozytose von *Y. enterocolitica* durch DCs den Trigger für die Ausschüttung von VEGF darstellt. Können Yersinien ohne direkten Kontakt

zu DCs VEGF induzieren, indem sie bestimmte lösliche Faktoren produzieren, welche eine VEGF-Sekretion auslösen? Diese Fragestellung wurde in einem Transwell-Assay untersucht. VEGF stellt einen Schlüsselfaktor in der Angiogenese dar. Er reguliert multiple biologische Funktionen der Endothelzellen, eingeschlossen das Zellwachstum, -migration, -überleben und die Produktion vasoaktiver Mediatoren. VEGF wird von dem meisten Tumorzellen gebildet. Eine beeinträchtigte Funktion der DCs durch den Einfluss von VEGF bei der Antigenpräsentation aufgrund einer abnormalen Differenzierung stellt einen wichtigen Mechanismus von Tumoren dar, um dem Immunsystem zu entkommen. Um die Differenzierung der in dieser Arbeit verwendeten DCs zu überprüfen, wurde mittels Durchflusszytometrie der Einfluss von VEGF während der Infektion von DCs mit *Y. enterocolitica* auf die Oberflächenexpression costimulatorischer Moleküle wie MHCII, CD40 und CD86 analysiert.

Folgende Ergebnisse wurden im Rahmen dieser Arbeit erzielt:

1. LPS induziert die HIF-1 α Aktivierung und die nachfolgende VEGF Sekretion in DCs der Maus über einen TLR-abhängigen Weg.
2. *Y. enterocolitica* induziert die HIF-1 α Aktivierung und die nachfolgende VEGF-Sekretion in DCs der Maus über einen TLR-unabhängigen Weg.
3. *Y. enterocolitica* induziert VEGF in MyD88^{-/-}-DCs MyD88-unabhängig/Trif-abhängig und in Trif^{-/-}-DCs Trif-unabhängig/MyD88-abhängig.
4. Die VEGF-Sekretion in *Y. enterocolitica* infizierten DCs ist abhängig von MAPK (p38, JNKII), PI3K und Rho GTPasen.
5. Die Induktion von VEGF wird nicht durch Zytokine wie TNF- α oder IL-1 β vermittelt.
6. Ein oberflächlicher Kontakt der Yersinien mit DCs reicht aus, um die Sekretion von VEGF aktivieren zu können. Eine Phagozytose ist zur Induktion nicht notwendig.
7. Yersinien können auch ohne direkten Kontakt mit DCs VEGF induzieren. Ein LPA-Effekt ist aber nicht nachzuweisen.

8. Die Inkubation von DCs mit LPS und NOD-Agonisten (MDP, TriDAP) führt zu einer synergistischen Aktivierung der VEGF-Sekretion.
9. VEGF beeinflusst nicht die Expression costimulatorischer Moleküle (MHCII, CD40, CD86) auf den DCs.

HIF-1 α sowie VEGF finden in den letzten Jahren immer mehr Beachtung, da sie in verschiedenen Bereichen, wie z.B. der Tumor- und Infektionsbiologie, des Zellmetabolismus sowie -wachstums, der Adhäsion und der Angiogenese eine tragende Rolle spielen. Obwohl die Aktivierung von HIF-1 α während eines entzündlichen Geschehens wünschenswert ist, stellt die Suppression von HIF-1 α einen förderlichen Effekt dar, um Tumorangiogenese und -zelladaption an die hypoxische Bedingungen zu unterdrücken. Unser zunehmendes Verständnis der Signal- und Stoffwechselwege, welche in die Regulation der Zytokinproduktion sowie in das Signaling der Immunzellen involviert sind, öffnet eine Tür für die Entdeckung neuer Therapiemöglichkeiten zur Behandlung einer Vielzahl entzündlicher Erkrankungen.

6. Abkürzungsverzeichnis

Abb	Abbildung
APC	antigen presenting cells
ARNT	aryl hydrocarbon nuclear receptor
ATP	Adenosintriphosphat
bHLH	basic helix-loop-helix
cDNA	complementary DNA
CFU	colony forming unit
DCs	dendritic cells
DFO	Desferrioxamin
DNA	deoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
EGF	epidermal growth factor
Flk	fetal liver kinase
Flt	fms-like-tyrosine
GDP	Guanosindiphosphat
GM-CSF	granulocyt-macrophage colony stimulating factor
GTP	Guanosintriphosphat
HIF	hypoxia-inducible factor
HPC	hämatopoetische Stammzelle
HRE	hypoxia response element
IE-DAP	χ -D-Glutamyl-meso-diaminopimelinsäure
IFN	Interferon
IGF2	insulin-like growth factor
IL	Interleukin
inv	Invasin
JNK	Jun amino-terminal kinase
KDR	kinase domain region
LBP	LPS-bindendes Plasmaprotein
LPA	Lysophosphatidylsäure
LPS	Lipopolysaccharid
LRR	leucine-rich repeat

MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MH	Müller-Hinton
MHC	major histocompatibility complex
MOI	multiplicity of infection
MPD	Muramyl-dipeptid
mRNA	messenger ribonucleic acid
MRSA	Methicillin-resistenter <i>Staphylococcus aureus</i>
MyD88	myeloid differentiation primary response gene 88
NF- κ B	nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells
NLR	Nod-like receptor
NOD	nucleotide-binding oligomerization domain
O ₂	Sauerstoff
ODD-Domäne	oxygen-dependent degradation domain
PAMP	pathogen-associated molecular patterns
PAS	Per-AHR-ARNT-Sim
PHD	prolyl hydroxylase domain containing protein
PI3K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PIGF	placenta growth factor
PMN	polymorphkernige Neutrophile
PP	Peyer'sche Plaques
PRR	pattern recognition receptor
PTA	perkutane transluminale Angioplastie
pVHL	von Hippel-Lindau Tumorsuppressor Protein
pYV	Yersinia Virulenzplasmid
rm	rekombinant mouse
SARM	sterile-alpha and armadillo motif containing protein
siRNA	small interfering RNA
Tab	Tabelle
TCR	T-Zell-Rezeptor
TGF	transforming growth factor

TIRAP	toll-interleukin 1 receptor (TIR) domain containing adaptor protein
TLR	Toll-like Rezeptor
TNF	Tumornekrosefaktor
TRAM	Toll-IL-1-resistance domain-containing-inducing-interferon β -related adaptor molecule
Trif	TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- β
VEGF	vascular endothelial growth factor
VPF	vascular permeability factor
Ye	<i>Yersinia enterocolitica</i>

7. Literaturverzeichnis

Paper:

Adams S, O'Neill DW, Bhardwaj N. 2005. Recent advances in dendritic cell biology. *J Clin Immunol.* 25(3):177-88.

Adkins I, Köberle M, Gröbner S, Autenrieth SE, Bohn E, Borgmann S, Autenrieth IB. 2008. *Y. enterocolitica* inhibits antigen degradation in dendritic cells. *Microbes Infect.* 10(7):798-806.

Adkins I, Köberle M, Gröbner S, Bohn E, Autenrieth IB, Borgmann S. 2007. *Yersinia* outer proteins E, H, P, and T differentially target the cytoskeleton and inhibit phagocytic capacity of dendritic cells. *Int J Med Microbiol.* 297(4):235-44.

Agrawal A, Agrawal S, Cao JN, Su H, Osann K, Gupta S. 2007. Altered innate immune functioning of dendritic cells in elderly humans: a role of phosphoinositide 3-kinase-signaling pathway. *J Immunol.* 178(11):6912-22

Agrawal S, Agrawal A, Doughty B, Gerwitz A, Blenis J, Van Dyke T, Pulendran B. 2003. Cutting edge: different Toll-like receptor agonists instruct dendritic cells to induce distinct Th responses via differential modulation of extracellular signal-regulated kinase-mitogen-activated protein kinase and c-Fos. *J Immunol.* 171(10):4984-9.

Akira S, Hoshino K, Kaisho T. 2000. The role of Toll-like receptors and MyD88 in innate immune responses. *J Endotoxin Res.* 6(5):383-7.

Akira S, Takeda K. 2004. Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol.* 4(7):499-511.

Albina JE, Mastrofrancesco B, Vessella JA, Louis CA, Henry WL Jr, Reichner JS. 2001. HIF-1 expression in healing wounds: HIF-1alpha induction in primary inflammatory cells by TNF-alpha. *Am J Physiol Cell Physiol.* 281(6):C1971-7.

Araki N, Johnson MT, Swanson JA. 1996. A role for phosphoinositide 3-kinase in the completion of macropinocytosis and phagocytosis by macrophages. *J Cell Biol.* 135(5):1249-60.

Arbibe L, Mira JP, Teusch N, Kline L, Guha M, Mackman N, Godowski PJ, Ulevitch RJ, Knaus UG. 2000. Toll-like receptor 2-mediated NF-kappa B activation requires a Rac1-dependent pathway. *Nat Immunol.* 1(6):533-40.

Autenrieth IB, Hantschmann P, Heymer B, Heesemann J. 1993. Immunohistological characterization of the cellular immune response against *Yersinia enterocolitica* in mice: evidence for the involvement of T lymphocytes. *Immunobiology*. 187(1-2):1-16.

Banchereau J, Briere F, Caux C, Davoust J, Lebecque S, Liu YJ, Pulendran B, Palucka K. 2000. Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol*. 18:767-811.

Banchereau J, Steinman RM. 1998. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature*. 392(6673):245-52.

Barakat MR, Kaiser PK. 2009. VEGF inhibitors for the treatment of neovascular age-related macular degeneration. *Expert Opin Investig Drugs*. 18(5):637-46.

Bishop AL, Hall A. 2000. Rho GTPases and their effector proteins. *Biochem J*. 348 Pt 2:241-55.

Björkbacka H, Fitzgerald KA, Huet F, Li X, Gregory JA, Lee MA, Ordija CM, Dowley NE, Golenbock DT, Freeman MW. 2004. The induction of macrophage gene expression by LPS predominantly utilizes Myd88-independent signaling cascades. *Physiol Genomics*. 19(3):319-30.

Blancher C, Moore JW, Robertson N, Harris AL. 2001. Effects of ras and von Hippel-Lindau (VHL) gene mutations on hypoxia-inducible factor (HIF)-1alpha, HIF-2alpha, and vascular endothelial growth factor expression and their regulation by the phosphatidylinositol 3'-kinase/Akt signaling pathway. *Cancer Res*. 61(19):7349-55.

Blouin CC, Pagé EL, Soucy GM, Richard DE. 2004. Hypoxic gene activation by lipopolysaccharide in macrophages: implication of hypoxia-inducible factor 1alpha. *Blood*. 103(3):1124-30.

Bottone EJ. 1997. *Yersinia enterocolitica*: the charisma continues. *Clin Microbiol Rev*. 10(2):257-76.

Caparrós E, Munoz P, Sierra-Filardi E, Serrano-Gómez D, Puig-Kröger A, Rodríguez-Fernández JL, Mellado M, Sancho J, Zubiaur M, Corbí AL. 2006. DC-SIGN ligation on dendritic cells results in ERK and PI3K activation and modulates cytokine production. *Blood*. 107(10):3950-8.

Carty M, Goodbody R, Schröder M, Stack J, Moynagh PN, Bowie AG. 2006. The human adaptor SARM negatively regulates adaptor protein TRIF-dependent Toll-like receptor signaling. *Nat Immunol*. 7(10):1074-81.

Chamaillard M, Inohara N, Nuñez G. 2004. Battling enteroinvasive bacteria: Nod1 comes to the rescue. *Trends Microbiol.* 12(12):529-32.

Chang L, Karin M. 2001. Mammalian MAP kinase signalling cascades. *Nature.* 410(6824):37-40.

Chen L, Hamrah P, Cursiefen C, Zhang Q, Pytowski B, Streilein JW, Dana MR. 2004. Vascular endothelial growth factor receptor-3 mediates induction of corneal alloimmunity. *Ocul Immunol Inflamm.* 15(3):275-8.

Cook DN, Pisetsky DS, Schwartz DA. 2004. Toll-like receptors in the pathogenesis of human disease. *Nat Immunol.* 5(10):975-9.

Cornelis GR, Boland A, Boyd AP, Geuijen C, Iriarte M, Neyt C, Sory MP, Stainier I. 1998. The virulence plasmid of *Yersinia*, an antihost genome. *Microbiol Mol Biol Rev.* 62(4):1315-52.

Cramer T, Johnson RS. 2003. A novel role for the hypoxia inducible transcription factor HIF-1alpha: critical regulation of inflammatory cell function. *Cell Cycle.* 2(3):192-3.

Cramer T, Yamanishi Y, Clausen BE, Förster I, Pawlinski R, Mackman N, Haase VH, Jaenisch R, Corr M, Nizet V, Firestein GS, Gerber HP, Ferrara N, Johnson RS. 2003. HIF-1alpha is essential for myeloid cell-mediated inflammation. *Cell.* 112(5):645-57.

Cumberbatch M, Dearman RJ, Kimber I. 1997a. Interleukin 1 beta and the stimulation of Langerhans cell migration: comparisons with tumour necrosis factor alpha. *Arch Dermatol Res.* 289(5):277-84.

Cumberbatch M, Dearman RJ, Kimber I. 1997b. Langerhans cells require signals from both tumour necrosis factor-alpha and interleukin-1 beta for migration. *Immunology.* 92(3):388-95.

da Silva Correia J, Miranda Y, Austin-Brown N, Hsu J, Mathison J, Xiang R, Zhou H, Li Q, Han J, Ulevitch RJ. 2006. Nod1-dependent control of tumor growth. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 103(6):1840-5.

De Trez C, Pajak B, Brait M, Glaichenhaus N, Urbain J, Moser M, Lauvau G, Muraille E. 2005. TLR4 and Toll-IL-1 receptor domain-containing adapter-inducing IFN-beta, but not MyD88, regulate *Escherichia coli*-induced dendritic cell maturation and apoptosis in vivo. *J Immunol.* 175(2):839-46.

Déry MA, Michaud MD, Richard DE. 2005. Hypoxia-inducible factor 1: regulation by hypoxic and non-hypoxic activators. *Int J Biochem Cell Biol.* 37(3):535-40.

Dikov MM, Ohm JE, Ray N, Tchekneva EE, Burlison J, Moghanaki D, Nadaf S, Carbone DP. 2005. Differential roles of vascular endothelial growth factor receptors 1 and 2 in dendritic cell differentiation. *J Immunol.* 174(1):215-22.

Dillon S, Agrawal A, Van Dyke T, Landreth G, McCauley L, Koh A, Maliszewski C, Akira S, Pulendran B. 2004. 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.* 172(8):4733-43.

Doronzo G, Russo I, Mattiello L, Riganti C, Anfossi G, Trovati M. 2006. Insulin activates hypoxia-inducible factor-1alpha in human and rat vascular smooth muscle cells via phosphatidylinositol-3 kinase and mitogen-activated protein kinase pathways: impairment in insulin resistance owing to defects in insulin signalling. *Diabetologia.* 49(5):1049-63.

Efron P, Moldawer LL. 2003. Sepsis and the dendritic cell. *Shock.* 20(5):386-401.

El Awad B, Kreft B, Wolber EM, Hellwig-Bürgel T, Metzen E, Fandrey J, Jelkmann W. 2000. Hypoxia and interleukin-1beta stimulate vascular endothelial growth factor production in human proximal tubular cells. *Kidney Int.* 58(1):43-50.

Endo D, Gon Y, Nunomura S, Yamashita K, Hashimoto S, Ra C. 2009. PI3Kgamma differentially regulates FcepsilonRI-mediated degranulation and migration of mast cells by and toward antigen. *Int Arch Allergy Immunol.* 149 Suppl 1:66-72.

Endo D, Gon Y, Nunomura S, Yamashita K, Hashimoto S, Ra C. 2009. PI3Kgamma differentially regulates FcepsilonRI-mediated degranulation and migration of mast cells by and toward antigen. *Int Arch Allergy Immunol.* 149 Suppl 1:66-72.

Erfurth SE, Gröbner S, Kramer U, Gunst DS, Soldanova I, Schaller M, Autenrieth IB, Borgmann S. 2004. *Yersinia enterocolitica* induces apoptosis and inhibits surface molecule expression and cytokine production in murine dendritic cells. *Infect Immun.* 72(12):7045-54

Ferrara N, Davis-Smyth T. 1997. The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocr Rev.* 18(1):4-25.

Fitzgerald KA, Rowe DC, Barnes BJ, Caffrey DR, Visintin A, Latz E, Monks B, Pitha PM, Golenbock DT. 2003. LPS-TLR4 signaling to IRF-3/7 and NF-kappaB involves the toll adapters TRAM and TRIF. *J Exp Med.* 198(7):1043-55.

Frantz S, Vincent KA, Feron O, Kelly RA. 2005. Innate immunity and angiogenesis. *Circ Res.* 96(1):15-26.

Frede S, Stockmann C, Freitag P, Fandrey J. 2006. Bacterial lipopolysaccharide induces HIF-1 activation in human monocytes via p44/42 MAPK and NF-kappaB. *Biochem J.* 396(3):517-27.

Fricke I, Mirza N, Dupont J, Lockhart C, Jackson A, Lee JH, Sosman JA, Gabrilovich DI. 2007. Vascular endothelial growth factor-trap overcomes defects in dendritic cell differentiation but does not improve antigen-specific immune responses. *Clin Cancer Res.* 13(16):4840-8

Fritz JH, Ferrero RL, Philpott DJ, Girardin SE. 2006. Nod-like proteins in immunity, inflammation and disease. *Nat Immunol.* 7(12):1250-7.

Fritz JH, Girardin SE, Fitting C, Werts C, Mengin-Lecreulx D, Caroff M, Cavaillon JM, Philpott DJ, Adib-Conquy M. 2005. Synergistic stimulation of human monocytes and dendritic cells by Toll-like receptor 4 and NOD1- and NOD2-activating agonists. *Eur J Immunol.* 35(8):2459-70.

Gabrilovich DI, Chen HL, Girgis KR, Cunningham HT, Meny GM, Nadaf S, Kavanaugh D, Carbone DP. 1996. Production of vascular endothelial growth factor by human tumors inhibits the functional maturation of dendritic cells. *Nat Med.* 2(10):1096-103.

Gandotra S, Jang S, Murray PJ, Salgame P, Ehrh S. 2007. Nucleotide-binding oligomerization domain protein 2-deficient mice control infection with *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun.* 75(11):5127-34.

Girardin SE, Boneca IG, Carneiro LA, Antignac A, Jéhanho M, Viala J, Tedin K, Taha MK, Labigne A, Zähringer U, Coyle AJ, DiStefano PS, Bertin J, Sansonetti PJ, Philpott DJ. 2003. Nod1 detects a unique muropeptide from gram-negative bacterial peptidoglycan. *Science.* 300(5625):1584-7.

Girardin SE, Boneca IG, Viala J, Chamaillard M, Labigne A, Thomas G, Philpott DJ, Sansonetti PJ. 2003. Nod2 is a general sensor of peptidoglycan through muramyl dipeptide (MDP) detection. *J Biol Chem.* 278(11):8869-72.

Girardin SE, Tournebize R, Mavris M, Page AL, Li X, Stark GR, Bertin J, DiStefano PS, Yaniv M, Sansonetti PJ, Philpott DJ. 2001. CARD4/Nod1 mediates NF-kappaB and JNK activation by invasive *Shigella flexneri*. *EMBO Rep.* 2(8):736-42.

Girardin SE, Travassos LH, Hervé M, Blanot D, Boneca IG, Philpott DJ, Sansonetti PJ, Mengin-Lecreulx D. 2003. Peptidoglycan molecular requirements allowing detection by Nod1 and Nod2. *J Biol Chem.* 278(43):41702-8.

Granucci F, Ferrero E, Foti M, Aggujaro D, Vettoretto K, Ricciardi-Castagnoli P. 1999. Early events in dendritic cell maturation induced by LPS. *Microbes Infect.* 1(13):1079-84.

Grassl GA, Kracht M, Wiedemann A, Hoffmann E, Aepfelbacher M, von Eichel-Streiber C, Bohn E, Autenrieth IB. 2003. Activation of NF-kappaB and IL-8 by *Yersinia enterocolitica* invasin protein is conferred by engagement of Rac1 and MAP kinase cascades. *Cell Microbiol.* 5(12):957-71.

Haddad EB, Birrell M, McCluskie K, Ling A, Webber SE, Foster ML, Belvisi MG. 2001. Role of p38 MAP kinase in LPS-induced airway inflammation in the rat. *Br J Pharmacol.* 132(8):1715-24.

Heine H, Kirschning CJ, Lien E, Monks BG, Rothe M, Golenbock DT. 1999. Cutting edge: cells that carry a null allele for toll-like receptor 2 are capable of responding to endotoxin. *J Immunol.* 162(12):6971-5.

Hellwig-Bürgel T, Rutkowski K, Metzen E, Fandrey J, Jelkmann W. 1999. Interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha stimulate DNA binding of hypoxia-inducible factor-1. *Blood.* 94(5):1561-7.

Hellwig-Bürgel T, Stiehl DP, Katschinski DM, Marxsen J, Kreft B, Jelkmann W. 2005. VEGF production by primary human renal proximal tubular cells: requirement of HIF-1, PI3-kinase and MAPKK-1 signaling. *Cell Physiol Biochem.* 15(1-4):99-108.

Hellwig-Bürgel T, Stiehl DP, Wagner AE, Metzen E, Jelkmann W. 2005. Review: hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1): a novel transcription factor in immune reactions. *J Interferon Cytokine Res.* 25(6):297-310.

Hoebe K, Du X, Georgel P, Janssen E, Tabet K, Kim SO, Goode J, Lin P, Mann N, Mudd S, Crozat K, Sovath S, Han J, Beutler B. 2003. Identification of Lps2 as a key transducer of MyD88-independent TIR signalling. *Nature.* 424(6950):743-8.

Hoshino K, Takeuchi O, Kawai T, Sanjo H, Ogawa T, Takeda Y, Takeda K, Akira S. 1999. Cutting edge: Toll-like receptor 4 (TLR4)-deficient mice are hyporesponsive to lipopolysaccharide: evidence for TLR4 as the Lps gene product. *J Immunol.* 162(7):3749-52.

Hu X, Mendoza FJ, Sun J, Banerji V, Johnston JB, Gibson SB. 2008. Lysophosphatidic acid (LPA) induces the expression of VEGF leading to protection against apoptosis in B-cell derived malignancies. *Cell Signal.* 20(6):1198-208.

Inohara N, Nuñez G. 2003. NODs: intracellular proteins involved in inflammation and apoptosis. *Nat Rev Immunol.* 3(5):371-82.

Isberg RR, Leong JM. 1990. Multiple beta 1 chain integrins are receptors for invasins, a protein that promotes bacterial penetration into mammalian cells. *Cell.* 60:861-871.

Jantsch J, Chakravorty D, Turza N, Prechtel AT, Buchholz B, Gerlach RG, Volke M, Gläsner J, Warnecke C, Wiesener MS, Eckardt KU, Steinkasserer A, Hensel M, Willam C. 2008. Hypoxia and hypoxia-inducible factor-1 alpha modulate lipopolysaccharide-induced dendritic cell activation and function. *J Immunol.* 180(7):4697-705.

Jung YJ, Isaacs JS, Lee S, Trepel J, Liu ZG, Neckers L. 2003. Hypoxia-inducible factor induction by tumour necrosis factor in normoxic cells requires receptor-interacting protein-dependent nuclear factor kappa B activation. *Biochem J.* 370(Pt 3):1011-7.

Jung YJ, Isaacs JS, Lee S, Trepel J, Neckers L. 2003. IL-1beta-mediated up-regulation of HIF-1alpha via an NFkappaB/COX-2 pathway identifies HIF-1 as a critical link between inflammation and oncogenesis. *FASEB J.* 17(14):2115-7.

Kaisho T, Akira S. 2001. Dendritic-cell function in Toll-like receptor- and MyD88-knockout mice. *Trends Immunol.* 22(2):78-83.

Kaisho T, Akira S. 2006. Toll-like receptor function and signaling. *J Allergy Clin Immunol.* 117(5):979-87.

Kaisho T, Hoshino K, Iwabe T, Takeuchi O, Yasui T, Akira S. 2002. Endotoxin can induce MyD88-deficient dendritic cells to support T(h)2 cell differentiation. *Int Immunol.* 14(7):695-700.

Kaisho T, Takeuchi O, Kawai T, Hoshino K, Akira S. 2001. Endotoxin-induced maturation of MyD88-deficient dendritic cells. *J Immunol.* 166(9):5688-94.

Kawai T, Adachi O, Ogawa T, Takeda K, Akira S. 1999. Unresponsiveness of MyD88-deficient mice to endotoxin. *Immunity*. 11(1):115-22.

Kawai T, Akira S. 2007. TLR signaling. *Semin Immunol*. 19(1):24-32.

Kawai T, Takeuchi O, Fujita T, Inoue J, Mühlradt PF, Sato S, Hoshino K, Akira S. 2001. Lipopolysaccharide stimulates the MyD88-independent pathway and results in activation of IFN-regulatory factor 3 and the expression of a subset of lipopolysaccharide-inducible genes. *J Immunol*. 167(10):5887-94.

Ke Q, Costa M. 2006. Hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1). *Mol Pharmacol*. 70(5):1469-80.

Kempf VA, Lebedziejewski M, Alitalo K, Wälzlein JH, Eehalt U, Fiebig J, Huber S, Schütt B, Sander CA, Müller S, Grassl G, Yazdi AS, Brehm B, Autenrieth IB. 2005. Activation of hypoxia-inducible factor-1 in bacillary angiomatosis: evidence for a role of hypoxia-inducible factor-1 in bacterial infections. *Circulation*. 111(8):1054-62.

Knapp W, Lysy J, Knapp C, Stille W, Goll U. 1973. Enterale Infektionen beim Menschen durch *Yersinia enterocolitica* und ihre Diagnose. *Infection*. 1:113-125.

Kolch W. 2005. Coordinating ERK/MAPK signalling through scaffolds and inhibitors. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 6(11):827-37.

Koyasu S. 2003. The role of PI3K in immune cells. *Nat Immunol*. 4(4):313-9.

Laughner E, Taghavi P, Chiles K, Mahon PC, Semenza GL. 2001. HER2 (neu) signaling increases the rate of hypoxia-inducible factor 1alpha (HIF-1alpha) synthesis: novel mechanism for HIF-1-mediated vascular endothelial growth factor expression. *Mol Cell Biol*. 21(12):3995-4004.

Laxmanan S, Robertson SW, Wang E, Lau JS, Briscoe DM, Mukhopadhyay D. 2005. Vascular endothelial growth factor impairs the functional ability of dendritic cells through Id pathways. *Biochem Biophys Res Commun*. 334(1):193-8.

Lee J, Park SY, Lee EK, Park CG, Chung HC, Rha SY, Kim YK, Bae GU, Kim BK, Han JW, Lee HY. 2006. Activation of hypoxia-inducible factor-1alpha is necessary for lysophosphatidic acid-induced vascular endothelial growth factor expression. *Clin Cancer Res*. 12(21):6351-8.

Lee JC, Kumar S, Griswold DE, Underwood DC, Votta BJ, Adams JL. 2000. Inhibition of p38 MAP kinase as a therapeutic strategy. *Immunopharmacology*. 47(2-3):185-201.

Lee JC, Laydon JT, McDonnell PC, Gallagher TF, Kumar S, Green D, McNulty D, Blumenthal MJ, Heys JR, Landvatter SW. 1994. A protein kinase involved in the regulation of inflammatory cytokine biosynthesis. *Nature*. 372(6508):739-46.

Liu D, Zhang T, Marshall AJ, Okkenhaug K, Vanhaesebroeck B, Uzonna JE. 2009. The p110delta isoform of phosphatidylinositol 3-kinase controls susceptibility to *Leishmania major* by regulating expansion and tissue homing of regulatory T cells. *J Immunol*.183(3):1921-33.

Mäkinen T, Veikkola T, Mustjoki S, Karpanen T, Catimel B, Nice EC, Wise L, Mercer A, Kowalski H, Kerjaschki D, Stacker SA, Achen MG, Alitalo K. 2001. Isolated lymphatic endothelial cells transduce growth, survival and migratory signals via the VEGF-C/D receptor VEGFR-3. *EMBO J*. 20(17):4762-73.

Mancino A, Schioppa T, Larghi P, Pasqualini F, Nebuloni M, Chen IH, Sozzani S, Austyn JM, Mantovani A, Sica A. 2008. Divergent effects of hypoxia on dendritic cell functions. *Blood*. 112(9):3723-34.

Markel TA, Crisostomo PR, Wang M, Herring CM, Lahm T, Meldrum KK, Lillemoie KD, Rescorla FJ, Meldrum DR. 2007. Iron chelation acutely stimulates fetal human intestinal cell production of IL-6 and VEGF while decreasing HGF: the roles of p38, ERK, and JNK MAPK signaling. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 292(4):G958-63.

Matsushita K, Motani R, Sakuta T, Nagaoka S, Matsuyama T, Abeyama K, Maruyama I, Takada H, Torii M. 1999. Lipopolysaccharide enhances the production of vascular endothelial growth factor by human pulp cells in culture. *Infect Immun*. 67(4):1633-9.

Mempel TR, Henrickson SE, Von Andrian UH. 2004. T-cell priming by dendritic cells in lymph nodes occurs in three distinct phases. *Nature*. 427(6970):154-9.

Michelsen KS, Aicher A, Mohaupt M, Hartung T, Dimmeler S, Kirschning CJ, Schumann RR. 2001. The role of toll-like receptors (TLRs) in bacteria-induced maturation of murine dendritic cells (DCs). Peptidoglycan and lipoteichoic acid are inducers of DC maturation and require TLR2. *J Biol Chem*. 276(28):25680-6.

Mimura K, Kono K, Takahashi A, Kawaguchi Y, Fujii H. 2007. Vascular endothelial growth factor inhibits the function of human mature dendritic cells mediated by VEGF receptor-2. *Cancer Immunol Immunother*. 56(6):761-70.

Mitchell JA, Paul-Clark MJ, Clarke GW, McMaster SK, Cartwright N. 2007. Critical role of toll-like receptors and nucleotide oligomerisation domain in the regulation of health and disease. *J Endocrinol.* 193(3):323-30.

Moolenaar WH. 1995. Lysophosphatidic acid, a multifunctional phospholipid messenger. *J Biol Chem.* 270(22):12949-52.

Murdoch C, Lewis CE. 2005. Macrophage migration and gene expression in response to tumor hypoxia. *Int J Cancer.* 117(5):701-8.

Muta T, Takeshige K. 2001. Essential roles of CD14 and lipopolysaccharide-binding protein for activation of toll-like receptor (TLR)2 as well as TLR4 Reconstitution of TLR2- and TLR4-activation by distinguishable ligands in LPS preparations. *Eur J Biochem.* 268(16):4580-9

Netea MG, Ferwerda G, de Jong DJ, Jansen T, Jacobs L, Kramer M, Naber TH, Drenth JP, Girardin SE, Kullberg BJ, Adema GJ, Van der Meer JW. 2005. Nucleotide-binding oligomerization domain-2 modulates specific TLR pathways for the induction of cytokine release. *J Immunol.* 174(10):6518-23.

Netea MG, van der Graaf C, Van der Meer JW, Kullberg BJ. 2004. Toll-like receptors and the host defense against microbial pathogens: bringing specificity to the innate-immune system. *J Leukoc Biol.* 75(5):749-55.

Nishi K, Oda T, Takabuchi S, Oda S, Fukuda K, Adachi T, Semenza GL, Shingu K, Hirota K. 2008. LPS induces hypoxia-inducible factor 1 activation in macrophage-differentiated cells in a reactive oxygen species-dependent manner. *Antioxid Redox Signal.* 10(5):983-95.

O'Neill LA, Bowie AG. 2007. The family of five: TIR-domain-containing adaptors in Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol.* 7(5):353-64.

Oyama T, Ran S, Ishida T, Nadaf S, Kerr L, Carbone DP, Gabrilovich DI. 1998. Vascular endothelial growth factor affects dendritic cell maturation through the inhibition of nuclear factor-kappa B activation in hemopoietic progenitor cells. *J Immunol.* 160(3):1224-32.

Park SY, Jeong KJ, Lee J, Yoon DS, Choi WS, Kim YK, Han JW, Kim YM, Kim BK, Lee HY. 2007. Hypoxia enhances LPA-induced HIF-1alpha and VEGF expression: their inhibition by resveratrol. *Cancer Lett.* 258(1):63-9.

Pepe JC, Miller VL. 1993. The biological role of invasin during a *Yersinia enterocolitica* infection. *Infect. Agents Dis.* 2:236-241.

Pepe JC, Miller VL. 1993. *Yersinia enterocolitica* invasin: a primary role in the initiation of infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 90:6473-6477.

Peyssonnaux C, Cejudo-Martin P, Doedens A, Zinkernagel AS, Johnson RS, Nizet V. 2007. Cutting edge: Essential role of hypoxia inducible factor-1alpha in development of lipopolysaccharide-induced sepsis. *J Immunol.* 178(12):7516-9.

Peyssonnaux C, Datta V, Cramer T, Doedens A, Theodorakis EA, Gallo RL, Hurtado-Ziola N, Nizet V, Johnson RS. 2005. HIF-1alpha expression regulates the bactericidal capacity of phagocytes. *J Clin Invest.* 115(7):1806-15.

Peyssonnaux C, Johnson RS. 2004. An unexpected role for hypoxic response. *Cell Cycle.* 2:168-171

Philpott DJ, Yamaoka S, Israël A, Sansonetti PJ. 2000. Invasive *Shigella flexneri* activates NF-kappa B through a lipopolysaccharide-dependent innate intracellular response and leads to IL-8 expression in epithelial cells. *J Immunol.* 165(2):903-14.

Pickkers P, Sprong T, Eijk L, Hoeven H, Smits P, Deuren M. 2005. Vascular endothelial growth factor is increased during the first 48 hours of human septic shock and correlates with vascular permeability. *Shock.* 24(6):508-12.

Pinhal-Enfield G, Ramanathan M, Hasko G, Vogel SN, Salzman AL, Boons GJ, Leibovich SJ. 2003. An angiogenic switch in macrophages involving synergy between Toll-like receptors 2, 4, 7, and 9 and adenosine A(2A) receptors. *Am J Pathol.* 163(2):711-21.

Qian D, Lin HY, Wang HM, Zhang X, Liu DL, Li QL, Zhu C. 2004. Normoxic induction of the hypoxic-inducible factor-1 alpha by interleukin-1 beta involves the extracellular signal-regulated kinase 1/2 pathway in normal human cytotrophoblast cells. *Biol Reprod.* 70(6):1822-7.

Qureshi ST, Larivière L, Leveque G, Clermont S, Moore KJ, Gros P, Malo D. 1999. Endotoxin-tolerant mice have mutations in Toll-like receptor 4 (Tlr4). *J Exp Med.* 189(4):615-25.

Resto-Ruiz SI, Schmiederer M, Sweger D, Newton C, Klein TW, Friedman H, Anderson BE. 2002. Induction of a potential paracrine angiogenic loop between human THP-1 macrophages and human microvascular endothelial cells during *Bartonella henselae* infection. *Infect Immun.* 70(8):4564-70.

Ridley AJ. 2006. Rho GTPases and actin dynamics in membrane protrusions and vesicle trafficking. *Trends Cell Biol.* 16(10):522-9.

Rivera-Lopez CM, Tucker AL, Lynch KR. 2008. Lysophosphatidic acid (LPA) and angiogenesis. *Angiogenesis.* 11(3):301-10.

Rodriguez-Borlado L, Barber DF, Hernández C, Rodríguez-Marcos MA, Sanchez A, Hirsch E, Wymann M, Martínez-A C, Carrera AC. 2003. Phosphatidylinositol 3-kinase regulates the CD4/CD8 T cell differentiation ratio. *J Immunol.* 170(9):4475-82.

Ruckdeschel K, Roggenkamp A, Schubert S, Heesemann J. 1996. Differential contribution of *Yersinia enterocolitica* virulence factors to evasion of microbicidal action of neutrophils. *Infect Immun.* 64(3):724-33.

Rupp J, Gieffers J, Klinger M, van Zandbergen G, Wrase R, Maass M, Solbach W, Deiwick J, Hellwig-Burgel T. 2007. *Chlamydia pneumoniae* directly interferes with HIF-1 α stabilization in human host cells. *Cell Microbiol.* 9(9):2181-91.

Sako A, Kitayama J, Shida D, Suzuki R, Sakai T, Ohta H, Nagawa H. 2006. Lysophosphatidic acid (LPA)-induced vascular endothelial growth factor (VEGF) by mesothelial cells and quantification of host-derived VEGF in malignant ascites. *J Surg Res.* 130(1):94-101.

Schmid Y, Grassl GA, Bühler OT, Skurnik M, Autenrieth IB, Bohn E. 2004. *Yersinia enterocolitica* adhesin A induces production of interleukin-8 in epithelial cells. *Infect Immun.* 72(12):6780-9.

Schulte R, Grassl GA, Preger S, Fessele S, Jacobi CA, Schaller M, Nelson PJ, Autenrieth IB. 2000. *Yersinia enterocolitica* invasin protein triggers IL-8 production in epithelial cells via activation of Rel p65-p65 homodimers. *FASEB J.* 14(11):1471-84.

Schulte R, Zumbühl R, Kampik D, Fauconnier A, Autenrieth IB. 1998. Wortmannin blocks *Yersinia* invasin-triggered internalization, but not interleukin-8 production by epithelial cells. *Med Microbiol Immunol.* 187(1):53-60.

Schwandner R, Dziarski R, Wesche H, Rothe M, Kirschning CJ. 1999. Peptidoglycan- and lipoteichoic acid-induced cell activation is mediated by toll-like receptor 2. *J Biol Chem.* 274(25):17406-9 .

Stroka DM, Burkhardt T, Desbaillets I, Wenger RH, Neil DA, Bauer C, Gassmann M, Candinas D. 2001. HIF-1 is expressed in normoxic tissue and displays an organ-specific regulation under systemic hypoxia. *FASEB J.* 15(13):2445-53.

Svensson M, Stockinger B, Wick MJ. 1997. Bone marrow-derived dendritic cells can process bacteria for MHC-I and MHC-II presentation to T cells. *J Immunol.* 158(9):4229-36.

Swat W, Montgrain V, Doggett TA, Douangpanya J, Puri K, Vermi W, Diacovo TG. 2006. Essential role of PI3Kdelta and PI3Kgamma in thymocyte survival. *Blood*. 107(6):2415-22.

Swat W, Montgrain V, Doggett TA, Douangpanya J, Puri K, Vermi W, Diacovo TG. 2006. Essential role of PI3Kdelta and PI3Kgamma in thymocyte survival. *Blood*. 107(6):2415-22.

Tada H, Aiba S, Shibata K, Ohteki T, Takada H. 2005. Synergistic effect of Nod1 and Nod2 agonists with toll-like receptor agonists on human dendritic cells to generate interleukin-12 and T helper type 1 cells. *Infect Immun*. 73(12):7967-76.

Takada H, Uehara A. 2006. Enhancement of TLR-mediated innate immune responses by peptidoglycans through NOD signaling. *Curr Pharm Des*. 12(32):4163-72.

Takahashi A, Kono K, Ichihara F, Sugai H, Fujii H, Matsumoto Y. 2004. Vascular endothelial growth factor inhibits maturation of dendritic cells induced by lipopolysaccharide, but not by proinflammatory cytokines. *Cancer Immunol Immunother*. 53(6):543-50.

Takeuchi O, Hoshino K, Akira S. 2000. Cutting edge: TLR2-deficient and MyD88-deficient mice are highly susceptible to *Staphylococcus aureus* infection. *J Immunol*. 165(10):5392-6.

Takeuchi O, Hoshino K, Kawai T, Sanjo H, Takada H, Ogawa T, Takeda K, Akira S. 1999. Differential roles of TLR2 and TLR4 in recognition of gram-negative and gram-positive bacterial cell wall components. *Immunity*. 11(4):443-51.

Takeuchi O, Takeda K, Hoshino K, Adachi O, Ogawa T, Akira S. 2000. Cellular responses to bacterial cell wall components are mediated through MyD88-dependent signaling cascades. *Int Immunol*. 12(1):113-7.

Travassos LH, Carneiro LA, Girardin SE, Boneca IG, Lemos R, Bozza MT, Domingues RC, Coyle AJ, Bertin J, Philpott DJ, Plotkowski MC. 2005. Nod1 participates in the innate immune response to *Pseudomonas aeruginosa*. *J Biol Chem*. 280(44):36714-8.

Trinchieri G, Sher A. 2007. Cooperation of Toll-like receptor signals in innate immune defence. *Nat Rev Immunol*. 7(3): 179-90.

Triscioglio D, Iervolino A, Zupi G, Del Bufalo D. 2005. Involvement of PI3K and MAPK signaling in bcl-2-induced vascular endothelial growth factor expression in melanoma cells. *Mol Biol Cell*. 16(9):4153-62.

Uehara A, Sugawara Y, Kurata S, Fujimoto Y, Fukase K, Kusumoto S, Satta Y, Sasano T, Sugawara S, Takada H. 2005. Chemically synthesized pathogen-associated molecular patterns increase the expression of peptidoglycan recognition proteins via toll-like receptors, NOD1 and NOD2 in human oral epithelial cells. *Cell Microbiol.* 7(5):675-86.

Uehara A, Yang S, Fujimoto Y, Fukase K, Kusumoto S, Shibata K, Sugawara S, Takada H. 2005. Muramyl dipeptide and diaminopimelic acid-containing desmuramyl peptides in combination with chemically synthesized Toll-like receptor agonists synergistically induced production of interleukin-8 in a NOD2- and NOD1-dependent manner, respectively, in human monocytic cells in culture. *Cell Microbiol.* 7(1):53-61.

van Beelen AJ, Zelinkova Z, Taanman-Kueter EW, Muller FJ, Hommes DW, Zaat SA, Kapsenberg ML, de Jong EC. 2007. Stimulation of the intracellular bacterial sensor NOD2 programs dendritic cells to promote interleukin-17 production in human memory T cells. *Immunity.* 27(4):660-9.

Viala J, Chaput C, Boneca IG, Cardona A, Girardin SE, Moran AP, Athman R, Mémet S, Huerre MR, Coyle AJ, DiStefano PS, Sansonetti PJ, Labigne A, Bertin J, Philpott DJ, Ferrero RL. 2004. Nod1 responds to peptidoglycan delivered by the *Helicobacter pylori* cag pathogenicity island. *Nat Immunol.* 5(11):1166-74.

Walmsley SR, Cadwallader KA, Chilvers ER. 2005. The role of HIF-1alpha in myeloid cell inflammation. *Trends Immunol.* 26(8):434-9.

Walmsley SR, Print C, Farahi N, Peyssonnaud C, Johnson RS, Cramer T, Sobolewski A, Condliffe AM, Cowburn AS, Johnson N, Chilvers ER. 2005. Hypoxia-induced neutrophil survival is mediated by HIF-1alpha-dependent NF-kappaB activity. *J Exp Med.* 201(1):105-15.

Weighardt H, Jusek G, Mages J, Lang R, Hoebe K, Beutler B, Holzmann B. 2004. Identification of a TLR4- and TRIF-dependent activation program of dendritic cells. *Eur J Immunol.* 34(2):558-64.

Weighardt H, Kaiser-Moore S, Vabulas RM, Kirschning CJ, Wagner H, Holzmann B. 2002. Cutting edge: myeloid differentiation factor 88 deficiency improves resistance against sepsis caused by polymicrobial infection. *J Immunol.* 169(6):2823-7.

Wiedmaier N, Müller S, Köberle M, Manncke B, Krejci J, Autenrieth IB, Bohn E. 2008. Bacteria induce CTGF and CYR61 expression in epithelial cells in a lysophosphatidic acid receptor-dependent manner. *Int J Med Microbiol.* 298(3-4):231-43. Epub 2007 Aug 31.

Wu WZ, Sun HC, Shen YF, Chen J, Wang L, Tang ZY, Iliakis G, Liu KD. 2005. Interferon alpha 2a down-regulates VEGF expression through PI3 kinase and MAP kinase signaling pathways. *J Cancer Res Clin Oncol.* 131(3):169-78.

Xue Y, Bi F, Zhang X, Zhang S, Pan Y, Liu N, Shi Y, Yao X, Zheng Y, Fan D. 2006. Role of Rac1 and Cdc42 in hypoxia induced p53 and von Hippel-Lindau suppression and HIF1alpha activation. *Int J Cancer.* 118(12):2965-72.

Yamada T, Ohoka Y, Kogo M, Inagaki S. 2005. Physical and functional interactions of the lysophosphatidic acid receptors with PDZ domain-containing Rho guanine nucleotide exchange factors (RhoGEFs). *J Biol Chem.* 280(19):19358-63.

Yamamoto M, Sato S, Hemmi H, Hoshino K, Kaisho T, Sanjo H, Takeuchi O, Sugiyama M, Okabe M, Takeda K, Akira S. 2003. Role of adaptor TRIF in the MyD88-independent toll-like receptor signaling pathway. *Science.* 301(5633):640-3.

Yamamoto M, Sato S, Hemmi H, Sanjo H, Uematsu S, Kaisho T, Hoshino K, Takeuchi O, Kobayashi M, Fujita T, Takeda K, Akira S. 2002. Essential role for TIRAP in activation of the signalling cascade shared by TLR2 and TLR4. *Nature.* 420(6913):324-9.

Yang S, Tamai R, Akashi S, Takeuchi O, Akira S, Sugawara S, Takada H. 2001. Synergistic effect of muramyldipeptide with lipopolysaccharide or lipoteichoic acid to induce inflammatory cytokines in human monocytic cells in culture. *Infect Immun.* 69(4):2045-53.

Yao V, Platell C, Hall JC. 2002. Dendritic cells. *ANZ J Surg.* 72(7):501-6.

Yrlid U, Wick MJ. 2002. Antigen presentation capacity and cytokine production by murine splenic dendritic cell subset upon Salmonella encounter. *J Immunol.* 169:108-116

Zagórska A, Dulak J. 2004. HIF-1: the knowns and unknowns of hypoxia sensing. *Acta Biochim Pol.* 51(3):563-85.

Zhong H, Chiles K, Feldser D, Laughner E, Hanrahan C, Georgescu MM, Simons JW, Semenza GL. 2000. Modulation of hypoxia-inducible factor 1alpha expression by the epidermal growth factor/phosphatidylinositol 3-kinase/PTEN/AKT/FRAP pathway in human prostate cancer cells: implications for tumor angiogenesis and therapeutics. *Cancer Res.* 60(6):1541-5.

Zinkernagel AS, Johnson RS, Nizet V. 2007. Hypoxia inducible factor (HIF) function in innate immunity and infection. *J Mol Med.* 85(12):1339-46.

Zinkernagel AS, Peyssonnaud C, Johnson RS, Nizet V. 2008. Pharmacologic augmentation of hypoxia-inducible factor-1alpha with mimosine boosts the bactericidal capacity of phagocytes. *J Infect Dis.* 197(2):214-7.

Bücher:

Butler T, Dennis D T: *Yersinia Species, Including Plague*. In: Mandell G L, Bennett J E , Dolin R (Hrsg): *Mandell, Douglas, Bennett's Principles and Practice of Infections Disease*. Band 2, 6. Auflage, 2005, Elsevier, Churchill Livingstone, 2691-2701

Herold G: *Innere Medizin*, 2007, Gerd Herold, Köln

Hof H, Dörries R: *Medizinische Mikrobiologie*. 3. Auflage, 2005, Georg Thieme Verlag, Stuttgart

Janeway C, Travers P, Walport M, Shlomchik M: *Immunologie*. 5. Auflage, 2002, Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg-Berlin

Kayser FH, Kut AB, Eckert j, Zinkernagel RM: *Medizinische Mikrobiologie*. 9. Auflage, 1998, Georg Thieme Verlag, Stuttgart

Roitt IM, Brostoff J, Male DK: *Kurzes Lehrbuch der Immunologie*. 3. Auflage, 1995, Georg Thieme Verlag, Stuttgart

Dissertationen:

Greiffenberg Lars (2000): *Interaktion von Listeria monocytogenes mit Endothelzellen*. Med. Dissertation. Universität Würzburg

Schmid Yvonne (2005): *Molekulare Mechanismen einer Yersinia enterocolitica induzierten Wirtzellaktivierung*. Med. Dissertation. Universität Tübingen

Voß Eske (2006): *Untersuchungen zur Rolle intrazellulärer Rezeptoren bei der Induktion von antimikrobiellen Peptiden durch Pathogen assoziierte Moleküle (PAMs)*. Med. Dissertation. Universität Kiel

Internetseiten:

www.sciencephotos.com

www.wikipedia.de

8. Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. Autenrieth für die freundliche Aufnahme in sein Institut, die Bereitstellung des Themas und seinem steten Interesse an meiner Arbeit.

Ganz besonders möchte ich meinem direkten Betreuer Dr. Patrick Weißgerber danken. Ohne seine unzähligen Anregungen und Ideen sowie seine ständige Unterstützung, Engagement und Diskussionsbereitschaft wäre die Dissertation nicht in dieser Form möglich gewesen.

Ich danke unseren technischen Assistentinnen Juliane Klenk, Birgit Manncke und Bettina Hackl sowie Frau Dr. Susanne Berchtold für die unkomplizierte Zusammenarbeit.

Juliane Klenk danke ich ganz besonders für ihre Geduld, ihren unermüdlichen Einsatz und die gewissenhafte Erfüllung aller Arbeiten sowie den vielen lustigen Stunden im Labor.

Allen Kollegen im Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene danke ich für ihre gute Zusammenarbeit, die freundschaftliche Hilfe und das angenehme Arbeitsklima.