

**Aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene
der Universität Tübingen**

Direktor: Professor Dr. I. B. Autenrieth

**Aktivierung des Transkriptionsfaktors
hypoxia-inducible-factor (HIF)-1 nach Infektion
mit *Enterobacteriaceae***

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen**

**vorgelegt von
Helena Sophia Wurz
aus
Leimen**

2010

Dekan:

Prof. Dr. I.B. Autenrieth

1. Berichterstatter:

Prof. Dr. V. Kempf

2. Berichterstatter:

Prof. Dr. T. Iftner

Für meine Eltern

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	7
1.1	Bakterien	7
1.1.1	<i>Enterobacteriaceae</i>	7
1.1.1.1	Die Gattung <i>Yersinia</i>	9
1.1.1.2	Die Gattung <i>Salmonella</i>	10
1.1.1.3	Die Gattung <i>Enterobacter</i>	11
1.1.2	Die Gattung <i>Bartonella</i>	12
1.1.2.1	<i>Bartonella henselae</i>	13
1.1.2.2	Durch <i>B. henselae</i> verursachte Erkrankungen	13
1.1.2.3	Der Pathogenitätsfaktor BadA von <i>B. henselae</i>	14
1.2	Der Transkriptionsfaktor <i>hypoxia-inducible factor</i> (HIF)-1	14
1.2.1	Transkriptionsfaktoren	14
1.2.2	Der Transkriptionsfaktor <i>hypoxia-inducible factor</i> (HIF)-1	14
1.2.2.1	Regulation und Abbaumechanismen von HIF-1	15
1.2.2.2	Biologische Bedeutung von HIF-1 und HIF-1-regulierten Genen	17
1.2.3	Das Zytokin <i>vascular endothelial growth factor</i> (VEGF)	19
1.2.4	Das Zytokin Adrenomedullin (ADM)	21
1.2.5	Das Enzym Hexokinase II (HK II)	21
1.3	Eisenstoffwechsel und Siderophore	21
1.3.1	Yersiniabactin (Ybt)	23
1.3.2	Aerobactin (Aeb)	24
1.3.3	Salmochelins (Sal)	25
1.3.4	Desferrioxamin (DFO)	26
1.3.5	Lactoferrin (LF)	28
1.4	Zielsetzung dieser Arbeit	30
2	Material und Methoden	31
2.1	Material	31
2.1.1	Geräte	31
2.1.2	Verbrauchsmaterialien	32
2.1.3	Chemikalien	33
2.1.4	Antibiotika	34
2.1.5	Protein- und DNA-Leiter	34
2.1.6	Enzyme	34
2.1.7	Antikörper	35
2.1.8	Oligonukleotide	35
2.1.9	Medien	36
2.1.10	Zelllinien	37
2.1.11	Bakterienstämme	37
2.1.12	Siderophore	37
2.1.13	Puffer und Lösungen	38
2.1.14	Kommerzielle Kits	41
2.1.15	Sonstiges	41
2.2	Methoden	43
2.2.1	Bakterien	43
2.2.1.1	Herstellung von Bakterienkulturen für Infektionsexperimente	43

2.2.1.2 Herstellung von Bakterienstocks	43
2.2.2 Zellkulturen	44
2.2.2.1 Kultivierung von HeLa-Zellen	44
2.2.2.2 Bestimmung der Lebendzellzahl und Aussaat für Infektionsexperimente	44
2.2.3 Infektionsexperimente.....	45
2.2.3.1 Infektion mit <i>B. henselae</i> und <i>Enterobacteriaceae</i>	45
2.2.3.2 Behandlung von HeLa-Zellen mit Siderophoren, Lipopolysacchariden und Lactoferrin	46
2.2.4 Proteinbiochemische Methoden	47
2.2.4.1 Gewinnung von Proteinextrakten aus Zelllysaten	47
2.2.4.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	47
2.2.4.3 HIF-1 α -Immunoblot	48
2.2.5 Zytokinbestimmung aus Zellkulturüberständen	49
2.2.5.1 Gewinnung von Zellkulturüberständen	50
2.2.5.2 VEGF-ELISA	50
2.2.5.3 IL-8 ELISA	51
2.2.6 Molekulargenetische Methoden.....	51
2.2.6.1 Arbeiten mit RNA.....	52
2.2.6.2 RNA-Isolierung	52
2.2.6.3 Quantifizierung der Gesamt-RNA.....	53
2.2.6.4 Reverse Transkriptase Reaktion	54
2.2.7 Semiquantitative Polymerase Kettenreaktion (PCR)	55
2.2.7.1 Gelelektrophorese der PCR-Produkte.....	56
2.2.8 Quantitative Real-Time-PCR	57
2.2.8.1 VEGF-Real-Time-PCR	57
2.2.8.2 IL-8-Real-Time-PCR.....	60
2.2.9 Statistik	61
3 Ergebnisse	63
3.1 Aktivierung von HIF-1 in <i>Enterobacteriaceae</i>-infizierten HeLa229-Zellen	63
3.1.1 Nachweis der Induktion eines HIF-1-abhängigen Genprogramms	64
3.2 Aktivierung von HIF-1 in Siderophor-behandelten HeLa229-Zellen	65
3.2.1 Aktivierung von HIF-1 in HeLa229-Zellen nach Inkubation mit Yersiniabactin und Aerobactin	66
3.2.2 Nachweis der HIF-regulierten Gene auf mRNA-Ebene mittels semiquantitativer PCR	69
3.2.3 Nachweis der HIF-1-regulierten Gene auf Proteinebene mittels VEGF-ELISA.....	72
3.3 Siderophor-abhängige Induktion der VEGF-Sekretion nach Infektion mit <i>Enterobacteriaceae</i>	73
3.3.1 Nachweis der Siderophor-abhängigen HIF-1-Aktivierung mittels HIF-1 α -Immunoblot und Reporterassay.....	74
3.4 Untersuchungen zur Spezifität der HIF-1-Aktivierung durch Siderophore.....	75
3.4.1 Ausbleibende HIF-1-Aktivierung durch LPS	75
3.4.2 Hypoxie-unabhängige HIF-1-Aktivierung durch <i>Enterobacteriaceae</i>	76

3.5	Ausbleibende IL-8 Induktion in HeLa229-Zellen nach Behandlung mit Siderophoren	77
3.6	Induktion einer VEGF-Sekretion in HeLa229-Zellen durch Lactoferrin	78
4	Diskussion	80
4.1	Aktivierung von HIF-1 in Endothelzellen nach Infektion mit <i>Enterobacteriaceae</i>	80
4.2	Die Rolle des Transkriptionsfaktors HIF-1 in Infektion und Inflammation	82
4.3	Die Rolle bakterieller Siderophore und des Eisenstoffwechsels in der Aktivierung von HIF-1	84
4.4	HIF-1-Aktivierung und Angiogenese in chronisch entzündlichen Darmerkrankungen.....	87
4.5	HIF-1 und maligne Neoplasien des GI-Traktes	94
5	Zusammenfassung.....	98
6	Literaturverzeichnis	100
7	Abkürzungen.....	127
8	Anhang	130
9	Publikationen	133
10	Danksagung.....	134
11	Lebenslauf.....	135

1 Einleitung

1.1 Bakterien

1.1.1 *Enterobacteriaceae*

Die Bakterienfamilie der *Enterobacteriaceae* gehört phylogenetisch zur Klasse der γ -Proteobakterien, einer Gruppe aus gramnegativen, fakultativ anaeroben Stäbchen. *Enterobacteriaceae* gelten als eine der wichtigsten Bakterienfamilien der Humanmedizin, da deren Mitglieder zu den häufigsten Infektionserregern des Menschen gehören. Ihr natürliches Habitat ist der Darmtrakt von Mensch und Tier. Die durch sie verursachten Erkrankungen des Menschen sind meist intestinale Infektionen oder Harnwegsinfekte, sie können aber auch bspw. Meningitis oder Sepsis verursachen. *Enterobacteriaceae* haben eine wichtige Bedeutung als Erreger nosokomialer Erkrankungen bei immunsupprimierten und hospitalisierten Patienten. Die Familie umfasst mehr als 100 Spezies, in **Tabelle 1** sind die 12 wichtigsten aufgeführt.

Tab. 1: *Enterobacteriaceae* und die von ihnen verursachten Erkrankungen.

Gattung/Art/Var	Erkrankung des Menschen
<i>Salmonella enterica</i> <i>Serovar typhi</i> <i>Serovar paratyphi</i> <i>Serovar typhimurium</i> <i>Serovar enteritidis</i>	Typhus abdominalis, Gastroenteritis
<i>Shigella</i> <i>S. boydii</i> <i>S. dysenteriae</i> <i>S. flexneri</i> <i>S. sonnei</i>	Ruhr (Dysenterie)
<i>Yersinia</i> <i>Y. pestis</i> <i>Y. enterocolitica</i> <i>Y. pseudotuberculosis</i>	Pest Enterokolitis, Lymphadenitis der Mesenteriallymphknoten

<i>E. coli</i> <i>enteropathogen (EPEC)</i> <i>enterotoxisch (ETEC)</i> <i>enteroinvasiv (EIEC)</i> <i>enterohämorrhagisch (EHEC)</i>	Säuglingsdiarrhoe Cholera-ähnliche Diarrhoe Ruhr-ähnliche Dysenterie Hämorrhagische Kolitis
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Pneumonie
<i>Enterobacter spp., Citrobacter spp., Proteus spp., Serratia spp., Morganella spp., Providencia spp., Edwardsiella spp.</i>	Sepsis, Wund-, Harnwegsinfekte, Infekte des Respirationstraktes

Alle Mitglieder dieser Familie lassen sich auf einfachen Nährmedien kultivieren und haben eine mittlere Generationszeit von 20-30 Minuten. Ihre Größe liegt bei ca. 1-5 µm Länge. Sie sind meist begeißelt, damit beweglich und bilden keine Sporen. *Enterobacteriaceae* sind Oxidase-negativ und Katalase-positiv (außer *Shigella dysenteriae*), sie fermentieren Glukose und reduzieren Nitrat zu Nitrit. Die Pathogenität einzelner Bakterien kann durch ihre Fähigkeit, Laktose zu metabolisieren, charakterisiert werden. Außerdem besitzen *Enterobacteriaceae* eine Resistenz gegen verschiedene Chemikalien (Gallensalze und Kristallviolett). Diese Eigenschaft kann für die selektive Kultivierung genutzt werden. Die Differenzierung der einzelnen *Enterobacteriaceae* gelingt klinisch meist nicht, im Labor sind daher biochemische Tests unabdingbar, um eine genaue Diagnose zu sichern und damit die Therapie abstimmen zu können.

Die wichtigsten Antigene der *Enterobacteriaceae* sind:

- O-Antigen (Oberflächenantigen); lokalisiert in Lipopolysacchariden der äußeren Zellmembran.
- H-Antigen (Geißelantigen); lokalisiert in Geißeln und Flagellen.
- F-Antigen (Fimbrienantigen).
- K-Antigen (Hüllenantigen); lokalisiert in der Bakterienkapsel.

Die Pathogenität von *Enterobacteriaceae* ist bedingt durch bspw. Adhärenzfaktoren, Invasine, Exotoxine (Enterotoxine und Zytotoxine), Endotoxine, Serum- und Phagozytenresistenz und der Bildung von Siderophoren.

Lipopolysaccharide (LPS) sind Bestandteile der Zellmembran. Sie werden auch als die O-Antigene bezeichnet und lösen durch ihre Bindung an den CD14/TLR2/MD2-Rezeptorkomplex eine starke Immunreaktion des Wirtes aus ^{277,314,323}. Mehrfach wurde über eine HIF-1-Aktivierung durch LPS berichtet ^{99,249,263}. Eine LPS-Exposition löst in Makrophagen eine Aktivierung von HIF-1 α aus, was auf eine Bedeutung dieses Faktors unter inflammatorischen Bedingungen hinweist ²⁸.

1.1.1.1 Die Gattung *Yersinia*

Die Gattung *Yersinia* gehört zur Familie der *Enterobacteriaceae* und umfasst zwölf Arten, wovon drei humanpathogen sind ⁴¹. Einer dieser Erreger ist die Spezies *Y. pestis*, der Erreger der Pest, einer Infektionskrankheit, die im Mittelalter epidemisch auftrat und 30-40% der damaligen Bevölkerung das Leben kostete ¹⁷². Aufgrund der verbesserten hygienischen Verhältnisse spielt dieser Erreger heute nur noch in Entwicklungsländern eine endemische Rolle.

Die weiteren zwei wichtigen Vertreter der Gattung *Yersinia* sind *Y. enterocolitica* und *Y. pseudotuberculosis*. Beide Bakterienarten verursachen bei Tieren generalisierte Infektionen, die auch auf den Menschen übertragen werden können. *Y. enterocolitica* und *Y. pseudotuberculosis* sind peritrich begeißelte Stäbchen, die bei 27-30°C optimal wachsen. Die Keime gelangen meist über die Nahrung in den unteren Intestinaltrakt, penetrieren hier die Mukosa und werden von M-Zellen in die Peyerschen Plaques (PPs) des Dünndarms aufgenommen, wo sich der Erreger zunächst vermehrt ¹¹. Hierdurch wird die Sekretion von IL-8, IL-1 β , IL-6, TNF- α , MCP-1 und GM-CSF induziert ^{7,154}. Durch diese Zytokine und Mediatoren kommt es zu einer Einwanderung von Leukozyten und Monozyten ¹¹. Die Krankheitsbilder reichen von der intestinalen Yersiniose mit Enteritis (Pseudoappendizitis, Ileitis oder Kolitis) und Lymphadenitis bis zu den extraintestinalen Yersiniosen (Sepsis, Lymphadenopathie, selten Hepatitis, Pleuritis, Endokarditis, Osteomyelitis, Cholezystitis oder lokale Abszesse). Die systemischen Erkrankungen sind vor allem in immundefizienten Patienten oder während einer Desferrioxamin-

Behandlung häufig und kommen bei Patienten mit überhöhter Eisenspeicherung vor^{34,36,239}. Bei gutartigen Verläufen reicht die symptomatische Therapie, bei schweren Verläufen ist eine antibiotische Therapie mit Cotrimoxazol, Cephalosporinen oder Chinolonen angezeigt³⁵. An Folgeerkrankungen können bei 20% der Infizierten eine reaktive Mono- oder Oligoarthritis oder ein Erythema nodosum auftreten, besonders bei Patienten mit dem MHC-Gen HLA-27^{3,4,82,122,292}. *Y. enterocolitica* ist ein primär extrazellulärer Erreger¹⁰, wurde aber auch intrazellulär nachgewiesen¹⁷². Der Erregernachweis erfolgt über Kulturen mit Spezialmedien oder dem Nachweis von Antikörpern.

Y. enterocolitica ist im Labor gut zu differenzieren, da das Bakterium bei Raumtemperatur eine hohe Motilität aufweist und Urease- und Ornithase-positiv ist. *Y. enterocolitica* besitzt ein sogenanntes „*high pathogenicity island (HPI)*“, eine Gensequenz, die u. a. das Siderophor Yersiniabactin kodiert^{9,12,117}.

1.1.1.2 Die Gattung *Salmonella*

Salmonellen gehören ebenfalls zur Familie der *Enterobacteriaceae*, werden in der Spezies *Salmonella enterica* zusammengefasst und wiederum in sieben Subspezies unterteilt. Die für den Menschen pathogenen Salmonellen gehören fast ausschließlich zur Gruppe *S. enterica* spp. *enterica*. Außerdem können die Salmonellen aufgrund von O- (*long-chain Lipopolysaccharide (LPS)* auf der Zellmembran, deren strukturelle Heterogenität für die große Zahl an verschiedenen Serotypen verantwortlich ist) und H-Antigenen (flagelläre Proteine) nach dem Kauffman & White-Schema in über 2000 Serovaren unterteilt werden^{88,89,235}. Sie sind typische Vertreter der *Enterobacteriaceae*: fakultativ anaerobe, gram-negative, bewegliche Stäbchen, die auf vielen Nährböden kultiviert werden können und in der Natur weit verbreitet auftreten.

Klinisch werden zwei Infektionen unterschieden: typhöse und enteritische Salmonellosen.

Die typhösen Salmonellosen werden von den Serovaren *Typhi* (Gruppe D1) und *Paratyphi-A, -B und -C* (Gruppe A, B und C1) verursacht. Die Übertragung erfolgt ausschließlich von Mensch zu Mensch. Klinisch kommt es zu einer

Allgemeininfektion mit septischem Krankheitsbild. Die Verbreitung der Erreger erfolgt lymphogen und hämatogen. Anschließend kommt es innerhalb von 7-10 Tagen zu einer sekundären Absiedelung in Milz, Leber, Knochenmark, Gallenwegen, Haut und PPs. Klinisch zeigen sich treppenartig ansteigendes Fieber, Benommenheit, Leukopenie, Bradykardie, Milzschwellung und Diarrhoe. Blutungen oder intestinale Perforation sind seltene Komplikationen, bedingt durch Ulzerabildung. Unbehandelt liegt die Mortalität bei bis zu 20%. Die Behandlung besteht z. B. in einer Antibiotikatherapie mit Ciprofloxacin, eine aktive Immunisierung mit oralen Lebendimpfstoffen oder parenteral zu applizierenden Vi-Antigenen ist möglich.

Die enteritischen Salmonellosen werden von den Serovaren *Enteritidis* (Gruppe D1) und *Typhimurium* (Gruppe B) verursacht. Die Übertragung erfolgt über Mensch oder Tier. Klinisch präsentiert sich die Infektion mit akutem Brechdurchfall. Als Therapie empfiehlt sich der symptomatische Wasser- und Elektrolytersatz, wichtig ist die Expositionsprophylaxe durch geeignete Hygienemaßnahmen, um eine epidemische Ausbreitung zu verhindern.

1.1.1.3 Die Gattung *Enterobacter*

Die Gattung *Enterobacter* gehört zu den opportunistischen Erregern der Familie der *Enterobacteriaceae* und beinhaltet über ein Dutzend Spezies⁸⁸. Sie ist biochemisch der Gattung *Klebsiella* sehr ähnlich, allerdings Ornithin-positiv. Es handelt sich um bewegliche, teils bekapselte und peritrich begeißelte, fakultative Anaerobier, die ubiquitär vorkommen, zur physiologischen Darmflora des Menschen gehören und ein nur geringes Pathogenitätspotential besitzen. Die beiden Erreger *E. aerogenes* und *E. cloacae* sind zwei der wichtigsten Vertreter, da sie in der Lage sind, Infektionen der Harnwege, des Respirationstraktes, von Wunden und Haut und im schlimmsten Fall generalisierte Infektionen zu verursachen, was hauptsächlich bei hospitalisierten und immunsupprimierten Patienten der Fall ist. Durch das häufige Vorkommen in Krankenhäusern, wo vielerlei Antibiotika verwendet werden, bedeutet die Resistenzentwicklung dieser Bakterien (z. B. mit extended spectrum β -Lactamasen, ESBL; dadurch Resistenzen gegen Penicilline,

Cephalosporine und Monobactame) ein großes Problem in der modernen Medizin.

1.1.2 Die Gattung *Bartonella*

Die Gattung *Bartonella* spp. gehört zur Klasse der α_2 -Proteobakterien, phylogenetisch eng mit den Gattungen *Brucella*, *Rickettsia*, *Agrobacterium* und *Rhizobium* verwandt ²⁰². Seit 1993 sind 20 Arten der Gattung *Bartonella* zugeordnet worden, von denen acht als humanpathogen gelten ⁸¹. Drei davon lösen beim Menschen angioproliferative Krankheitsbilder aus (**Tab. 2**). Diese Fähigkeit, Gefäßproliferationen zu initiieren, ist einzigartig unter allen bakteriellen Infektionserregern.

Tab. 2: Eigenschaften der drei wichtigsten Vertreter von *Bartonella* spp.

<i>Bartonella</i> spp.	Reservoir	Vektor	Humane Erkrankungen
<i>B. bacilliformis</i>	Mensch	Sandfliege	Carrion'sche Krankheit: Oroya-Fieber und Verruga peruana
<i>B. quintana</i>	Mensch	Körperlaus	Fünftagefieber, Endokarditis, Bazilläre Angiomatose
<i>B. henselae</i>	Katze	Katzenfloh	Katzenkratzkrankheit, Bazilläre Angiomatose, Peliosis hepatis, Endokarditis, Neuroretinitis, Bakteriämie

Die Mitglieder der Gattung *Bartonella* sind fakultativ intrazelluläre Bakterien. Es handelt sich um gram-negative, mikroaerophile, langsam wachsende Stäbchenbakterien. Hauptsächlich werden sie durch blutsaugende Arthropoden (Flöhe, Läuse, Zecken) auf den Wirt übertragen. *Bartonella* spp. können Verursacher folgender humaner Erkrankungen sein: Katzenkratzkrankheit (KKK), bazilläre Angiomatose (BA), Peliosis hepatis (PH), chronische Bakteriämie, chronische Lymphadenopathie, Meningoencephalitis, Retinitis, Myelitis, granulomatöse Hepatitis, Endokarditis und Osteomyelitis ¹⁴⁴.

1.1.2.1 *Bartonella henselae*

Das natürliche Reservoir von *B. henselae* sind Katzen, in denen es zu normalerweise asymptomatisch verlaufenden intraerythrozytischen Bakteriämien kommt^{61,251}. Von Katze zu Katze wird das Bakterium durch den Katzenfloh *Ctenocephalides felis* übertragen. Die Übertragung auf den Menschen erfolgt entweder durch einen Biss oder Kratzer einer Katze, oder den Floh selbst^{60,170}.

1.1.2.2 Durch *B. henselae* verursachte Erkrankungen

Immunkompetente Patienten erkranken bei einer *B. henselae*-Infektion an einer sogenannten Katzenkratzkrankheit (KKK), die gewöhnlich selbstlimitierend ist und ca. 2-3 Monate andauert^{202,250}. Die KKK ist gekennzeichnet durch Lymphadenopathie und Fieber. Immunsupprimierte Patienten (z.B. AIDS-Patienten) können bei einer Infektion mit *B. henselae* an bazillärer Angiomatose (BA), Peliosis hepatis (PH), Endokarditis, osteolytischen Läsionen sowie an generalisierten Infektionen erkranken¹⁶⁹. Bei BA und PH handelt es sich um tumorartige Gefäßproliferationen, die bei der BA auf der Haut, im Knochenmark und in inneren Organen auftreten. Im Rahmen einer PH befinden sich die vaskuloproliferativen Läsionen in der Leber¹⁶⁹. Aus den Läsionen kann der Erreger kultiviert werden. Eine Antibiotikabehandlung mit Tetracyclinen oder Aminoglycosiden resultiert in einer *restitutio ad integrum*²⁵⁰, jedoch sind Rückfälle häufig. **Abb. 1** zeigt die kutane Manifestation der Bazillären Angiomatose.



Abb. 1: Kutane Form der BA bei einem HIV-Patienten.

(http://edcenter.med.cornell.edu/Pathphysiology_Cases/HIV/Cutaneous_Manifestations/4976.gif)

1.1.2.3 Der Pathogenitätsfaktor BadA von *B. henselae*

Ein Pathogenitätsfaktor von *B. henselae* ist das erst kürzlich entdeckte *Bartonella* Adhäsion A (BadA), das der Familie der Trimeren Autotransporter Adhäsine zugeordnet wird¹⁹⁴. BadA spielt eine wichtige Rolle in der Wirtszelladhäsion, schützt vor Phagozytose und ist entscheidend für die Aktivierung des Hypoxie-induzierbaren Transkriptionsfaktors (HIF)-1 und die damit verbundene Expression proangiogenetischer Faktoren^{161,162}. BadA steht somit vermutlich als wichtiger Pathogenitätsfaktor in der Induktion vaskuloproliferativer Erkrankungen BA und PH²⁴⁸.

1.2 Der Transkriptionsfaktor *hypoxia-inducible factor* (HIF)-1

1.2.1 Transkriptionsfaktoren

Transkriptionsfaktoren sind DNA-bindende Proteine, die die Transkription und somit die Expression bestimmter Gene kontrollieren. Sie liegen i. A. im Zytoplasma vor und werden bei Aktivierung in den Nukleus transloziert, wo sie an eine definierte DNA-Sequenz, ihre spezifische Erkennungssequenz in der Promotorregion des entsprechenden Gens binden und so dessen Transkriptionsrate steuern. Sie können sowohl als Aktivatoren als auch als Repressoren tätig sein.

Eine differentielle Genaktivität ist als Antwort auf verschiedene Umweltreize zu verstehen. Zellen wird so ermöglicht, in angemessener Weise auf veränderte Umweltbedingungen zu reagieren und die Zellhomöostase konstant zu halten. Transkriptionsfaktoren stehen am Ende von Signalübertragungsketten, für die es definierte Stimuli verschiedenster Art gibt.

1.2.2 Der Transkriptionsfaktor *hypoxia-inducible factor* (HIF)-1

Der Transkriptionsfaktor *hypoxia-inducible factor* (HIF)-1 ist der Schlüsseltranskriptionsfaktor unter hypoxischen Bedingungen und reguliert Gene, die die Angiogenese, Glykolyse, Proliferation, das Überleben und die Erythropoese kontrollieren.

HIF-1 ist ein heterodimeres Protein, das aus zwei Untereinheiten (HIF-1 α und HIF-1 β) besteht. Beide Untereinheiten sind Mitglieder der Familie der *basic helix-loop-helix* (bHLH) *periodic acid Schiff* (PAS) Proteine und enthalten jeweils zwei PAS Domänen, PAS-A und PAS-B. Die β -Untereinheit ist auch unter dem Namen *aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator* (ARNT) bekannt^{302,304}. Beide Untereinheiten werden im Nukleus konstitutiv exprimiert. Während die β -Untereinheit unter Normoxie bestehen bleibt, ist die Anzahl der α -Untereinheiten vom zellulären Sauerstoffpartialdruck abhängig¹⁴⁵. So hat die α -Untereinheit unter Normoxie eine Halbwertszeit von weniger als fünf Minuten, da sie einem raschen Abbau durch das Ubiquitin-Proteasom System unterzogen wird^{153,259,282}.

1.2.2.1 Regulation und Abbaumechanismen von HIF-1

Erst kürzlich konnte gezeigt werden, dass der Abbaumechanismus von HIF-1 in großem Maße von enzymatischen Aktivitäten beeinflusst wird, die *proline hydroxylase domain containing proteins* (PHDs) genannt werden. Es wurden drei homologe HIF-Prolylhydroxylasen (PHD-1,-2,-3) beschrieben und als Sauerstoffsensoren identifiziert^{45,141}. PHDs gehören zur Familie der Dioxygenasen und benötigen Sauerstoff, 2-Oxoglutarat und Ascorbat als Kosubstrat. Wie bei allen Hydroxylierungen im Organismus, dient Ascorbinsäure (Vitamin C) durch die antioxidative Wirkung der Reduktion. Außerdem benötigen die Prolylhydroxylasen Eisen als Kofaktor, das über zwei Histidin- und einen Aspartatsäurerest gebunden ist^{145,143,237,272}. PHD-1 befindet sich ausschließlich im Nukleus, PHD-2 hauptsächlich im Zytoplasma und PHD-3 sowohl im Nukleus als auch im Zytoplasma^{132,208}. Eine vierte Prolylhydroxylase wurde bereits identifiziert, ihre biologische Relevanz ist unklar²²⁶. Ein Zusammenhang zwischen den PHDs und der Hypoxie-regulierten NF κ B-Aktivität wurde kürzlich beschrieben⁷³.

Im Einzelnen erfolgt der Abbau der HIF-1 α -Untereinheit wie folgt: PHDs hydroxylieren die α -Untereinheit von HIF-1 posttranslational an den beiden Prolylresten Pro402 und Pro564. Diese Molekülveränderung ermöglicht es dem

von-Hippel-Lindau-Protein (vHL), an die ODD- (oxygen dependant degradation-) Domäne der α -Untereinheit zu binden, die sich in der N-terminalen Transaktivierungsdomäne (TAD) befindet ^{64,155,204,227}. Hierdurch erfolgt die Aktivierung des Enzyms *E3 Ubiquitin Ligase*, wodurch das Molekül ubiquitiniert und dadurch der enzymatische Abbau durch 26S Proteasome bewirkt wird (**Abb. 2**) ^{153,259}.

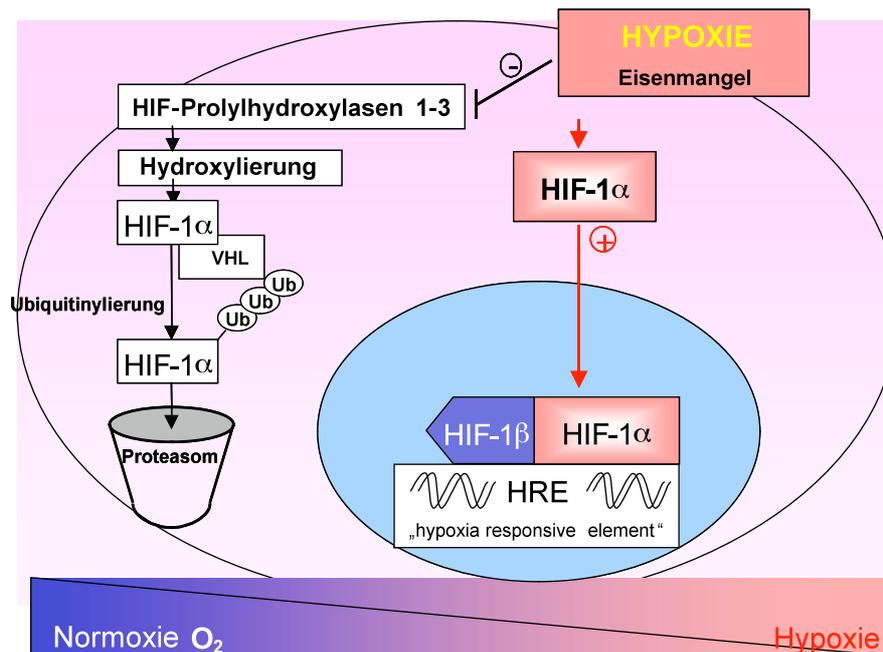


Abb. 2: Regulation der Aktivierung bzw. Degradation von HIF-1 α unter normoxischen bzw. hypoxischen Bedingungen. PHDs hydroxylieren HIF-1 α , woraufhin das von-Hippel-Lindau (vHL)-Protein bindet und HIF-1 α vom 26S-Proteasom degradiert wird. Unter Hypoxie oder Eisenmangel werden PHDs inhibiert, so dass HIF-1 α unbeeinflusst in den Zellkern gelangt und dort zusammen mit HIF-1 β die Transkription von Genen mit *hypoxia responsive element* (HRE)-Regionen induziert. HIF: *hypoxia-inducible-factor*, vHL: *von-Hippel-Lindau Protein*, Ub: *Ubiquitin*, HRE: *hypoxia-response element*.

Ein zweiter Weg der Degradation von HIF-1 α erfolgt über die Hydroxylierung durch die HIF-Asparaginy-Hydroxylase *factor-inhibiting-HIF* (FIH). Die Hydroxylierung eines Asparaginrestes von HIF-1 α bewirkt die Blockierung der Interaktion zwischen HIF-1 und dem Ko-Aktivatoren CBP/p300 unter normoxischen Bedingungen ^{182,196,260}. Ebenso wie die Prolylhydroxylasen ist

HIF-1 sowohl eisen- als auch 2-Oxoglutarat-abhängig²⁰⁵. Ascorbinsäure wird auch hier benötigt, um eine spontane Oxidation von Fe^{2+} zu verhindern¹⁶⁷.

Erst kürzlich wurde ein weiterer Degradationsweg von HIF-1 α gefunden: *iron-only hydrogenase like protein 1* (IOP1), das Ähnlichkeiten mit Enzymen der anaeroben Bakterien aufweist und eine bestimmte Eisen-Sulfur-Komponente besitzt. IOP1 wurde in vielen verschiedenen Zelltypen gefunden und seine Ausschaltung führte unter norm- und hypoxischen Bedingungen zu einer erhöhten Expression von HIF-1 α ¹³¹.

Die Eisenabhängigkeit der Prolylhydroxylasen konnte durch eine Zugabe von Eisen auf Zellkulturen und einer daraus resultierenden erhöhten HIF-Degradation gezeigt werden¹⁶⁷. Bereits mehrfach gezeigt wurde eine HIF-Stabilisierung durch Eisenchelatoren wie Desferrioxamin (DFO)²³. Fungitide Eisenchelatoren sind ebenso hochpotente HIF-1-Aktivatoren³⁰⁵.

Unter normoxischen Bedingungen initiieren alle drei PHDs die Degradation von HIF-1 α . Bei Hypoxie (Sauerstoffgehalt unter 1%) oder durch Entzug anderer Kosubstrate oder –faktoren (z. B. Eisenentzug durch Eisenchelatoren) bleiben die α -Untereinheiten unmodifiziert und es kommt zu einer Erhöhung des HIF-1 α -Proteinlevels im Zytoplasma^{142,143}. Die α -Untereinheiten werden aus dem Zytoplasma in den Nukleus transportiert und bilden dort mit der β -Untereinheit den heterodimeren Transkriptionsfaktor HIF-1. Dieses funktionelle Protein bindet an das *hypoxia responsive element* (HRE), die Erkennungssequenz für HIF-1, die sich in den Promotorregionen von hypoxie-induzierbaren Genen befinden²⁷⁰. Für HIF-1 wurden 26 DNA-Bindestellen gefunden, wovon 24 Bindestellen das eigentlich HRE enthalten, das aus der konservierten Sequenz „ACGTG“ besteht⁵⁰.

1.2.2.2 Biologische Bedeutung von HIF-1 und HIF-1-regulierten Genen

Der Transkriptionsfaktor HIF-1 induziert die Transkription von vielen verschiedenen Genen, darunter vor allem die der Angiogenese, um Zellen,

Gewebe und Organismen an hypoxische Zustände zu adaptieren ²⁷⁴. **Tabelle 3** bietet eine Übersicht HIF-1 regulierter Gene.

Tab. 3: HIF-1-regulierte Gene und ihre Funktionen

Funktion	Gene	Quelle	
Entstehung und Entwicklung des vaskulären Systems	<i>Vascular endothelial growth factor</i> (VEGF)	97 324	
	<i>Platelet-derived growth factor</i> (PDGF)	160	
	<i>Placental growth factor</i> (PlGF)	286	
	Endothelin-1	69	
	<i>Endothelial nitric oxide synthase</i> (eNOS)	185	
	<i>Heme oxygenase-1</i> (HO-1)		
Zellproliferation und Apoptose	Adrenomedullin	68	
	<i>Insulin-like growth factor 2</i>	94	
	<i>Insulin-like growth factor-binding protein</i> (IGFBP) -1,-2,-3	151	
	<i>Transforming growth factor-β</i> (TGF-β)	51	
Glukoseaufnahme und Glykogenolyse	GLUT-1 (membranständiger Glukosetransporter)	107	
	<i>Phosphoglycerate kinase-1</i> (PGK-1), Enolase-1, Phosphofruktokinase-L (PFKL), Lactatdehydrogenase-1 (LDH-1), Aldolase A, Pyruvatkinase M	275	
	Hexokinase-2	247	
	Sauerstofftransport	Erythropoetin	107,303,252
		Transferrin	
	Eisenmetabolismus	Transferrin-Rezeptor	252
Kupfermetabolismus	Coeruloplasmin	272	

HIF-1 stellt damit den entscheidenden Transkriptionsfaktor der zellulären Anpassung an Hypoxie dar. Die HIF-abhängige Antwort auf hypoxische Zustände scheint maßgeblich z. B. an der zerebralen und myokardialen Ischämie, pulmonaler Hypertension und Tumorangiogenese beteiligt zu

sein^{271,288}. HIF-1 besitzt außerdem eine lebenswichtige Funktion in der Embryonalentwicklung¹⁷⁴.

Seit geraumer Zeit gibt es außerdem Hinweise, dass HIF-1 in Immunreaktionen verschiedenster Art involviert sein könnte. Die immunmodulatorischen Peptide Interleukin-1 (IL-1) und der Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) stimulieren HIF-1-abhängige Gene unter Normoxie über intrazelluläre Signalkaskaden, u. a. über die Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K/Akt) und die mitogen-aktivierte Proteinkinase (MAPK)^{127,279,325}. *Heat shock proteins* (HSPs) interagieren mit den α - und β -Untereinheiten von HIF-1 als Kofaktoren²¹⁰. Diese These wird außerdem gestützt durch die Tatsache, dass HIF auch in von Bakterien infizierten Zellen aktiviert wird^{161,175,232}.

Vielversprechend klingen Therapieansätze zur pharmakologischen Aktivierung von HIF-1 in ischämischen Erkrankungen sowie die HIF-1 Blockierung in Tumorangiogenese und Tumorwachstum²⁴³.

1.2.3 Das Zytokin *vascular endothelial growth factor* (VEGF)

Vascular endothelial growth factor (VEGF) ist das Schlüsselzytokin physiologischer Angiogenese⁵³. Auch bei der pathologischen Angiogenese, die in Neoplasien, proliferativen Retinopathien und anderen Störungen resultieren kann, wird VEGF eine führende Rolle zugeschrieben⁹⁶.

Der Prototyp der VEGF-Familie, VEGF-A, gehört zu einer Genfamilie mit dem *placental growth factor* (PlGF), VEGF-B, VEGF-C und VEGF-D. VEGF-C und VEGF-D regulieren in erster Linie die lymphatische Angiogenese^{5,176,223}. Natives VEGF ist ein heparin-bindendes homodimeres Glykoprotein mit einer Größe von 45 kDa⁹⁵. Das Humane VEGF-Gen besteht aus acht Exons und sieben Introns; durch unterschiedliches Splicen der Exons kommt es zu vier verschieden langen Isoformen von VEGF (-A, -B, -C und -D)²⁹¹. VEGF bindet an zwei verwandte Rezeptoren: die Tyrosinkinase VEGFR-1 (Flt-1) und VEGFR-2 (KDR/flk-1). Außerdem interagiert es mit einer Familie an Korezeptoren, sogenannten Neuropilinen (NRP1 und NRP2)^{222,280}.

VEGF-mRNA wird unter Hypoxie vermehrt transkribiert. Dies wurde bisher über den Degradationsweg des HIF-1-Transkriptionsfaktors durch sauerstoff-

abhängige Prolyl- und Asparaginyldihydroxylasen erklärt (s. Kapitel 1.2.2.1). Zusätzlich wurde die Induktion von VEGF durch verschiedene, ebenfalls durch HIF-1-regulierte Wachstumsfaktoren beschrieben, darunter TGF- α , TGF- β , *insulin-like growth factor-1* und *platelet-derived growth factor*. Dies lässt einen weiteren parakrinen und autokrinen Regulationsweg unter Hypoxie vermuten^{96,222}. Auch inflammatorische Zytokine wie IL-1 α und IL-6 induzieren eine Expression von VEGF, was die Hypothese bekräftigt, dass VEGF ein wichtiger Mediator in der Angiogenese und Gefäßpermeabilität unter inflammatorischen Bedingungen zu sein scheint²²².

Als ein überlebenswichtiger Faktor für Endothelzellen vermag VEGF sowohl *in vitro* als auch *in vivo* Endothelzellen zum Wachstum anzuregen^{20,96,189}. Zudem besitzt VEGF die Fähigkeit, den Kontakt zwischen Endothelzellen zu lockern und somit die Gefäßpermeabilität zu erhöhen^{87,276}, weswegen dem Zytokin bei entzündlichem Geschehen und anderen pathologischen Umständen große Bedeutung zukommt. Zusätzlich induziert VEGF die endotheliale Fenestrierung in bestimmten Gefäßsystemen und führt in einer dosisabhängigen Weise zu einer Vasodilatation und erhöhter vasaler Permeabilität durch Stimulation der NO-Synthase in Endothelzellen^{217,315}.

2004 wurde der VEGF-Antikörper Bevacizumab von der *Food and Drug Administration, FDA*, der US-amerikanischen Arzneimittelzulassungsbehörde, für die Kombination mit 5-Fluorouracil-Chemotherapy im metastasierten kolorektalen Karzinom zugelassen. Außerdem fand er erfolgreich Anwendung in der Therapie des Nierenzellkarzinoms³¹⁸. Desweiteren wurden zwei VEGF-Rezeptor-Inhibitoren (Sunitinib und Sorafenib) in der Therapie des Nierenzellkarzinoms erfolgreich getestet^{91,215}.

Erst kürzlich konnte gezeigt werden, dass unter septischen Bedingungen im Menschen und der Maus die Serumkonzentration von VEGF und PlGF signifikant erhöht ist und dass das Abfangen dieser freien Zytokine mit Hilfe von löslichen VEGF-Rezeptoren zu einer signifikanten Verbesserung der Überlebensrate führt³¹⁹.

1.2.4 Das Zytokin Adrenomedullin (ADM)

Humanes ADM ist ein 52 Aminosäuren großes Peptid, das an der Regulation einer Vielzahl physiologischer und pathologischer Prozesse beteiligt ist. Es besitzt starke vasodilatatorische Effekte ¹⁶⁶, hemmt die Apoptose von vaskulären Endothelzellen und agiert als ein antiproliferativer Faktor von glatten Muskelzellen ^{156,157}. In Tumorzellen, bei Entzündungen und unter Hypoxie stellte man eine erhöhte Expression von ADM fest, die in Tumorzellen mit einer Neovaskularisation assoziiert war ^{98,102}. Damit spielt ADM eine wichtige Rolle in der Tumorangio-genese, der Gefäßentwicklung sowie bei der Angiogenese der weiblichen Fortpflanzungsorgane ^{56,225}.

Überraschenderweise konnte zusätzlich dazu eine antimikrobielle Tätigkeit von ADM gezeigt werden, was auf eine wichtige Rolle des Zytokins in der Abwehr des Wirtszellorganismus schließen lässt ⁶.

1.2.5 Das Enzym Hexokinase II (HK II)

Hexokinasen sind Enzyme, die Glukose zu Glukose-6-Phosphat phosphorylieren. Damit bewerkstelligen sie den ersten Schritt des Glukoseabbaus und bereiten die Energiegewinnung durch Glykolyse vor. Aufgrund dieser enormen Wichtigkeit existiert das Enzym in allen Spezies auf diesem Planeten, von Bakterien über Hefezellen bis hin zum Menschen. Es wurden vier verschiedene Isoenzyme gefunden, wobei mehrzellige Organismen meist mehr als eine Form besitzen. Die meisten Hexokinasen haben eine Größe von ca. 100 kDa, reguliert werden sie über negative Rückkoppelung durch Glukose-6-Phosphat. Hexokinase II wird in Skelettmuskeln und Fettgewebe exprimiert. Mehrere Autoren haben bereits einen Zusammenhang zwischen dem Transkriptionsfaktor *hypoxia-inducible factor 1* und der Expression von Hexokinase II feststellen können ^{116,201,247,320}.

1.3 Eisenstoffwechsel und Siderophore

Sowohl in Pro- als auch in Eukaryoten spielt Eisen eine wichtige Rolle in zentralen biochemischen Reaktionen und ist damit ein essentielles Spurenelement. Durch sein großes Redoxpotential wird zum wichtigen Kofaktor

vieler Enzyme, darunter Peroxidasen, Katalasen, Nitrogenasen und Cytochrome. Eisen wird für den Elektronentransfer der Atmungskette benötigt, ist an der DNA-Synthese beteiligt und dient dem Metabolismus von Sauerstoff, Wasserstoff und Stickstoff. Durch seinen Einbau in Hämoglobin und Myoglobin ermöglicht es in Vertebraten den Transport und die Bereitstellung von Sauerstoff. In Prokaryoten ist Eisen essentiell für Reduktions- und Oxidationsstoffwechselschritte und sein Mangel führt zu Wachstumshemmung^{71,219,313}.

Im Körper des Säugetier-Wirtes liegt Eisen fast ausschließlich proteingebunden vor, intrazellulär zu fast 70% an Hämoglobin, aber auch an Myoglobin, Ferritin und Hämosiderin. Extrazellulär wird Eisen zum Transport an Glykoproteine wie Transferrin im Serum oder Lactoferrin an der Mukosa gebunden. Diese Eisen(III)-Komplexe sind bei neutralem pH-Wert nicht wasserlöslich und damit für Mikroorganismen nicht zugänglich. Freie Eisenionen liegen nur in einer Konzentration von 10^{-18} mol/l vor⁴⁶. Außerdem entsteht im Falle einer Infektion durch eingewanderte Leukozyten eine Sekretion von Lactoferrin, was durch Bindung zusätzlicher Eisenionen eine weitere Reduktion der Eisenkonzentration zur Folge hat¹⁸⁷ (s. Kapitel **1.3.5**). Diese Konzentration ist zu gering für das Wachstum der meisten Bakterien, deren optimale Wachstumsbedingungen bei einer Eisenkonzentration von 10^{-8} bis 10^{-6} mol/l liegt^{46,309}.

Bakterien haben verschiedene Strategien entwickelt, mit ihrem Wirt in Konkurrenz um das Eisen zu treten³⁷. So können zum Beispiel einige gramnegative Bakterien unter Eisenmangelkonditionen Eisenchelatoren produzieren. Diese werden Siderophore genannt und sind niedermolekulare (0,5-1 kDa), hochaffine Eisenkomplexbildner, die von Mikroorganismen in das umgebende Gewebe sezerniert werden können²²⁰.

Die Siderophore können in drei unterschiedliche Klassen unterteilt werden: (i) Katecholate, (ii) Hydroxamate und (iii) α -Hydroxy/Keto-Carboxylate (gemischte Siderophore). Siderophore entziehen den eisenbindenden Proteinen

des Wirtsorganismus Eisen, um es anschließend über spezielle Rezeptoren und Transportsysteme unter Energieverbrauch in die Zelle zu schleusen^{14,37-39,49,115,209}.

Eisenaufnahmesysteme sind essentiell für die Pathogenität vieler Bakterien^{125,179}. Die Gene des Siderophoraufnahmesystems werden (wie einige Gene für Virulenzfaktoren, z.B. Enterotoxin von EIEC⁹², Hämolyysin¹¹⁴, Exotoxin A von *Pseudomonas aeruginosa*²⁶) über das Fur- (*ferric uptake regulation*) Repressorprotein reguliert. Fur bildet nach Aufnahme von Eisen in die Zelle mit diesem einen Komplex, der als Repressor die Transkription Fur-regulierter Gene unterdrückt^{14,224}. Das Zusammenspiel von Eisenaufnahme und Expression von Virulenzfaktoren unterstreicht die Bedeutung der Eisenaufnahmesysteme in bakteriellen Infektionen (siehe **Tab. 4**).

1.3.1 Yersiniabactin (Ybt)

Yersiniabactin ist ein Siderophor der virulenten *Yersinia*-Spezies *Y. pestis*, *Y. pseudotuberculosis* und *Y. enterocolitica*. Es gehört zur Klasse der α -Hydroxy-/ Keto-Carboxylat Siderophore und hat eine Größe von 482 Da¹¹⁷ (**Abb. 3**).

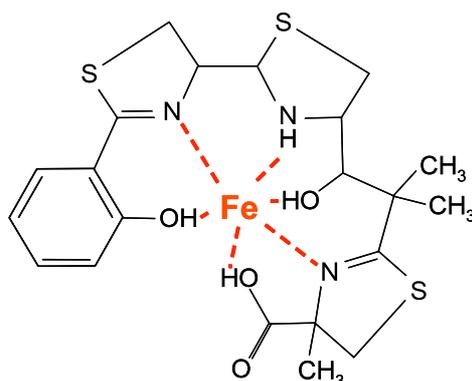


Abb. 3: Das Siderophor Yersiniabactin (Ybt). (4S)-2-[(1S)-1-hydroxy-2-methyl-1-[(4R)-2-[(2E,4R)-2-(6-oxocyclohexa-2,4-dien-1-ylidene)-1,3-thiazolidin-4-yl]-1,3-thiazolidin-4-yl]propan-2-yl]-4-methyl-5H-1,3-thiazole-4-carboxylic acid. Strukturformel (Fe-Form): C₂₁H₂₇FeN₃O₄S₃. (<http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>)

Der Ybt-spezifische Rezeptor ist FuyA^{117,230}. Ybt und sein Rezeptor FuyA werden gemeinsam in einer 36-43 kb großen *high pathogenicity island* (HPI)

kodiert^{125,242}. Diese HPI wurde auch in *E. coli*, *Citrobacter spp.*, *Klebsiella spp.*, *Salmonella enterica* und *Enterobacter spp.* nachgewiesen^{13,108,156,177,265}. Schon früh zeigte sich, dass dieses Gencluster einen entscheidenden Virulenzfaktor darstellt^{55,78,125,242}. So konnte ein Transfer der HPI aus einem hoch-pathogenen *Y. enterocolitica*-Stamm in einen gering-pathogenen Stamm dessen Virulenz für Mäuse erhöhen²²⁹. Auch in *E. coli* ließ sich die virulente Aktivität der HPI beweisen²⁶⁷. Kürzlich wurde Ybt als Virulenzfaktor in *K. pneumoniae*-Pneumonien identifiziert¹⁸⁴. Die Bedeutung des Ybts als Virulenzfaktor wird durch die Tatsache unterstrichen, dass der Rezeptor für Ybt FuyA (*ferric yersiniabactin uptake*) außerdem der Rezeptor für das bakterielle Pesticin von *Y. pestis* ist²⁴². Die Komplexbildungskonstante beträgt für Ybt 10^{-21} und ist damit ähnlich hoch wie bei Transferrin ($K_D 10^{-24}$)¹¹⁷.

1.3.2 Aerobactin (Aeb)

Aerobactin ist ein unter den *Enterobacteriaceae* weit verbreitetes Siderophor und wurde aus *Enterobacter spp.*, *Citrobacter spp.*²¹², *Aerobacter aerogenes*¹⁰⁴, *Shigella spp.*^{183,238,299}, *Salmonella spp.*⁶⁵, *E. coli*⁶⁶, und *K. pneumoniae*^{218,312} isoliert. Aeb gehört zu den Siderophoren mit Hydroxamat-Struktur¹⁰⁴ (**Abb. 4**).

Der Rezeptor für Aeb ist lutA⁸⁰. Das Operon für Aeb besteht aus einem Transportgen (*iut* = *iron uptake transport*) und vier Synthesegenen (*iuc* = *iron uptake chelator A, B, C und D*)^{80,113}. Die Regulation dieser Gene erfolgt über das Fur-Repressorprotein⁹. In *E. coli* sind die Gene für die Aeb-Synthese und den Transport auf dem ColV-Plasmid lokalisiert, das für die Virulenz der Stämme verantwortlich gemacht wird^{149,307}. In *Salmonella spp.* wurden die Aeb-Gene auf dem Flme-Plasmid nachgewiesen⁶⁵, in *S. boydii* auf dem SHI-3-Plasmid²³⁸, in *S. flexneri* und *sonnei* auf der SHI-2-Pathogenitätsinsel^{214,219}.

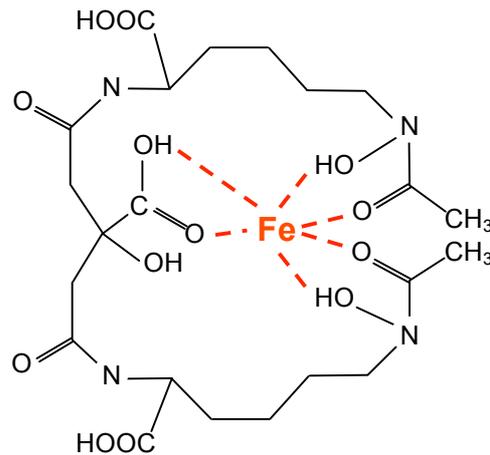


Abb. 4: Das Siderophor Aerobactin (Aeb). 4-[[[(2S)-6-[acetyl-hydroxy-amino]-1-hydroxy-1-oxohexan-2-yl]amino]-2-[2-[[[(2S)-6-[acetyl-hydroxy-amino]-1-hydroxy-1-oxohexan-2-yl]amino]-2-oxoethyl]-2-hydroxy-4-oxobutanoic acid. Strukturformel (Fe-Form): $C_{22}H_{36}FeN_4O_{13}$. (<http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>)

Aeb selbst ist ein wichtiger Virulenzfaktor^{160,219}. So konnte im Tiermodell belegt werden, dass *E. coli*-Stämme, die in der Lage sind, Aeb zu synthetisieren und aufzunehmen, weit aus virulenter sind, als jene, die dies nicht können¹²⁵. Auch in *E. coli*-infizierten Blutproben von septischen Patienten war die Anzahl der Aeb-produzierenden Bakterien weit aus größer als die der Aeb-negativen Stämme^{213,216}. Die Eisenkomplexbildungskonstante von Aerobactin beträgt 10^{-23} .

1.3.3 Salmochelin (Sal)

Salmochelin ist ein speziell von den *Enterobacteriaceae* *S. enterica* gebildetes Siderophor. In *S. enterica* wird es durch Glykosylierung des weit verbreiteten Siderophors Enterobactin zu 2,3-Dihydroxybenzoylserin (DHBS) synthetisiert, damit gehört Sal wie Enterobactin zu den Katecholaten²⁵. Die DHBS-Moleküle werden über Glukose-Brücken miteinander verbunden. Das zweifach C-glykolytierte Enterobactinderivat Salmochelin 4 (Sal4) stellt das wichtigste Salmochelin dar (**Abb. 5**)²⁵.

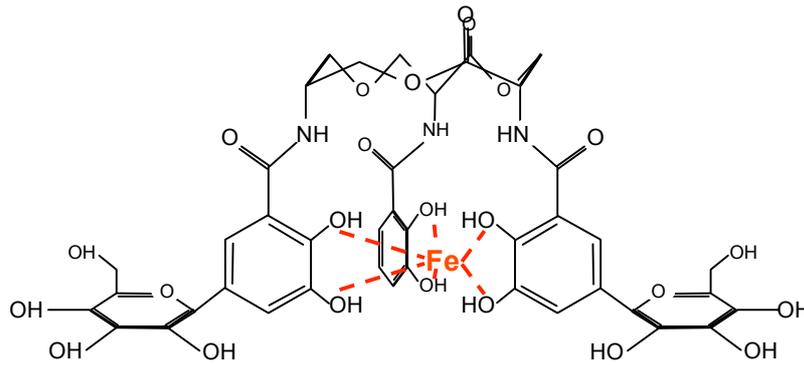


Abb. 5: Das Siderophor Salmochelin (Sal). Zweifach C-glycolysiertes Enterobactin (N-[(1S,5S,9S)-5,9-bis[(2,3-dihydroxybenzoyl)amino]-2,6,10-trioxo-3,7,11-trioxacyclodec-1-yl]-2,3-dihydroxybenzamide). Strukturformel (Fe-Form): $C_{42}H_{28}FeN_3O_{24}$. (<http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>)

Zusätzlich konnten mehrere Hydrolysierungsprodukte des Sal4 differenziert werden, darunter Salmochelin 1 (Sal1), bestehend aus zwei DHBS-Molekülen mit einer Glukosebrücke und Salmochelin 2 (Sal2) aus drei DHBS-Molekülen. Salmochelin 3 wurde bis jetzt nicht näher charakterisiert und besitzt wahrscheinlich keine Siderophor-Aktivität ¹²³. Salmocheline werden hauptsächlich über den Rezeptor iroN in die Bakterienzelle als Sal-Eisen-Komplex aufgenommen, nur ein geringer Anteil wandert über den Cir-Rezeptor. Das iro-Gencluster ist für die Synthese der Sal in *S. enterica* verantwortlich, deshalb produziert die iroBC Mutante H5546 kein Sal ¹²³. Das Genprodukt Sal wurde später auch aus *E. coli* isoliert ²⁹⁵. Sal besitzt ähnlich dem Enterobactin eine hohe Eisenkomplexbildungskonstante von 10^{-52} .

1.3.4 Desferrioxamin (DFO)

Desferrioxamin (DFO) wird von *Streptomyces spp.* ^{15,159,316}, *Enterobacter agglomerans* ²², *Staphylococcus aureus* ²⁶⁹, *Listeria monocytogenes* ¹⁴⁶, *Pseudomonas aeruginosa* ⁷², *Y. enterocolitica* ^{16,266}, *E. coli* ²⁶¹ und *S. enterica* ¹⁶⁵ gebildet und über Membranrezeptoren in die Zelle aufgenommen. An Rezeptoren für DFO wurden bisher FoxA für *Y. enterocolitica* ¹⁶ und FoxB für *E. coli* ²²¹ und *P. aeruginosa* ⁷² identifiziert. DFO gehört wie Aeb in die Gruppe der Siderophore mit Hydroxamatstruktur ^{15,159,316} (**Abb. 6**).

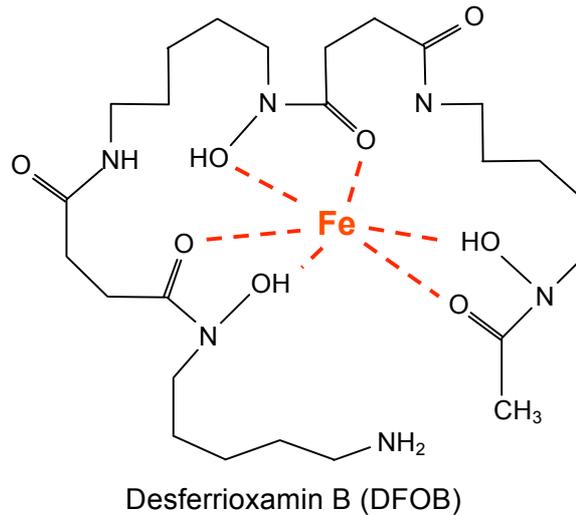


Abb. 6: Das Siderophor Desferrioxamin B (DFOB). (N'-[5-[acetyl(hydroxy)amino]pentyl]-N-hydroxy-N-[5-[[4-hydroxy(methyl)amino]-4-oxobutanoyl]amino]pentyl]butanediamide). Strukturformel (Fe-Form): $C_{21}H_{39}FeN_5O_8$. (<http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>)

Wenn DFO eisengeladen ist, wird es als Ferrioxamin bezeichnet. Die Gene für die DFO-Synthese befinden sich im *des*-Gencluster¹⁵. Eine *des*-negative Mutante von *St. coelicolor* zeigte ein verringertes Wachstum und beweist damit die essentielle Bedeutung des Siderophors für die Entwicklung der Bakterien³¹⁶. Für die Tumorforschung ist dieses Siderophor schon seit langem wegen seiner antineoplastischen Wirkung von Interesse. Therapeutische Effekte konnten in Neuroblastomzelllinien^{18,27,84}, Leberzellkarzinomzellen¹¹⁹, Leukämiezellen^{31,92,317} und Melanomzellen²⁴⁶ nachgewiesen werden. Hierbei konnte eine wachstumshemmende Wirkung sowie eine Steigerung der Differenzierung der Tumorzellen beobachtet werden. Weitere Untersuchungen mit verschiedenen Tumorzelllinien weisen ebenfalls anti-neoplastische Effekte auf^{58,322}.

Die Firma Novartis vertreibt DFO B unter dem Namen Desferal® als Therapeutikum. Anwendung findet es bisher bei chronischer Eisenüberladung (z. B. bei Transfusionshämosiderose, primär genetischer Hämochromatose, akuter Eisenintoxikation). Erhebliche Nebenwirkungen wie z. B. Fieber, Schmerzen und verschiedene Organstörungen schränken die medizinische Anwendung ein. Eine HIF-1-Stabilisierung durch DFO wurde bereits gezeigt²³. Die Eisenbindungskonstante von DFO beträgt 10^{-31} .

Tab. 4: bakterielle Siderophore und ihre Eigenschaften

Siderophor	Bakterielle Herkunft	Chemische Klasse	Rezeptor	Fe-Bindungs-konstante	Quelle
Yersiniabactin	<i>Yersinia spp.</i> (<i>S. enterica</i> u.a.)	α -Hydroxy/Keto-Carboxylaten	FuyA (71 kDa)	10^{-21}	125,242
Aerobactin	<i>Enterobacteriaceae</i> (<i>Shigella spp.</i> , <i>E. coli</i> u.a.)	Hydroxamat	IutA (74 kDa)	10^{-23}	80,104
Salmochelinsäure	<i>S. enterica</i> (<i>E. coli</i>)	Katecholat (2,3-Dihydroxybenzoylserine DHBS)	IroN (78 kDa)	10^{-52}	123
Desferrioxamin	<i>Streptomyces spp.</i>	Hydroxamat	FoxA (77 kDa)	10^{-31}	16,159

1.3.5 Lactoferrin (LF)

Lactoferrin ist ein ca. 80 kDa großes (eisen-ungeladen 76 kDa, eisen-geladen 83 kDa), zur Familie der Transferrine gehörendes Glycoprotein aus 703 Aminosäuren²⁰⁷. Im Körper des Menschen kommt es in Muttermilch, Plasma, Tränen und Speichel und den mukosalen Sekreten des respiratorischen, gastrointestinalen und genitourinalen Traktes vor. In der Muttermilch wird es bei allen Säugetieren außer dem Hund und der Ratte gefunden²⁰⁰. Gebildet wird LF von Epithelzellen und neutrophilen Granulozyten³⁰⁶. Es besitzt eine hohe Affinität zu Eisen und spielt eine wichtige Rolle in der Reduktion der Eisenkonzentration im Rahmen von Infektionen (s. 1.3). Zusätzlich wurde für LF eine direkte antimikrobielle Aktivität nachgewiesen. Zum einen hat LF auf einige Bakterien einen bakteriostatischen Effekt, vermutlich durch die Verminderung der für die Bakterien zur Verfügung stehenden Eisenkonzentration^{1,8,193}. Zum anderen konnte eine direkte bakterizide Aktivität des LF gezeigt werden^{19,43,105}, die auf der Zerstörung der Bakterienmembran durch Einbau der N-terminalen Domäne des LF beruht. Die eigentliche Funktion des LF im Organismus bleibt derzeit unklar. LF-Plasmaspiegel steigen an bei Eisenüberschuss, Entzündungen, Infektionen und Neoplasien¹⁹⁰. LF kann von vielen verschiedenen Zellen über Rezeptoren aufgenommen werden, darunter auch von einigen Bakterien: *Bordetella pertussis*²⁴⁴, *Mycobacterium pneumoniae*²⁹⁴,

Treponema spp.²⁸¹, *Helicobacter pylori*^{83,264} und *Neisseria* spp.²⁶⁴. Die Eisenbindungskonstante K_D beträgt für Lactoferrin 10^{-24} .

1.4 Zielsetzung dieser Arbeit

HIF-1 wird bei *B. henselae* Infektionen aktiviert¹⁶¹. Es stellte sich die Frage, ob diese Aktivierung und die damit verbundene Zellantwort einen *B. henselae*-spezifischen Prozess oder ein generelles Prinzip im Infektionsverlauf mit humanpathogenen Bakterien darstellt. Da die Degradation von HIF-1 durch Fe²⁺-abhängige Prolylhydroxylasen gesteuert wird, lag die Vermutung nahe, dass deren Aktivität durch Eisenchelatoren gehemmt werden kann. Wenn demnach bakterielle Siderophore durch ihre Affinität zu Eisen diesen Degradationsweg inhibieren, könnten sie damit eine Aktivierung von HIF-1 auslösen. Es stellte sich demnach die Frage, ob Bakterien, die bekanntermaßen Siderophore bilden, in Wirtszellen eine HIF-1-Aktivierung hervorrufen könnten.

In dieser Arbeit sollte gezeigt werden, ob *Enterobacteriaceae* HIF-1 aktivieren und ob dieser Mechanismus auf die Bildung von Siderophoren und auf die Verfügbarkeit von Eisen zurückzuführen ist. Insbesondere sollte untersucht werden, ob (i) Wirtszellen nach der Infektion mit den *Enterobacteriaceae* *Y. enterocolitica*, *S. enterica* spp. *enterica* und *E. aerogenes* eine gesteigerte HIF-1-Aktivität zeigen, (ii) in Zellen nach Applikation von isolierten Siderophoren (Yersiniabactin, Salmochelin und Aerobactin) HIF-1 aktiviert wird, (iii) diese Aktivierung von HIF-1 durch Zugabe von Eisen gehemmt werden kann, (iv) eine HIF-1-Aktivierung in den Wirtszellen keinen direkten Erregerkontakt benötigt, sondern auf sezernierte Faktoren zurückzuführen ist (Transwell-Experimente), (v) Siderophoraufnahme-negative *Enterobacteriaceae*-Mutanten von *Y. enterocolitica* und *S. enterica* spp. *enterica* keine Aktivierung von HIF-1 auslösen und (vi) Lipopolysaccharide bei dieser Aktivierung keine Rolle spielen. Die Aktivierung des Transkriptionsfaktors HIF-1 sollte via HIF-1-Immunoblotting nachgewiesen werden. Zusätzlich sollte untersucht werden, ob diese HIF-1-Aktivierung in einer erhöhten Transkription HIF-1-regulierter Gene resultiert (VEGF, ADM, HK II).

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Die in dieser Arbeit verwendeten Geräte wurden von folgenden Firmen bezogen:

Tab. 5: Übersicht über die verwendeten Geräte

Geräte	Firma
Analysenwaage BP610, PT1200	Sartorius, Göttingen
Brutschrank BBD 6220	Heraeus, Hanau
Elektroporationsapparatur	BioRad, München
ELISA-Reader	Tecan, Crailsheim
ELISA-Washer	Tecan, Crailsheim
Eppendorfpipetten und Multistepper	Eppendorf, Hamburg
Filmentwickler Curix 60	AGFA, Köln
Geldokumentation Fluor-S Multimager	BioRad, München
Gelelektrophorese PowerPac 200 u. 1000	BioRad, München
Gelkassette für SDS-Page	BioRad, München
Geltrockner Model 583	BioRad, München
LightCycler System	Roche, Grenzach-Wyhlen
Mikroskope (Zellkultur)	Carl-Zeiss, Jena
Mikrowellenherd Micromat	AEG, Frankfurt a.M.
Neubauer-Zählkammer	Superior, Lauda-Königshofen
PCR-Thermocycler T3	Biometra, Göttingen
pH-Elektrode Model inoLab Level 2	WTW, Weilheim
Photometer Ultrospec 3000 pro	Amersham Pharmacia, Freiburg
Plattenschüttler	Multimed Wicker, Kirchheim/Teck
Rollmischer	Greiner, Nürtingen

Software BioDoc Analyze	Biometra, Göttingen
Software Photoshop 6.0	Adobe Systems, Mountain View, CA, USA
Software Quantity one	BioRad, München
Sterilwerkbank	BDK, Sonnenbühl
Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg
Transilluminator	Biometra, Göttingen
Ultra-Turrax T8-Homogenisator	Ika-Werke, Staufen
Vortexer	Heidolph Instruments, Schwabach
Wasserbad	Memmert, Schwabach
Zentrifugen:	
Eppendorf 5417R	Eppendorf, Hamburg
Multifuge 3 S-R	Heraeus, Hanau
Tischzentrifuge MiniSpin Plus	Eppendorf, Hamburg

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Soweit nicht anders aufgeführt, wurden alle Plastik- und Verbrauchsmaterialien von folgenden Firmen bezogen: Eppendorf, Hamburg; Falcon/Becton-Dickinson, Heidelberg; Greiner, Nürtingen; Nunc, Roskilde, DK.

Tab. 6: Übersicht über sonstige Materialien

Materialien	Firma
Autoradiographie-Filme (Kodak X-OMAT)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Einmalküvetten	Sarstedt, Berlin
Glaskolben und Flaschen	Schott Duran, Mainz
Immobilon-P-Transfermembran (PVDF)	Millipore, Schwabach
LightCycler-Kapillaren	Roche, Grenzach-Wyhlen
Millicell® Filtersysteme 0,4µM	Millipore, Schwabach
Optiplate 96-well Platten	Packard BioScience, Meriden, USA

Parafilm	Pechiney Plastic Packaging, Menasha, USA
Pasteurpipetten	Hilgenberg, Malsfeld
PCR-Gefäße	Fisher Scientific, Schwerte
Whatman Papier	Schleicher & Schüll, Dassel

2.1.3 Chemikalien

Tab. 7: Chemikalien, die in dieser Arbeit verwendet wurden

Chemikalien	Firma
Acrylamid / Bisacrylamid (37,5:1)	Roth, Karlsruhe
APS (Ammoniumperoxodisulfat)	Applichem, Darmstadt
Bradford-Reagenz	BioRad, München
BSA (<i>bovine serum albumin</i>)	Biomol, Hamburg
DAPI (4',6-Diamidino-2-Phenylindol-2HCl)	Merck, Darmstadt
dI-dC	Amersham Pharmacia
DNTPs	Roche, Grenzach-Wyhlen
DTT (Dithiothreitol)	Invitrogen, Karlsruhe
EDTA (Ethylen-Diamin-N,N,N',N'- Tetraacetat)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Ethanol	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
FCS (<i>fetal calf serum</i>)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
FeCl ₃ , Hexahydrat	Merck, Darmstadt
Fluoroprep	BioMérieux, Marcy l'Etoile, F
Igepal CA-630	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Mercaptoethanol	Merck, Darmstadt
Orange G Auftragepuffer	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Panceau-S-Lösung	Serva, Heidelberg
PBS (+CaCl ₂ /MgCl ₂) (<i>phosphate buffered saline</i>)	Gibco, Karlsruhe
PBS (-CaCl ₂ /MgCl ₂) (<i>phosphate buffered saline</i>)	Biochrom, Berlin
PMA (Phorbol 12-Myristat 13-Acetat)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
SDS (<i>sodium dodecyl sulfat</i>)	Roth, Karlsruhe
TEMED (N,N,N',N' Tetramethyl-Ethylen-Diamin)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen

Tris (Tris(hydroxymethyl)aminomethan)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Triton-X	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Trypanblau	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Trypsin	Gibco, Karlsruhe
Tween 20	Merck, Darmstadt

2.1.4 Antibiotika

Tab. 8: Verwendete Antibiotika

Antibiotika	Firma
Gentamicin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Kanamycin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Nalidixin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Penicillin	Biochrom, Berlin
Streptomycin	Biochrom, Berlin

2.1.5 Protein- und DNA-Leiter

Tab. 9: Übersicht über die verwendeten Protein- und DNA-Leiter

Protein- und DNA-Leiter	Firma
Biotinylierte Protein-Leiter	Cell Signaling Technology, Danvers, USA
Page Ruler Protein-Ladder	Fermentas, St. Leon-Rot
1 kb Plus DNA-Leiter	Invitrogen, Karlsruhe

2.1.6 Enzyme

Tab. 10: Verwendete Enzyme

Enzyme	Firma
Reverse Transkriptase: SuperScript II (200U/μl)	Invitrogen, Karlsruhe
<i>Taq</i> -Polymerase	Roche, Grenzach-Wyhlen

2.1.7 Antikörper

Die Antikörper wurden in ELISA und Immunoblots verwendet.

Tab. 11: Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten Antikörper

Antikörper	Firma
Anti HIF-1 α (Maus)	Becton-Dickinson, Heidelberg
Anti-Maus HRP-konjugiert	Dako, Hamburg
Anti-Biotin HRP-konjugiert	Cell Signaling Technology, Danvers, USA
Anti-Aktin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Antin-human-IL-8 (<i>Capture</i>)	Becton-Dickinson, Heidelberg
Anti-human-IL-8-biotinyliert (<i>Detection</i>)	Becton-Dickinson, Heidelberg

2.1.8 Oligonukleotide

Tab. 12: Übersicht über die in der Arbeit verwendeten Oligonukleotide

Bezeichnung	Sequenz (5'→ 3')	Meth.	Herkunft	Qu.
β -Aktin (<i>fw</i>)	TGA CGG GGT CAC CCA CAC TGT GCC CAT CTA	PCR	Qiagen	162
β -Aktin (<i>rev</i>)	TAG AAG CAT TTG CGG TGG ACG ATG GAG GG	PCR	Qiagen	162
HK II (<i>fw</i>)	TCA ACC CCG GCA AGC AGA GG	PCR	Metabion	233
HK II (<i>rev</i>)	CCG CCG GGC CAC CAC AGT	PCR	Metabion	233
ADM (<i>fw</i>)	AAG AAG TGG AAT AAG TGG GCT	PCR	Metabion	206
ADM (<i>rev</i>)	TGG CTT AGA AGA CAC CAG AGT	PCR	Metabion	206
β_2 -M (<i>fw</i>)	GAT GAG TAT GCC TGC CGT GTG	LC		310
β_2 -M (<i>rev</i>)	CAA TCC AAA TGC GGC ATC T	LC		310
β_2 -M (<i>TaqMan</i>)	CCT CCA TGA TGC TGC TTA CAT GTC TCG ATC CC	LC		310
VEGF (<i>fw</i>)	CCC TGA TGA GAT CGA GTA CAT CTT	LC	TIB Molbiol	310
VEGF (<i>rev</i>)	ACC GCC TCG GCT TGT CAC	LC	TIB Molbiol	310
VEGF (<i>TaqMan</i>)	ATC CTG TGT GCC CCT GAT GCG ATG CGG T	LC	TIB Molbiol	310

LC: Light cyclers

Für die IL-8-Real-Time-PCR wurden folgende Kits verwendet:

Mastermix:

LightCycler FastStart DNA Master SYBR Green I; Roche, Grenzach Wyhlen

Primer:

Interleukin-8 (IL-8) LightCycler-Primer Set;

Glukose-6-Phosphat Dehydrogenase (G-6-PDH) LightCycler-Primer Set
(Roche, Grenzach-Wyhlen).

2.1.9 Medien

Die Medien für Zellkulturen wurden steril angesetzt und bei +4°C gelagert. Vor Benutzung erfolgte die Inaktivierung des fötalen Kälberserums (FCS) 30 min im Wasserbad bei 60°C. Für Infektionsexperimente wurden Medien ohne Antibiotika benutzt.

Tab. 13: Übersicht über die in der Zellkultur eingesetzten Medien

Zellkulturmedium für HeLa-Zellen (supplementiertes RPMI)	RPMI 1640 2 mM L-Glutamin 10% FCS 100 U/ml Penicillin 10 mg/ml Streptomycin
---	---

Tab. 14: Übersicht über die in der Bakterienkultur eingesetzten Medien

Columbia-Agarplatten mit 5% Schafsblut	Becton-Dickinson, Heidelberg
Einfriermedium für Bakterien	20% Glycerol in LB-Medium
LB (Luria-Bertani)-Medium	5 g NaCl 5 g Hefeextrakt 10 g Trypton ad 1 l H ₂ O, pH 7,4-7,6
Leifson-Platten (DCLS-Agar: Desoxycholat-Citrat-Lactose-Saccharose-Agar)	Merck, Darmstadt

2.1.10 Zelllinien

Tab. 15: Übersicht über die in dieser Arbeit eingesetzten Zelllinien

Zelllinie	Zelltypus
HeLa229	Humane Epithelzelllinie aus stark proliferierendem Zervixkarzinom ATCC (CCL-2.1)

2.1.11 Bakterienstämme

Tab. 16: Übersicht über die in dieser Arbeit eingesetzten Bakterienstämme

Bezeichnung	Referenz
<i>B. henselae</i> Marseille	85
<i>Y. enterocolitica</i> WA-C (plasmid cured)	126
<i>Y. enterocolitica</i> $\Delta irp - 1$	40
<i>S. enterica</i> spp. <i>enterica</i> (ATCC14028)	123
<i>S. enterica</i> spp. <i>enterica</i> $\Delta iroBC$	123
<i>E. aerogenes</i> 62-I	104

2.1.12 Siderophore

Tab. 17: Siderophore, die in dieser Arbeit verwendet wurden

Bezeichnung	Herkunft / Quelle
Yersiniabactin	¹¹⁷ , persönl. überlassen v. Dr. A. Rakin, München
Salmochelin	¹²³ , persönl. überlassen v. Prof. Dr. K. Hantke, Tübingen
Aerobactin	EMC microcollections, Tübingen
Desferrioxamin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen

2.1.13 Puffer und Lösungen

Tab. 18: Puffer zur Herstellung von Proteinextrakten

Puffer	Zusammensetzung
EB-Puffer für Zelllyse	7 M Urea 1% SDS 10% Glycerol 10 mM Tris/HCl pH 6,8 1 Tablette Complete Protease Inhibitor™ Cocktail (Roche) 0,5 mM PMSF 5 mM DTT ad 50 ml H ₂ O

Tab. 19: Puffer und Lösungen für SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und WB

Puffer / Lösung	Zusammensetzung
SDS-Probenpuffer (5x) (Laemmli Puffer)	312,5 mM Tris/HCl (pH 6,8) 50% Glycerin 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 H ₂ O

Lösung für Sammelgel (2 Gele)	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 H ₂ O
Lösung für 8%-iges Trenngel (2 Gele)	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 H ₂ O
Blot-Puffer (10x)	25 mM Tris 192 mM Glycin ad 1000 ml H ₂ O
Waschpuffer (10x)	10 mM Tris/HCl pH 7,4 0,15 mM NaCl 0,2% Tween 20 ad 2000 ml H ₂ O
Blockpuffer	3% bzw. 5% Magermilchpulver in Waschpuffer

Tab. 20: Lösungen zum Entwickeln von Westernblots: Enhanced Chemiluminescence (ECL)-Detektion

Lösung	Zusammensetzung
Luminol	0,22 g Luminol ad 5 ml DMSO
Cumarinsäure	0,075 g ad 5 ml DMSO
Lösung A	250 µl Luminol 220 µl Cumarinsäure ad 25 ml Tris/HCl (100 mM, pH 8,5)
Lösung B	15 µl H ₂ O ₂ (30%) ad 25 ml Tris/HCl (100 mM, pH 8,5)

Tab. 21: Übersicht über Puffer und Lösungen für Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Puffer	Zusammensetzung
5x TBE-Puffer	54 g Tris-Base 27 g Borsäure 20 ml 0,5 M EDTA, pH 8,0 ad 1000 ml H ₂ O
Lösung für 5%-iges nicht denaturierendes Polyacrylamidgel	6 ml 5x TBE 10 ml 30% Acrylamid-Stammlösung 500 µl 10% APS 50 µl TEMED 44 ml H ₂ O

Tab. 22: Übersicht über Puffer und Lösungen für IL-8 ELISA

Puffer	Zusammensetzung
Waschpuffer	PBS + 0,05% Tween 20
Blockierungspuffer	PBS + 10% FCS
Bindungspuffer	0,1 M Na ₂ HPO ₄ (pH 9)
Substratpuffer	0,05 M NaHCO ₃ (pH 8,09) 0,05 M Na ₂ CO ₃ (pH 11,3) 0,5 mM MgCl ₂
Konjugat	4,5 µl Streptavidin 4,5 µl Biotin-alkalische Phosphatase 491 µl PBS ad 25 ml PBS
Entwicklerlösung	1 mg PNPP/ml Substratpuffer

2.1.14 Kommerzielle Kits

RNeasy Mini Kit	Qiagen, Hilden
DuoSet® ELISA mouse VEGF	R&D Systems, Wiesbaden-Nordenstadt
Quantikine Immunoassay human VEGF	R&D Systems, Wiesbaden-Nordenstadt

2.1.15 Sonstiges

Tab. 23: Sonstige Materialien, die in dieser Arbeit verwendet wurden

Aufreinigungssäulen: Push Column Beta Shield Device™	Stratagene, Amsterdam, NL
Complete Protease Inhibitor™	Roche, Grenzach-Wyhlen
Lactoferrin, humanes	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
LPS (Lipopolysaccharide von <i>E. coli</i> 055:B5)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Magermilchpulver	Sucofin, Düsseldorf

RNAse Away	Molecular BioProducts, San Diego, CA, USA
RNAasin (40 U/ μ l)	Promega, Madison, USA
Streptavidin für IL-8 ELISA	Dako, Hamburg

2.2 Methoden

2.2.1 Bakterien

In dieser Arbeit wurden die folgenden Bakterienstämme verwendet: *B. henselae* Marseille⁸⁵, plasmid-cured *Yersinia enterocolitica* WA-C¹²⁶ und *Y. Enterocolitica* Δ -irp1⁴⁰ (hier als “ Δ Ybt” bezeichnet, zur Verfügung gestellt von A. Rakin, München), *S. enterica* spp. *enterica* (ATCC14028) und *S. enterica* spp. *enterica* Δ iroBC¹²³ (hier als “ Δ Sal” bezeichnet, zur Verfügung gestellt von K. Hantke, Tübingen) und *E. aerogenes* 62-I¹⁰⁴.

2.2.1.1 Herstellung von Bakterienkulturen für Infektionsexperimente

B. henselae wurde auf Columbia-Agarplatten mit 5% Schafsblut bei 37°C, 5% CO₂ und 95% relativer Luftfeuchtigkeit kultiviert. Für Infektionsexperimente fanden *B. henselae* aus vorgefertigten Bakterienstocks (siehe 2.2.1.2) Verwendung. Nach dem Auftauen der tiefgefrorenen Bakterienaliquots konnten die Bakterien pelletiert (5 min, 2700 g) und im jeweiligen Zellkulturmedium auf die gewünschte Konzentration gebracht werden.

Y. enterocolitica WA-C wurde unter Zugabe von 5 µg/ml Nalidixin (Nal) kultiviert, *Y.e. Δ irp1* mit 5 µg/ml Nal und 50 µg/ml Kanamycin (Kan). Die Bakterien wurden über Nacht bei 27°C in LB-Medium, anschließend 2 h bei 37°C kultiviert, mit PBS gewaschen und auf die entsprechende Infektionsdosis eingestellt²⁹.

S. enterica spp. *enterica* und *E. aerogenes* wurden bei 37°C über Nacht unter Schütteln angezogen und anschließend 2 h bei 37°C ohne AB kultiviert. Die Kultivierung von *S. enterica* spp. *enterica* Δ iroBC erfolgte unter Zugabe von 50 µg/ml Kanamycin.

2.2.1.2 Herstellung von Bakterienstocks

Zur Herstellung von *B. henselae*-Bakterienstocks wurden die Bakterien nach 4-5-tägiger Kultivierung bei 37°C, 5% CO₂ auf Columbia-Blutagarplatten mit Wattestäbchen abgenommen und in PBS resuspendiert. Nach dem Waschen der Bakterien mit PBS (10 min, 4000 rpm, 4°C) und der Resuspension in

Einfriermedium startete das Einfrieren bei -80°C . Zur Bestimmung der Bakterienkonzentration im Stock wurden serielle Verdünnungsreihen des Bakterienstocks auf Columbia-Blutagarplatten ausplattiert und die Keimzahl nach 14 Tagen Kultivierung ermittelt.

2.2.2 Zellkulturen

2.2.2.1 Kultivierung von HeLa-Zellen

Die humane Epithelzelllinie HeLa 229 stammt von einem stark proliferierenden Zervix-Karzinom ab und wurde im Brutschrank bei 37°C und 5% CO_2 bei 95% relativer Luftfeuchtigkeit inkubiert. Alle Materialien und Lösungen wurden vom Hersteller steril bezogen und jeder Arbeitsschritt der Zellkulturversuche wurde unter der Sterilbank durchgeführt. Als Zellkulturmedium wurde supplementiertes RPMI 1640 verwendet. Die Zellen adhärten am Polystyren-Boden der Zellkulturflaschen und bildeten nach wenigen Tagen einen konfluenten Monolayer. Zwei- bis dreimal pro Woche wurden die Zellen kurz mit 2 ml Trypsin gewaschen, 2 min inkubiert und dann mit 5-8 ml Zellkulturmedium neutralisiert. Die gelösten Zellen wurden mehrfach suspendiert, zu je 1-4 ml in neue Zellkulturflaschen gegeben und auf 15 ml mit Zellkulturmedium aufgefüllt. Nach spätestens drei Tagen wurde ein Mediumwechsel vorgenommen.

2.2.2.2 Bestimmung der Lebendzellzahl und Aussaat für Infektionsexperimente

Je nach Ansatz des Versuches wurden am Vortag der Infektion 5×10^4 Zellen im 96-well-Format, 1×10^5 Zellen im 24-well-Format oder 1×10^6 Zellen im 6-well-Format ausgesät. Dazu wurden die adhären Zellen mit Trypsin gelöst und mit suppl. RPMI 1640 resuspendiert. Die Zellen wurden mit einer 1:10 Verdünnung mit Trypan-Blau angefärbt und in eine Neubauer-Zählkammer gegeben. Die nicht blau gefärbten und demnach lebenden Zellen wurden in den vier Großquadranten ausgezählt, der Durchschnitt mit 1×10^5 Zellen/ml multipliziert (1×10^4 Zellen/ml für die Größe der Kammer und weitere 1×10 für die Verdünnung mit Trypan-Blau). Im 96-well-Format wurde das well auf 200 μl , im

24-well Format auf 1 ml und im 6-well-Format auf 4 ml mit Zellkulturmedium aufgefüllt und die Platten im Brutschrank ca. 24 h inkubiert.

2.2.3 Infektionsexperimente

Zwei Stunden vor Infektion wurde das Kulturmedium durch die entsprechende Menge an Infektionsmedium RPMI 1640 + 1% L-Glutamin ohne FCS und ohne AB ersetzt. Ein zweiter Wechsel des Infektionsmediums wurde etwa eine Stunde vor Infektion durchgeführt.

Als Negativkontrollen dienten in allen Experimenten Zellen, die mit reinem Medium inkubiert wurden, als Positivkontrollen wurde entweder Phorbol-12-Myrisat-13-Acetat (PMA, 25 ng/ml) oder DFO (0,02-0,2 mM) verwendet.

2.2.3.1 Infektion mit *B. henselae* und *Enterobacteriaceae*

Für die Infektion mit *Enterobacteriaceae* wurden die Bakterien zwei Stunden vor der Infektion verdünnt und erneut kultiviert, um sie in die Phase des exponentiellen Wachstums zu überführen.

Unmittelbar vor der Infektion wurden die Bakterien gewaschen und in frischem PBS resuspendiert. Die Bestimmung der Bakterienanzahl in der Suspension wurde über die optische Dichte (OD) bestimmt. Hierbei entspricht eine OD_{600nm} von 1,0 einer Konzentration von $\sim 1 \times 10^9$ Bakterien pro ml. Die Bakterien wurden anschließend in der gewünschten MOI (*multiplicity of infection*) auf die HeLa-Zellen gegeben. *B. henselae* wurde in einer MOI von 500 und 1000 verwendet, die *Enterobacteriaceae* *Y. enterocolitica*, *S. enterica* und *E. aerogenes* jeweils mit einer MOI von 20. Die MOI wurde durch serielles Ausplattieren kontrolliert. Zur Infektion wurden die Bakterien 5 min bei 300 g auf die Zellkulturen zentrifugiert.

Für die Infektionen mit den Siderophoraufnahme-negativen Stämmen *Y. e. Δirp-1* (*Y.e. ΔYbt-*) und *S. e. spp. enterica ΔiroBC* (*S.e. ΔSal-*) und deren Wildtypen *Y. e. WA-C plasmid cured* (*Y.e.*) und *S. e. spp. enterica ATCC14028* (*S.e.*) wurden Filtersysteme verwendet. Wegen der langen Inkubationszeit für die ELISAs von 16 Stunden sollte ein direkter Kontakt der Bakterien mit den

HeLa-Zellen vermieden werden, um Zelltod zu verhindern. Hierfür wurden die 0,4 μM dichten Filtersysteme der Firma Sigma verwendet (**Abb. 7**).

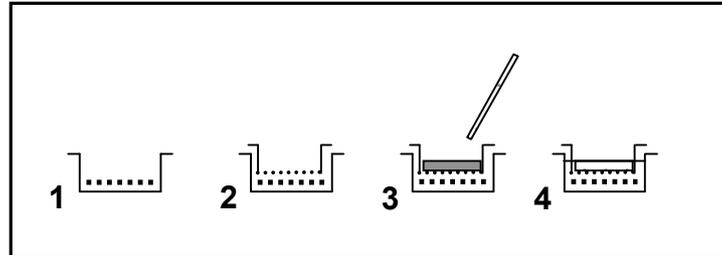


Abb. 7: Anwendung von Filtersystemen in Infektionsexperimenten. (1) Die Zellen wurden ausgesät und über Nacht inkubiert. (2) Vor Infektion wurde das Medium abgesaugt und der Filter in das well eingesetzt. (3) Einfüllen des Infektionsmediums mit Bakterien oder anderen Zusätzen in den Filter. (4) Das Medium verteilt sich im gesamten well. Bakterien sind von den Zellen durch die Filtermembran getrennt (Porengröße: 0,4 μM).

Alle Arbeitsschritte wurden steril ausgeführt, die Bakterienzahl wie oben beschrieben bestimmt, das Medium abgesaugt, der Filter eingehängt und die Bakterien im Infektionsmedium über den Filter in das well gegeben. Auf eine Zentrifugation wurde verzichtet, die MOI von 20 wurde anschließend durch serielles Ausplattieren überprüft. Auch für die Negativ- und Positivkontrolle wurden die Filter verwendet und dabei das unbehandelte bzw. mit DFO (200 μM) versetzte Infektionsmedium auf die Filter gegeben. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Filter aus den wells entfernt und der Zellkulturüberstand für die weitere Auswertung abgenommen.

2.2.3.2 Behandlung von HeLa-Zellen mit Siderophoren, Lipopolysacchariden und Lactoferrin

Siderophore wurden in destilliertem H_2O gelöst und in Zellkulturen in einer Konzentration von 200 μM verwendet. FeCl_3 (Hexahydrat, Merck, Darmstadt) wurde ebenfalls in destilliertem H_2O gelöst und in einer Konzentration von 200 μM verwendet. Für die Eisensättigung wurden die Siderophore (Ybt, Aeb, Sal und DFO) mit der gleichen Konzentration an FeCl_3 für 1 h bei RT inkubiert. Unbehandelte und mit FeCl_3 (200 μM) gesättigte Zellen wurden als

Negativkontrollen verwendet, DFO (200 μM) diene als Positivkontrolle. Die Inkubationszeit betrug je nach Versuch 6 h, 16 h oder 24 h.

Lipopolysaccharid (LPS) wurde in der Konzentration 1 $\mu\text{g/ml}$ in Infektionsmedium vorpipettiert und eine Stunde bei RT inkubiert. Lactoferrin wurde in einer Konzentration von 10 μM verwendet und ebenfalls in Infektionsmedium vorpipettiert, bevor es auf die Zellen gegeben wurde.

2.2.4 Proteinbiochemische Methoden

Mit Hilfe des Immunoblots wurde in dieser Arbeit die Aktivierung des Transkriptionsfaktors HIF-1 α bestimmt. Hierzu wurden zuerst die Proteine aus den Zellen gelöst und anschließend nach ihrer Masse durch eine Gelelektrophorese getrennt.

2.2.4.1 Gewinnung von Proteinextrakten aus Zelllysaten

Nach 6 h Inkubation wurde der Zellkulturüberstand abgenommen und die Zellen anschließend mit 5 ml eiskaltem PBS pro well gewaschen. Es wurden nun 250 μl Extraktionspuffer (EB-Puffer s. **2.1.12**) in jedes well gegeben und die Zellen mit Hilfe eines Zellspatels gelöst. Das Zelllysat wurde mit einer Pipette aufgenommen, in ein Eppendorf-Gefäß gegeben und dann sofort auf Eis gestellt. Nach kurzer Zentrifugation bei 4°C wurde es mit dem Ultra-Turrax 5 s bei voller Geschwindigkeit homogenisiert und im Anschluss im Heizblock 10 min auf 70°C erhitzt. Die Proben wurden bei -80°C eingefroren und gelagert.

2.2.4.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Auftrennung von Proteinfractionen erfolgte mittels diskontinuierlicher SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese. Bei diesem Verfahren werden Proteine unter denaturierenden Bedingungen nach ihrer Masse getrennt. SDS (Sodium Dodecyl Sulfat) als anionisches, amphiphatisches Detergens bindet im Verhältnis 1:1,4 pro Aminosäure an die kationischen Reste der Proteine und verleiht ihnen damit eine negative Überschussladung, die sich proportional zur Größe des Proteins verhält und die die eigene Ladung der Proteine vernachlässigbar macht. Außerdem nehmen alle SDS-denaturierten Proteine

eine stäbchenförmige Konformation ein, was den Einfluss der nativen Oberflächenstruktur auf die Wanderungseigenschaften der Proteine aufhebt. Daher wandern die Proteine im elektrischen Feld zur Anode, wobei ihr Laufverhalten während der Elektrophorese ausschließlich von ihrer Größe abhängt. Die Trennung der Proteine im Gel erfolgt proportional zum Logarithmus ihres Molekulargewichtes⁶⁷, wodurch der Trennbereich über die Acrylamid/Bisacrylamid-Konzentrationen im Gel kontrolliert werden kann. Die Acrylamid-Konzentration kann zwischen 2 % und 30 % variiert werden und bestimmt die Porengröße des Gels. Zur optimalen Darstellung von HIF-1 α mit einer Molekülgröße von 120 kDa wurde ein Trenngel mit einer 8-%igen Acrylamid-Konzentration gewählt.

Zuerst wurde das Trenngel gemischt und sofort in eine Vertikalkammer gefüllt, sodass diese bis zu 2/3 gefüllt war. Das Trenngel wurde mit Ethanol überschichtet, um eine glatte Oberkante zu erhalten und für 15 min polymerisiert. Nun wurde das Sammelgel gemischt, der Ethanol aus der Vertikalkammer entfernt, sofort das Sammelgel bis an den oberen Rand der Kammer eingefüllt und ein 10-well-Kamm eingeführt. Das Gel wurde abermals für 15 min polymerisiert. Anschließend erfolgte die Probenauftragung. Hierzu wurden die Proben 5:1 mit Lämmli-Puffer verdünnt. In die beiden äußeren wells wurde je ein Bench-Marker und ein Biotin-Marker gegeben. Die SDS-Elektrophorese wurde nun ca. 30 Minuten bei konstanten 30 mA pro Gel in SDS-Laufpuffer durchgeführt¹⁷⁸.

2.2.4.3 HIF-1 α -Immunoblot

Aufgrund der negativen Ladung des gebundenen SDS können mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennte Proteine elektrophoretisch weiter auf eine PVDF-Membran übertragen werden, wobei das SDS im Laufe des Transfers abgetrennt wird. Anschließend können geblottete Proteine durch eine spezifische und sehr sensitive Antikörperreaktion nachgewiesen werden²⁹³, wobei bis zu 0,1 ng Protein detektiert wird.

Für den Proteintransfer von SDS-Gelen auf eine PVDF-Membran wurde die Membran zuerst kurz in Methanol eingelegt, daraufhin für 2 min in H₂O dest.

gewaschen und in Blot-Puffer äquilibriert; anschließend wurden Gel und Membran übereinander gelegt und von beiden Seiten mit je einer Lage Whatman-Filterpapier und je einem Schwamm bedeckt. Diese Schichtung wurde in eine Bio-Rad-Blotkammer eingesetzt. Der Proteintransfer erfolgte in Blot-Puffer bei einer konstanten Stromstärke von 300 mA für 60 min.

Zum Fixieren der Banden wurde die Membran nach erfolgtem Blot kurz in Methanol getaucht und vor den weiteren Schritten luftgetrocknet. Die Effizienz des Transfers wurde durch reversible Proteinfärbung mit Ponceau S-Lösung überprüft; der Farbstoff wurde durch Abspülen mit H₂O dest. anschließend wieder entfernt. Nach kurzem Waschen mit Waschpuffer wurde die PVDF-Membran zur Blockierung von freien Bindungsstellen für 1 h bei Raumtemperatur in Blockpuffer (3% MM) auf einem Gelschüttler inkubiert. Nach Blockierung wurde sie über Nacht bei + 4°C auf einem Gelschüttler mit anti-HIF-1 α -Antikörper (1:1000 verdünnt in Blockpuffer) inkubiert. Nach Waschen der Membran mit Waschpuffer (3 x 10 min, RT) wurde die Membran mit einem Sekundär-Antikörper, der mit Meerrettich-Peroxidase konjugiert war (anti-Maus, 1:1000 verdünnt in Blockpuffer), für 1 h auf einem Gelschüttler inkubiert. Nach erneutem Waschen (3 x 10 min mit Waschpuffer) wurde die Membran mit ECL-Reagenz ca. 2 min inkubiert und im Anschluss daran zwischen zwei Tageslichtprojektor-Folien in eine Entwicklerkassette gelegt. Zur Detektion der Chemolumineszenz wurde im Dunkeln für 2 - 10 min ein Röntgenfilm eingelegt, der anschließend maschinell entwickelt wurde.

2.2.5 Zytokinbestimmung aus Zellkulturüberständen

Zum Nachweis der Zytokine in Zellkulturüberständen wurde ein VEGF-ELISA bzw. ein IL-8-ELISA benutzt. Der *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) eignet sich durch seine hohe Sensitivität dazu, im Zellkulturüberstand die geringen Konzentrationen der Proteine im Pikogrammbereich quantitativ nachzuweisen. Dabei reagiert das zu messende Zytokin in einer Antigen-Antikörper-Reaktion als Antigen mit einem monoklonalen Primärantikörper (*capture antibody*), der an einer Mikrotiterplatte anhaftet. Ein hinzugegebener, enzymgekoppelter Sekundärantikörper (*detection antibody*) bindet ebenfalls an

das Zytokin und katalysiert gleichzeitig eine Farbreaktion. Die Intensität der Farbreaktion ist proportional zur Zytokinkonzentration und wird photometrisch bestimmt. Anhand einer Standardkurve mit rekombinanten Zytokinen wird die absolute Konzentration ermittelt.

2.2.5.1 Gewinnung von Zellkulturüberständen

Nach 16 h oder 24 h wurde der Zellüberstand mit einer Pipette abgenommen und in ein Eppendorf-Gefäß gegeben. Nach einer Zentrifugation von 2 min bei 14.000 rpm und 4°C wurde erneut der Überstand abgenommen und bei -20°C gelagert.

2.2.5.2 VEGF-ELISA

Zum Nachweis von VEGF mittels VEGF-ELISA (DuoSet® ELISA Development System) im Überstand wurden zunächst nach Protokoll der Herstellerfirma (R&D Systems) 96-well ELISA-Platten mit je 100 µl/well monoklonalem Primärantikörper (*capture antibody*) über Nacht beschichtet. Am nächsten Tag wurden die Platten gewaschen und mit *Reagent Diluent* für 1 h bei Raumtemperatur blockiert. Danach wurde der Waschschrift wiederholt, die Platten über Nacht unter der Sterilbank getrocknet und bei 4°C aufbewahrt.

Zu Beginn des ELISAs wurden zuerst je 100 µl einer Standard-Verdünnungsreihe oder 100 µl der Zellkulturüberstände/well pipettiert und für 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit Waschpuffer wurde der ELISA für weitere 2 h mit je 100 µl *Detection Antibody* inkubiert. Danach wurde der Waschschrift wiederholt und je 100 µl Streptavidin-HRP/well pipettiert und 20 min inkubiert. Anschließend wurden 100 µl einer Entwicklerlösung hinzugegeben. Nach einer Inkubation von ca. 5 min wurde die Reaktion mit 50 µl Stopplösung beendet. Die Absorption wurde photometrisch bei einer Wellenlänge von 450 nm mit einer Referenzwellenlänge von 540 nm im ELISA-Photometer bestimmt und anhand des Standards die jeweilige Zytokinkonzentration ermittelt.

2.2.5.3 IL-8 ELISA

Zur Vorbereitung wurden zunächst die Wells der ELISA-Mikrotiterplatten über Nacht bei 4°C mit je 50 µl eines monoklonalen Primärantikörpers (3 µg/ml in 0,1 M Na₂HPO₄, pH 9) inkubiert²⁶⁸. Am nächsten Tag wurden ungebundene Antikörper durch viermaliges Waschen mit Waschpuffer entfernt. Durch Inkubation mit einem Blockierungspuffer (für 2 h bei RT) wurden unspezifische Bindungsstellen blockiert. Nach erneutem viermaligem Waschen mit Waschpuffer wurden 100 µl der jeweiligen Zellkulturüberstände in die einzelnen Wells pipettiert. Als Standard diente eine Verdünnungsreihe des rekombinanten humanen IL-8 (0-800 pg/ml, verdünnt in Kulturmedium). Die Platten wurden über Nacht bei 4°C inkubiert, um eine Antigen-Antikörperbindung zu erreichen. Am nächsten Tag wurde erneut viermal mit Waschpuffer gewaschen. Nach 1-2 h Inkubation mit biotinyliertem Sekundärantikörper (0,5 µg/ml; 100 µl pro well) bei RT und anschließendem viermaligen Waschen mit Waschpuffer wurden je 50 µl Konjugat auf die einzelnen Wells verteilt und für 1 h bei 37°C inkubiert. Nach einem letzten Waschschrift wurde PNPP in Substratpuffer zu einer Endkonzentration von 1 mg/ml aufgelöst und pro well 50 µl pipettiert. Nach einer 20-minütigen Inkubationszeit bei 37°C im Dunkeln wurde die Zytokinkonzentration photometrisch bei einer Wellenlänge von 405 nm mit einer Referenzwellenlänge von 490 nm mit dem ELISA-Reader bestimmt.

2.2.6 Molekulargenetische Methoden

Um die zu einem bestimmten Zeitpunkt in der Zelle in Produktion befindlichen bzw. aktivierten Proteine zu bestimmen, wurden die Methoden der semiquantitativen Polymerase-Kettenreaktion (PCR) und Gelelektrophorese sowie der quantitativen Real-Time PCR (RT-PCR) gewählt. Durch ihre hohe Sensitivität erlauben sie eine genaue Auswertung der bei Zellkulturversuchen nur in geringer Quantität vorhandenen mRNA.

Die Proteinexpression in Eukaryoten spielt sich vereinfacht wie folgt ab:

Im Zellkern wird nach Aktivierung der RNA-Polymerase durch Transkriptionsfaktoren, die DNA der spezifischen Gene abgelesen und in eine

einsträngige RNA transkribiert. Diese RNA verlässt anschließend den Zellkern und bringt so die Geninformation zu den Ribosomen im Zytosol, wo sie als Matrize zur Proteinsynthese dient. Deshalb wird sie auch als *messenger* RNA (mRNA) bezeichnet. Die beiden einzelnen Schritte, die zur Proteinsynthese notwendig sind, lauten somit Transkription und Translation. Die Menge an mRNA eines bestimmten Gens zeigt demnach den Aktivierungsgrad einer Zelle auf Transkriptionsebene für ein bestimmtes Gen. Die molekulargenetischen Methoden der PCR quantifizieren diese Menge an mRNA und damit den Aktivierungsgrad der Zelle.

Die im Folgenden beschriebenen Schritte sind notwendig, um die mRNA und damit den transkriptionellen Aktivierungszustand der Zellen darzustellen:

1. Isolierung der Gesamt-RNA
2. Quantifizierung der Gesamt-RNA
3. Reverse Transkriptase-Reaktion
4. Quantifizierung der mRNA-Transkripte
 - a. Semiquantitative Polymerase Kettenreaktion
 - b. Quantitative Real-Time-PCR

2.2.6.1 Arbeiten mit RNA

Da RNAsen ubiquitär verbreitet sind und RNA selbst schon sehr instabil ist, sollte beim Umgang damit besondere Sorgfalt angewandt werden. So erfolgten alle Arbeitsschritte auf Eis und es wurde nur mit frischen Handschuhen und Materialien gearbeitet, die RNase-frei waren. Arbeitsflächen und potentiell kontaminierte Materialien wurden mit RNase-Away gereinigt. Das Wasser, das mit RNA in Berührung kam, wurde zuvor mit Diethyl-Pyrocbonat (DEPC) behandelt (im Folgenden „H₂O-DEPC“ genannt), um RNAsen zu inaktivieren. Die Lagerung von RNA-Isolaten erfolgte bei – 80 °C und ihre Konzentration wurde nach längerer Aufbewahrung neu vermessen.

2.2.6.2 RNA-Isolierung

Die Isolierung der RNA aus dem Gesamtzell-Lysat der im 6-well-Format ausgesäten und infizierten Zellen (1×10^6 Zellen/well) wurde nach einer

Inkubation von 6 h (37°C, 5 % CO₂, 91 % Luftfeuchtigkeit) mit dem RNeasy Mini Isolierungs-Kit (QIAGEN) durchgeführt.

Zuerst wurde β-Mercaptoethanol unter dem Abzug 1:100 mit RLT-Puffer verdünnt und die Zellen mit je 300 µl/well lysiert. Das Lysat aus einem well wurde in je ein RNase-freies, nicht autoklaviertes Eppendorf-Reaktionsgefäß pipettiert. Danach wurden 300 µl 70 % Ethanol in das Eppendorf-Reaktionsgefäß dazupipettiert. Diese Suspension wurde nun auf eine Säule gegeben und bei 4°C, 1 min, 20 000 g zentrifugiert.

Die Säule wurde danach einmal mit RW1-Puffer (700 µl; 4°C, 1 min, 20 000 g) und dann zweimal mit RPE-Puffer (je 500 µl; 4°C, 2 min, 20 000 g) gewaschen. Nach den Waschschritten wurden die Säulen in neue Eppendorf-Reaktionsgefäße gestellt, eine halbe Stunde getrocknet, mit 35 µl RNase freiem Wasser eluiert (4°C, 2 min, 20 000 g) und bei -80°C aufbewahrt.

2.2.6.3 Quantifizierung der Gesamt-RNA

Da die isolierte Gesamt-RNA-Menge abhängig von der ursprünglichen Zellzahl in der Probe variiert, muss für jede Probe individuell der RNA-Gehalt bestimmt werden, um für das weitere Vorgehen von jeder Probe identische RNA-Mengen zu verwenden.

Die photometrische Quantifizierung der RNA erfolgte bei 260 nm, da eine RNA-Lösung mit einer optischen Dichte (OD) von 1,0 eine Konzentration von 40 µg/ml besitzt. Das Photometer wurde zunächst mittels einer mit reinem H₂O-DEPC gefüllten Küvette auf einen Null-Wert kalibriert. Für unsere Verhältnisse eignete sich eine Verdünnung der Gesamt-RNA-Proben von 1:100 in H₂O-DEPC, um genaue Werte bei der RNA-Quantifizierung zu erhalten (1 µl Proben-Aliquot auf 99 µl H₂O-DEPC). Der RNA-Gehalt der Probe errechnete sich wie folgt:

$$\text{Gemessener OD}_{260}\text{-Wert} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 100 \times 40 \text{ µg/ml.}$$

Das Verhältnis aus den Absorptionswerten bei 260 nm und bei 280 nm (*absorbance ratio*) lieferte eine Aussage über die Reinheit der RNA-Lösung und somit über die Qualität der Präparation der Gesamt-RNA, wobei der theoretisch optimale Wert bei 2,0 liegt. Für die eigentliche RT-PCR wurden jeweils

5 µg Gesamt-RNA eingesetzt. Anhand des so bestimmten RNA-Gehaltes wurde für jede Probe mittels Dreisatz die einzusetzende Menge in µl errechnet.

2.2.6.4 Reverse Transkriptase Reaktion

Mit Hilfe des Enzyms *Reverse Transkriptase* wurden die mRNA-Stränge einer Probe in cDNA (*copy DNA*) umgeschrieben, da nur diese mittels der Polymerase Kettenreaktion (PCR) amplifiziert werden kann.

Die mRNA-Stränge unterscheiden sich von anderen RNA-Formen durch ein Ende mit mehreren aufeinander folgenden Adenin-Basen (Poly-A-Sequenz). Die mRNA lässt sich spezifisch markieren, indem man DNA-Stränge aus Thymidin-Basen (Oligo-dT) zu den Proben gibt, die sich komplementär als Primer an die Poly-A-Sequenz anlagern (*Primer Annealing*). Hier kann schließlich die *Reverse Transkriptase* ansetzen und den Strang komplett in DNA übersetzen.

Folgende Schritte wurden im Einzelnen durchgeführt:

Primer Annealing:

1. Errechnete Gesamt-RNA-Menge von 1-2 µg in ein Reaktionsgefäß vorlegen
2. Zugabe von 1 µl Oligo-dT (entspricht 500 ng) und einer entsprechenden Menge H₂O-DEPC, sodass ein Gesamtvolumen von 10 µl entsteht
3. Inkubation für 10 min bei 65 °C

Reverse Transkription:

4. Zugabe der für die Reverse Transkription nötigen Reagenzien (insgesamt 10 µl):

5 x RT-Puffer	4,0 µl
RNase-out (40 U)	1,0 µl
DTT 0,1 M	2,0 µl
Nukleotid-Mix (10 mM)	2,0 µl
SuperScript II Reverse Transkriptase (200 U)	1,0 µl

5. Inkubation für 60 min bei 42 °C
6. Inaktivierung: Inkubation für 5 min bei 90 °C.

Die erhaltene cDNA wurde 1:10 mit H₂O-DEPC verdünnt (+180 µl H₂O-DEPC) und bei – 20 °C gelagert.

2.2.7 Semiquantitative Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Einzelne Abschnitte der gewonnenen cDNA lassen sich mittels PCR gezielt amplifizieren und können anschließend durch einen fluoreszierenden Farbstoff sichtbar gemacht und so quantifiziert werden. Durch spezifische Primer werden selektiv die cDNA-Abschnitte, die für das gewünschte Protein kodieren, markiert. Hier setzt dann die Polymerase an: pro PCR-Zyklus erstellt sie eine Kopie von jedem markierten cDNA-Strang, sodass nach n Zyklen n-1 Kopien der anfänglichen cDNA vorhanden sind.

Die PCR wurde folgendermaßen durchgeführt:

1. Vorlegen von 5 µl cDNA in die PCR-Reaktionsgefäße
2. Zugabe des MasterMixes aus folgenden Reagenzien (insgesamt 45 µl):

H ₂ O-DEPC	25,1 µl
10 x Tris PCR Puffer (10 mM)	5,0 µl
MgCl ₂ (25 mM)	1,0 µl
Nukleotid-Mix (10 mM)	1,0 µl
Primer-Mix	12,5 µl
DNA-Polymerase (2 U)	0,4 µl

Tab. 24: PCR-Temperaturprofile und Anzahl der PCR-Zyklen

	β-Aktin	HK II	ADM
1. hot start 104°C, Deckel vorgeheizt			
2. Denaturierung	94 °C; 60 s	94 °C; 120 s	95 °C; 120 s
3. Primer Annealing und Elongation	72 °C; 150 s 22 Zyklen	94 °C; 30 s 58 °C; 50 s 10 Zyklen	95 °C; 30 s 54 °C; 30 s 72 °C; 50 s;

		72 °C; 50 s	29 Zyklen
		94 °C; 30 s	
		58 °C; 50 s	
		15 Zyklen	
4. Ende	72 °C; 300 s	72 °C; 50 s + 20 s nach jedem der 25 Zyklen	72 °C; 120 s
5. Pause	4 °C; ∞	4 °C; ∞	4 °C; ∞

2.2.7.1 Gelelektrophorese der PCR-Produkte

Die PCR-Produkte wurden in einem Agarosegel mittels Elektrophorese aufgetrennt und durch einen Fluoreszenzfarbstoff unter UV-Licht als Banden sichtbar gemacht. Der Vergleich der Bandenintensität untereinander erlaubte eine zuverlässige quantitative Aussage über die Protein-Expression in der Zelle zum Zeitpunkt der RNA-Extraktion.

Zur Herstellung des 1,5 %-igen Gels wurden 4,5 g Agarosepulver in 300 ml 0,5 x TAE-Puffer in der Mikrowelle vollständig gelöst. Anschließend wurde das Gel in Gelkammern gegossen und zum Polymerisieren stehen gelassen. Für die Elektrophorese wurden jeweils 10 µl des PCR-Produktes mit 5 µl 5 x Probenpuffer (*loading buffer* zum Markieren der PCR-Produkte) in eine Geltasche gegeben, 2 µl einer 1 kb-Leiter als Marker an den Anfang jeder Taschenzeile aufgetragen und ca. 90 min einer Spannung von 120 V ausgesetzt. Anschließend wurde das Gel in einer Ethidiumbromid-Lösung (1 µg/ml) 10 min gefärbt und dann das überschüssige Ethidiumbromid in destilliertem Wasser für 10 min abgewaschen.

Die Gele wurden mittels einer Geldokumentationsanlage digital aufgenommen, mit der Software „Quantity one“ optimiert und mit Adobe Photoshop 6.0 aufgearbeitet.

In jedem Versuch wurde neben der eigentlichen RT-PCR auch eine RT-PCR für β -Aktin durchgeführt. Dies ist ein in eukaryotischen Zellen konstitutiv exprimiertes Gen, dessen gleichmäßige Banden in den einzelnen Proben eine

Vergleichbarkeit der Probenmengen sichert. Bei Unterschieden zwischen der Intensität der β -Aktin-Banden wurde der Versuch wiederholt.

2.2.8 Quantitative Real-Time-PCR

Als weitere Methode zur Quantifizierung der Genexpression in einer Zelle wurde die Real-Time-PCR verwendet. Vorteil einer Quantifizierung mittels Real-Time-PCR im Vergleich zur semiquantitativen PCR ist, dass die Menge des entstehenden PCR-Produkts ständig während der PCR gemessen werden kann und somit in der linearen Phase der PCR-Reaktion eine Mengenbestimmung möglich ist, was zu genaueren Ergebnissen als bei der Endpunktmessung einer semiquantitativen PCR führt¹²⁸.

Die Quantifizierung der Real-Time-PCR basiert auf der Berechnung des Fluoreszenz-Schwellenwertes (Threshold Cycle, C_T -Wert). Der C_T -Wert ist der PCR-Zyklus, bei dem die Reporterfluoreszenz die Hintergrundfluoreszenz signifikant übersteigt. Ab diesem Zeitpunkt ist die Amplifikation des PCR-Produktes exponentiell. Aus den bekannten Matrizen-Mengen kann eine Standardgerade erstellt werden, mit deren Hilfe man auf die Menge an PCR-Produkt schließen kann. Gleichzeitig werden in einem PCR-Lauf bekannte Matrizenmengen (Standard) amplifiziert, um eine Aussage über die Menge an PCR-Produkt machen zu können.

2.2.8.1 VEGF-Real-Time-PCR

Zur Bestimmung der VEGF-Gen-Expression mittels Real-Time-PCR wurden synthetisierte TaqMan-Sonden (TIB Molbiol, Berlin) verwendet. Als interne Kontrolle diente das konstitutiv exprimierte β_2 -Mikroglobulin. Bei einem TaqMan-Assay liegt zwischen den zwei spezifischen Oligonukleotiden ein weiteres fluoreszenzmarkiertes Oligonukleotid (TaqMan-Probe). Unter einer TaqMan-Probe versteht man eine Sonde, die am 5'-Ende mit einem Reporter-Fluoreszenzfarbstoff und am 3'-Ende oder intern mit einem Quencher-Farbstoff markiert ist¹⁹⁵. Bei einer intakten Sonde wird die Reporter-Fluoreszenzemission durch die Nähe des Quenchers zum Reporter unterdrückt. Kommt es nun während der Reaktion zur Neustrangsynthese, fragmentiert die

Taq-Polymerase durch ihre 5'-3'-Exo-Nukleaseaktivität die TaqMan-Probe, woraus die Trennung des Reporters vom Quencher resultiert und somit die Reporterfluoreszenz ansteigt.

Die Zunahme der Reporterfluoreszenz wird nach jedem Zyklus gemessen und ist proportional zur Menge der DNA-Matrize im Reaktionsgefäß. Da die *Taq*-Polymerase nur an TaqMan-Sonden bindet, die an die Zielsequenz gebunden sind, und nur diese fragmentiert, bleiben nicht-hybridisierte Einzelstränge unbeschadet (**Abb. 8**).

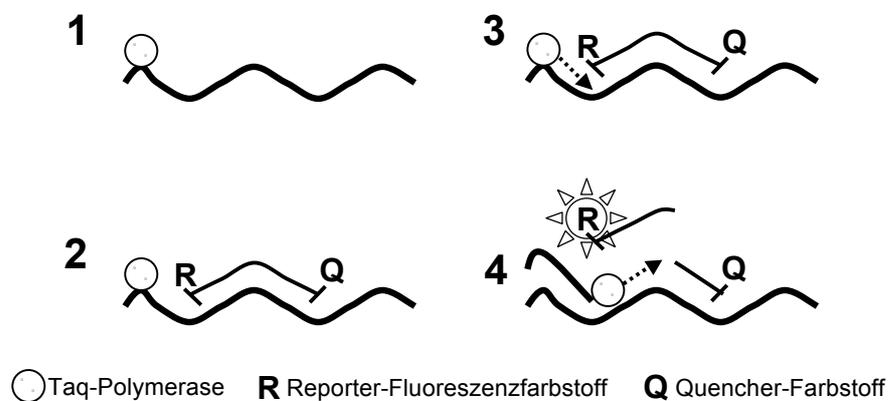


Abb. 8: Prinzip der Real-Time-PCR mittels TaqMan-Sonde. (1) DNA-Matrize mit Taq-Polymerase. (2) Angebundene Taq-Man-Sonde mit Reporter-Fluoreszenz- und Quencher-Farbstoff. (3) Einsetzen der 5'-3'-Exo-Nukleaseaktivität der Taq-Polymerase. (4) Durchtrennung der Taq-Man-Sonde und daraus resultierende Trennung von Reporter-Fluoreszenz- und Quencher-Farbstoff. Die Fluoreszenz des Reporter-Farbstoffs wird nicht mehr unterdrückt.

Zunächst wurde für die VEGF-Real-Time-PCR ein Mastermix A angesetzt.

1x Mastermix A:

- 6,4 µl H₂O_{bidest.}
- 6,0 µl MgCl₂ (25 mM)
- 2,0 µl 10x PCR-Puffer
- 0,4 µl dNTPs (je 10 mM)
- 0,3 µl BSA (10 µg/µl)
- 0,15 µl Platinum *Taq* (5 U/µl)

Dieser Mastermix A wurde auf drei Eppendorf-Reaktionsgefäße verteilt und die dazugehörigen Primer (Endkonz. 0,25 μM) sowie TaqMan Proben (Endkonz. 0,1 μM) hinzugefügt.

1x Mastermix B:

VEGF		β_2 -Mikroglobulin		Standard	
Mastermix A	15,25 μl	Mastermix A	15,25 μl	Mastermix A	15,25 μl
Primer VEGFex3 f	0,7 μl	Primer B ₂ M f	0,7 μl	Primer VEGFex3 f	0,7 μl
Primer VEGFex8 r	0,7 μl	Primer B ₂ M r	0,7 μl	Primer VEGFex7ex5r	0,7 μl
Primer TM VEGFex3	0,4 μl	Primer B ₂ M TM	0,4 μl	Primer TM VEGFex3	0,4 μl

Jeder Ansatz (VEGF, β_2 -Mikroglobulin, Standard) wurde im Doppel angesetzt. Pro LightCycler-Kapillare wurden 17 μl des Mastermix B vorgelegt. In die VEGF- und β_2 -Mikroglobulin-Kapillaren wurde je 3 μl cDNA (1:8 in $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$ verdünnt) und zu den zwei Standardkapillaren je 3 μl der Standardverdünnung zugefügt.

Als Standard für die VEGF-Real-Time-PCR wurde ein Plasmid verwendet, das die Splicing-Variante 165 des VEGF-Gens enthält. Die Ausgangskonzentration der Plasmide wurde auf eine Verdünnung von 10^6 Plasmiden/ μl eingestellt. Um die absolute Kopienanzahl der Ziel-Transkripte zu bestimmen, wurde eine Standardgerade generiert. Bezogen auf diese Standardgerade wurde die Anzahl der Kopien der zu untersuchenden Proben anhand der LightCycler-Software 3.1 ermittelt³¹⁰. Die Reaktion wurde unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

Initiale Denaturierung:	95 °C, 2 min	
Denaturierung:	95 °C, 8 s	} 40 Zyklen
Annealing:	68 °C, 12 s	
Extension:	72 °C, 20 s	
	35 °C, 2 min	

Die Anzahl der amplifizierten Kopien wurde nach folgender Formel berechnet:

$$\frac{\text{Kopienanzahl des gesuchten Gens} \times 1000}{\text{Kopienanzahl } \beta_2\text{-Mikroglobuline}}$$

2.2.8.2 IL-8-Real-Time-PCR

Zur Bestimmung der IL-8-Geninduktion wurde das Humane Interleukin-8 LightCycler™-Primer-Set, sowie als interne Kontrolle das Humane G-6-PDH LightCycler™-Primer-Set (Roche, Grenzach-Wyhlen), ein in eukaryotischen Zellen konstitutiv exprimiertes Gen, verwendet. Als einfacher Reaktionsansatz wurde für die IL-8- sowie für G-6-PDH-Real-Time-PCR folgender Mastermix verwendet:

1x Mastermix A:

11,0 µl H₂O bidest

2,0 µl Primer (10 µM)

2,0 µl LC-FastStart DNA Master SYBR Green I 10x (Roche)

Zuerst wurde der Mastermix in die Light-Cycler Kapillaren vorgelegt. Anschließend wurden je 5 µl der unverdünnten cDNA in die Kapillaren pipettiert und der gesamte Ansatz in die Glaskapillaren zentrifugiert. Als Standard wurden kommerzielle Standards (Roche) eingesetzt. Die Kopienzahl der kommerziell erhältlichen Standards variiert von Charge zu Charge und wurde in 10er- Verdünnungen für die PCR eingesetzt. Als Reaktionsbedingung wurde für die IL-8- sowie für G-6-PDH-Real-Time-PCR folgendes Programm verwendet:

Initiale	95 °C, 10 min	
Denaturierung:		
Annealing:	Erniedrigung der Annealingtemperatur pro Zyklus um 0,5 °C von 68 °C auf 58 °C, je 10 s	} 45 Zyklen
Amplifikation:	72 °C, 16 s	
Schmelzkurve:	von 58 °C kontinuierliche Temperatur-erhöhung von 0,1 °C/s auf 95 °C	

Im LightCycler™-Primer-Set (Roche) wird der fluoreszierende Reporterfarbstoff SYBR®-Green I verwendet, der sich unspezifisch in doppelsträngige DNA einlagert und somit proportional zur Produktmenge ansteigt. Dadurch kommt es während der PCR-Reaktion zu einem Fluoreszenzanstieg, durch den die Reaktion verfolgt werden kann.

Um zwischen korrektem Produkt, Artefakt oder Primerdimeren unterscheiden zu können, wird am Ende der PCR-Reaktion eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt, bei der es durch schrittweise Erhöhung der Temperatur zu einer Auftrennung der DNA-Doppelstränge, je nach ihrer Schmelzpunkte, in ihre Einzelstränge kommt. Folge ist eine Abnahme der Fluoreszenz, die aufgezeichnet wird. Da die Produkte von Primerdimeren und durch Mutationen veränderten DNA-Strängen bei niedrigeren Temperaturen schmelzen als die Produkte der Ziel-DNA, kann somit zwischen korrektem Produkt, Primerdimeren oder Artefakt unterschieden werden.

2.2.9 Statistik

Jedes Experiment wurde entweder im doppelten, dreifachen oder vierfachen Ansatz durchgeführt. Alle Experimente wurden mindestens dreimal wiederholt und ergaben vergleichbare Ergebnisse. Die zu untersuchende Gruppe (infizierte Zellen) wurde jeweils mit der Kontrollgruppe (nicht infizierte Zellen) verglichen.

Die Datenbewertung erfolgte über den Student-t-Test, um die Gleichheit der Mittelwerte zu überprüfen. Die Differenz von Werten mit $p < 0,05$ wurde als signifikant beurteilt.

3 Ergebnisse

3.1 Aktivierung von HIF-1 in *Enterobacteriaceae*-infizierten HeLa229-Zellen

Um eine Aktivierung von HIF-1 durch andere Bakterien als *B. henselae* nachzuweisen, wurden in dieser Arbeit humane epitheliale Zellen (HeLa229-Zellen) mit den *Enterobacteriaceae* *Y. enterocolitica*, *E. aerogenes* und *S. enterica* spp. *enterica* infiziert. Nach 6 Stunden Inkubation wurden die Zellen lysiert, die Proteine in Extraktionspuffer aufgenommen, durch Gelelektrophorese aufgetrennt und HIF-1 α im Immunoblot nachgewiesen. Als Kontrolle dienten unbehandelte, als Positivkontrolle DFO-behandelte HeLa229-Zellen (**Abb. 9**).

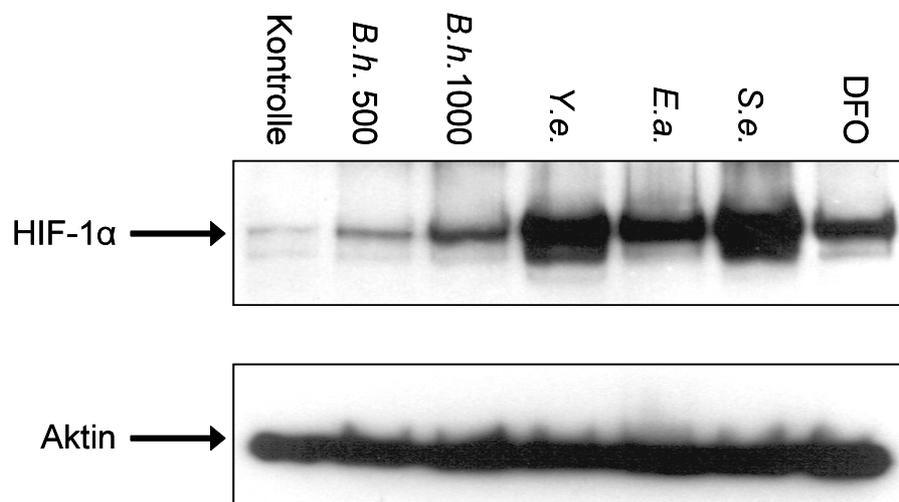


Abb. 9: HIF-1-Aktivierung in *Enterobacteriaceae*-infizierten HeLa229-Zellen. Aktivierung von HIF-1 α 6 Stunden nach Infektion mit *B. henselae* (*B.h.* MOI 500 und 1000), *Y. enterocolitica* (*Y.e.*), *E. aerogenes* (*E.a.*) und *S. enterica* (*S.e.*; alle MOI 20). Als Negativkontrolle dienten unbehandelte HeLa229-Zellen, als Positivkontrolle DFO (200 μ M) behandelte HeLa-Zellen. HIF-1 α (120kDa) wurde im Immunoblot detektiert. Ladekontrolle: Aktin.

Im Vergleich zur Negativkontrolle konnte eine HIF-1-Aktivierung in allen infizierten Zellen festgestellt werden. Die HIF-1-Aktivierung in den mit *Enterobacteriaceae*-infizierten Zellen war gegenüber der Negativkontrolle und auch gegenüber den mit *B. henselae* infizierten Zellen deutlich erhöht. Damit zeigen diese Ergebnisse, dass eine Infektion mit *Enterobacteriaceae* in Epithelzellen eine starke Aktivierung des Transkriptionsfaktors HIF-1 auslöst.

3.1.1 Nachweis der Induktion eines HIF-1-abhängigen Genprogramms

Um zu zeigen, dass die HIF-1-Aktivierung durch die Infektion mit *Enterobacteriaceae* zu einer funktionellen Aktivierung des Transkriptionsfaktors HIF-1 führt, sollte im nächsten Schritt die erhöhte Konzentration HIF-1-regulierter VEGF-, HKII- und ADM-mRNA nachgewiesen werden. Hierzu wurden HeLa229-Zellen mit *B. henselae*, *Y. enterocolitica*, *E. aerogenes* und *S. enterica* infiziert, als Kontrollen dienten uninfizierte und DFO behandelte Zellen. Nach Ablauf der Inkubationszeit (6 h) wurde die RNA isoliert, mit Hilfe der quantitativen real-time-PCR die Konzentration der VEGF-mRNA gemessen (**Abb. 10A**) und mit Hilfe der semiquantitativen PCR die Menge der Adrenomedullin- (ADM-) und Hexokinase II- (HK II-)mRNA dargestellt (**Abb. 10B**).

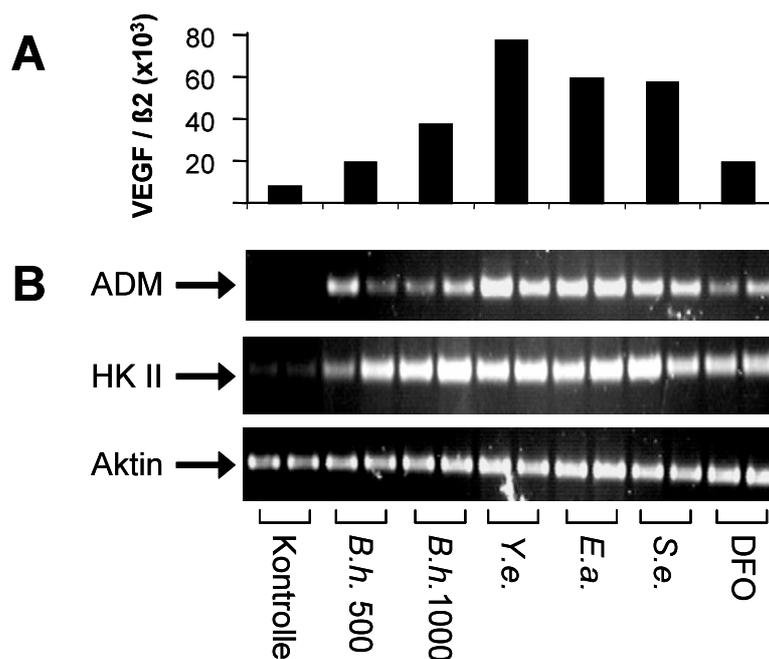


Abb. 10: Induktion eines HIF-1-abhängigen Genprogramms durch *Enterobacteriaceae*. Infektion von HeLa229-Zellen mit *B. henselae* (*B.h.* MOI 500 und 1000) und *Y. enterocolitica* (*Y.e.*), *E. aerogenes* (*E.a.*) und *S. enterica* (*S.e.*; alle MOI 20). Als Negativkontrolle dienten uninfizierte Zellen (Kontrolle), als Positivkontrolle DFO (200µM) behandelte HeLa229-Zellen. **(A)** Bakteriell induzierte VEGF-Transkription. Gesamt-mRNA wurde 6 h nach Infektion in cDNA transkribiert und die VEGF-mRNA wurde im Doppelansatz über eine *real time* Light-Cycler-PCR quantifiziert (Ratio: VEGF/β2-Mikroglobulin-Transkripte; Mittelwerte gezeigt). **(B)** Bakteriell induzierte Adrenomedullin- und Hexokinase II -Transkription. ADM- und HK-mRNA wurde über semiquantitative RT-PCR im Doppelansatz bestimmt. Ladekontrolle: Aktin.

Es zeigte sich eine deutliche Erhöhung der jeweiligen mRNA in den infizierten Zellen gegenüber der Negativkontrolle. Die *Enterobacteriaceae*-infizierten Zellen transkribierten die VEGF-mRNA 6-8 mal stärker als die uninfizierten Zellen. In semiquantitativen PCRs konnte ebenso eine erhöhte Transkription der HIF-1-abhängigen ADM- und HK II-mRNA festgestellt werden. Damit stand fest, dass HIF-1-regulierte Gene (z. B. HK II, ADM, VEGF) nach Infektion mit *Enterobacteriaceae* vermehrt transkribiert wurden.

3.2 Aktivierung von HIF-1 in Siderophor-behandelten HeLa229-Zellen

Um die Aktivierung von HIF-1 durch Infektion mit *Enterobacteriaceae* molekular zu erklären, untersuchten wir die Wirkung der bakteriellen Siderophore auf die Zellen. Da Eisenmangel zur Aktivierung von HIF-1 führt²³, sollte ein durch diese Eisenchelatoren herbeigeführter Eisenmangel in Endothelzellen denselben Effekt haben. Zusätzlich wurden die Siderophore im Eisen-gesättigten Zustand, also ohne ihre eisenbindende Wirkung, auf ihre Fähigkeit hin, HIF-1 zu aktivieren, untersucht.

Zur Etablierung des Versuchsaufbaus wurden in ersten Schritten DFO sowohl rein oder in mit FeCl₃ gesättigtem Zustand im Infektionsmedium gelöst zu HeLa229-Zellen gegeben und 16 h inkubiert. Um eine Beteiligung des FeCl₃ selbst am Ausbleiben der Aktivierung auszuschließen, erfolgte zusätzlich die Inkubation mit reinem FeCl₃. Anschließend wurde aus dem Zellkulturüberstand die Menge des sekretierten Zytokins VEGF gemessen (**Abb. 11**).

Dabei zeigte sich eine mehr als verdoppelte VEGF-Sekretion nach Behandlung mit DFO. Dieser Effekt konnte durch eine Sättigung des Eisenchelators DFO mit Eisen eine Stunde vor der Zugabe auf die Zellen aufgehoben werden; die Werte lagen dann ähnlich wie die Negativkontrolle. Bei Zugabe von reinem Eisen zeigte sich nur eine geringe Verminderung der VEGF-Sekretion gegenüber der Negativkontrolle.

Eine Behandlung mit DFO induzierte demnach in den HeLa229-Zellen eine erhöhte HIF-1-regulierte VEGF-Sekretion, die durch Sättigung mit Eisen aufgehoben werden konnte. Die eisenbindende Funktion des DFO ist daher ausschlaggebend für eine Aktivierung von HIF-1 und dessen Genprogramm

und diese Ergebnisse befinden sich in Übereinstimmung mit bereits publizierten Daten ¹⁶⁷.

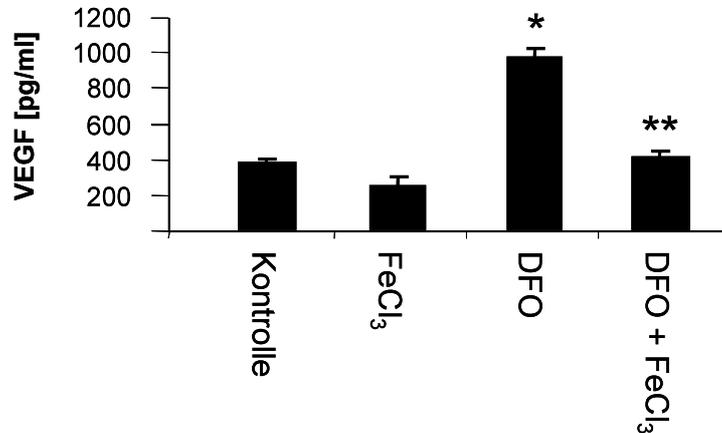


Abb. 11: VEGF-Sekretion nach DFO-Behandlung vor und nach Sättigung mit FeCl₃. 16 Stunden nach Inkubation von HeLa229-Zellen oder dem Eisenchelator DFO (200µM) und mit FeCl₃ (200µM)-gesättigtem DFO wurde sekretiertes VEGF im ELISA quantifiziert. Als Negativkontrolle dienten unbehandelte oder mit FeCl₃ (200µM) inkubierte HeLa229-Zellen. (VEGF: pg/ml; Vierfachansatz). * Signifikante Unterschiede verglichen mit unbehandelten Kontrollzellen ($p < 0,01$). ** Signifikante Unterschiede zwischen DFO-behandelten Zellen und Zellen, die mit Eisen-gesättigtem DFO behandelt wurden ($p < 0,01$).

3.2.1 Aktivierung von HIF-1 in HeLa229-Zellen nach Inkubation mit Yersiniabactin und Aerobactin

Um die HIF-1-Aktivierung von *Y. enterocolitica* auf das von diesen *Enterobacteriaceae* gebildete Siderophor Yersiniabactin (Ybt) zurückführen zu können, wurden weitere HIF-1-Immunoblots mit gereinigtem Ybt durchgeführt. Dazu lösten wir Ybt eine Stunde vor Zugabe auf die Zellen in H₂O, die eine Hälfte pur, die andere Hälfte unter Sättigung mit FeCl₃ und gaben diese Lösungen zu den Zellen. Nach einer 6-stündigen Inkubation mit Ybt, eisengesättigtem Ybt oder den Negativ- oder Positivkontrollen (unbehandelte Zellen oder Eisen ohne Zusätze, DFO oder eisengesättigtes DFO) wurden die Proteine extrahiert, und mittels Immunoblot die HIF-1-Aktivierung analysiert (**Abb. 12**).

Es zeigte sich eine starke HIF-1-Aktivierung in den Zellen, die mit Ybt behandelt wurden, die Positivkontrolle war deutlich geringer ausgeprägt (DFO). Die Sättigung mit Eisen hob die Aktivierung von HIF-1 durch Ybt und DFO auf.

Analog zu den Ergebnissen der HIF-Aktivierung von Ybt sollte außerdem eine HIF-Aktivierung durch das Siderophor Aerobactin (Aeb) nachgewiesen werden. Die Infektion mit dem Bakterium, aus dem Aeb isoliert wurde, *E. aerogenes*, wies wie auch die anderen beiden *Enterobacteriaceae*, eine deutliche Aktivierung des Transkriptionsfaktor HIF-1 und seines Genprogramms in HeLa229-Zellen auf (s. **Abb. 9 und 10**).

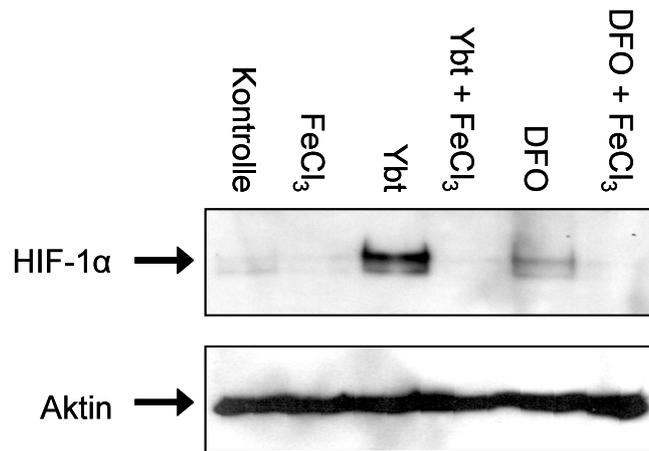


Abb. 12: Aktivierung von HIF-1 in Yersiniabactin-behandelten HeLa229-Zellen. Inkubation von Endothelzellen mit Yersiniabactin (Ybt; 200 μ M) oder eisengesättigtem Ybt (Ybt+FeCl₃; FeCl₃: 200 μ M) über 6 Stunden. Negativkontrolle: unbehandelte Zellen (Kontrolle) und oder Eisen inkubierte Zellen (FeCl₃; 200 μ M); Positivkontrolle: DFO (200 μ M) und mit Eisen gesättigtes DFO (DFO+FeCl₃; FeCl₃: 200 μ M). HIF-1 α wurde bei 120kDa detektiert. Ladekontrolle: Aktin.

HeLa229-Zellen wurden mit gelöstem Aeb, eisengesättigtem Aeb und den üblichen Negativ- und Positivkontrollen (unbehandelte Zellen oder Eisen ohne Zusätze, DFO oder eisengesättigtes DFO) inkubiert. Aus den Zelllysaten konnte man anschließend die HIF-1-Aktivierung durch Immunoblot nachweisen. Auch hier war eine Aktivierung von HIF-1 α in den mit dem Siderophor inkubierten Zellen gegenüber den unbehandelten Zellen deutlich. Die Sättigung von Aeb mit Eisen ergab im Gegensatz dazu keine Aktivierung von HIF-1 α , ebensowenig die Kontrolle mit purem Eisen. Die Positivkontrolle mit DFO bewirkte dagegen eine deutliche HIF-1-Aktivierung und auch hier konnte dieser Effekt durch eine Sättigung von DFO mit Eisen aufgehoben werden (**Abb. 13**).

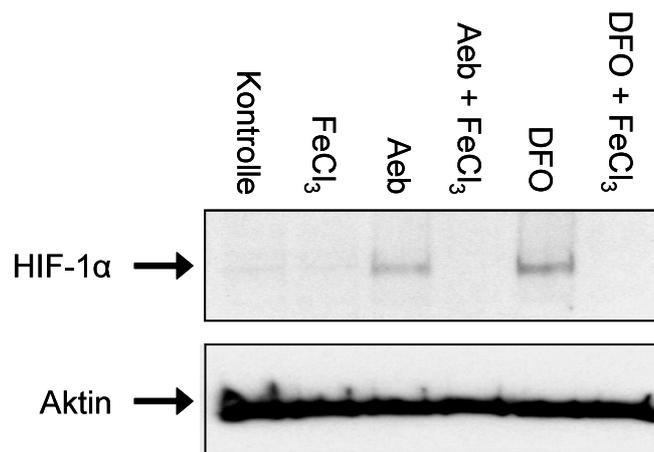


Abb. 13: Aktivierung von HIF-1 in Endothelzellen nach Inkubation mit Aerobactin. Inkubation von Endothelzellen mit Aerobactin (Aeb; 200µM) oder eisengesättigtem Aeb (Aeb+FeCl₃; FeCl₃: 200µM) über 6 Stunden. Negativkontrolle: unbehandelte Zellen (Kontrolle) oder mit Eisen inkubierte Zellen (FeCl₃; 200µM); Positivkontrolle: DFO (200µM) oder mit Eisen gesättigtes DFO (DFO+FeCl₃; 200µM). HIF-1α wurde bei 120kDa detektiert. Ladekontrolle: Aktin.

Analog dazu bewirkte als drittes *Enterobacteriaceae* *S. enterica* spp. *enterica* eine deutliche Aktivierung von HIF-1 (s. 3.1). Ein erst kürzlich entdecktes Siderophor dieser Gattung ist Salmochelin (Sal). Durch die Komplexität des Isolierungs- und Purifizierungsprozesses des Sal aus dem Bakterium war die zur Verfügung stehende Menge des Siderophors geringer als bei den anderen beiden Siderophoren, weshalb auf die Darstellung der HIF-1-Aktivierung auf mRNA-Ebene verzichtet wurde und nur die Aktivierung des Transkriptionsfaktors HIF-1 via Immunoblot und das von diesem induzierte Zytokin VEGF im ELISA quantifiziert wurde (**Abb. 14**).

Es zeigte sich eine erhöhte HIF-1-Aktivierung nach Inkubation mit dem Siderophor Salmochelin und keine Aktivierung nach Sättigung des Siderophors mit Eisen. Die Negativ- und Positivkontrollen erbrachten vergleichbare Ergebnisse wie in den zuvor beschriebenen Versuchsaufbauten. Damit liegt die Vermutung nahe, dass die HIF-1-Aktivierung durch *Enterobacteriaceae* auf die Bildung von Siderophoren wie Ybt, Aeb und Sal und deren Eisenbindungsfähigkeit zurückzuführen ist.

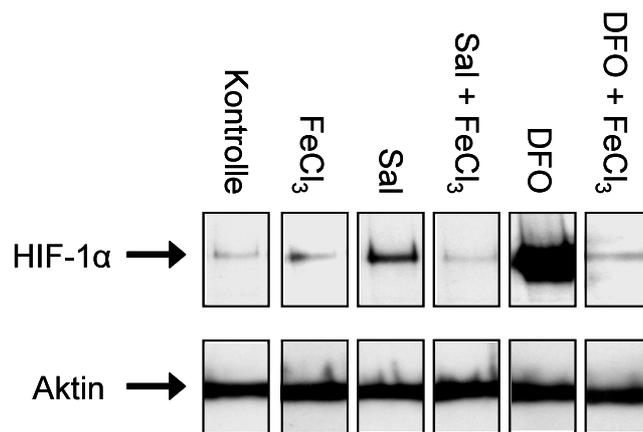


Abb. 14: Aktivierung von HIF-1 in Endothelzellen nach Inkubation mit Salmochelin. Inkubation von Endothelzellen mit Salmochelin (Sal; 200µM) oder eisengesättigtem Sal (Sal+FeCl₃; FeCl₃: 200µM) über 6 Stunden. Als Negativkontrolle dienten unbehandelte Zellen (Kontrolle) oder mit Eisen inkubierte Zellen (FeCl₃; 200µM), als Positivkontrolle mit DFO (200µM) oder mit Eisen gesättigtem DFO (DFO+FeCl₃: 200µM) behandelte Zellen. HIF-1α wurde bei 120kDa detektiert. Ladekontrolle: Aktin.

3.2.2 Nachweis der HIF-regulierten Gene auf mRNA-Ebene mittels semiquantitativer PCR

Um zu analysieren, ob die HIF-1-Aktivierung durch Ybt eine funktionelle Aktivierung des Transkriptionsfaktors darstellt, stand nachfolgend das HIF-1-regulierte Genprogramm zur Untersuchung. Hierfür erfolgte die Inkubation der HeLa229-Zellen mit Ybt, eisengesättigtem Ybt oder den beschriebenen Negativ- oder Positivkontrollen. Anschließend wurde die RNA aus den lysierten Zellen isoliert, in cDNA transkribiert und mit Hilfe von quantitativer real-time-PCR im Light cycler und semiquantitativer PCR die ausgewählten HIF-1-induzierten Gene für VEGF, ADM und HKII analysiert (**Abb. 15A+B**).

Die Quantifizierung der VEGF-mRNA im Light cycler erbrachte eine verdoppelte Transkriptionsrate bei Zusatz von Ybt gegenüber der Negativkontrolle, die Probe mit eisengesättigtem Ybt wiederum zeigte einen Rückgang dieser Induktion auf das Level der Negativkontrolle (**Abb. 15A**). Auch für ADM und HKII wurde eine eindeutig vermehrte Transkription nach Behandlung mit Ybt nachgewiesen, wobei die Sättigung mit Eisen wieder einen Rückgang der Transkriptionsrate zur Folge hatte (**Abb. 15B**).

Zusätzlich konnte das Zytokin VEGF nach Zugabe von Ybt zu HeLa229-Zellen im Medium mittels ELISA nachgewiesen werden. Hierbei zeigte die Eisensättigung des Ybt ebenfalls einen deutlichen Konzentrationsabfall des transkribierten VEGF (**Abb. 15C**).

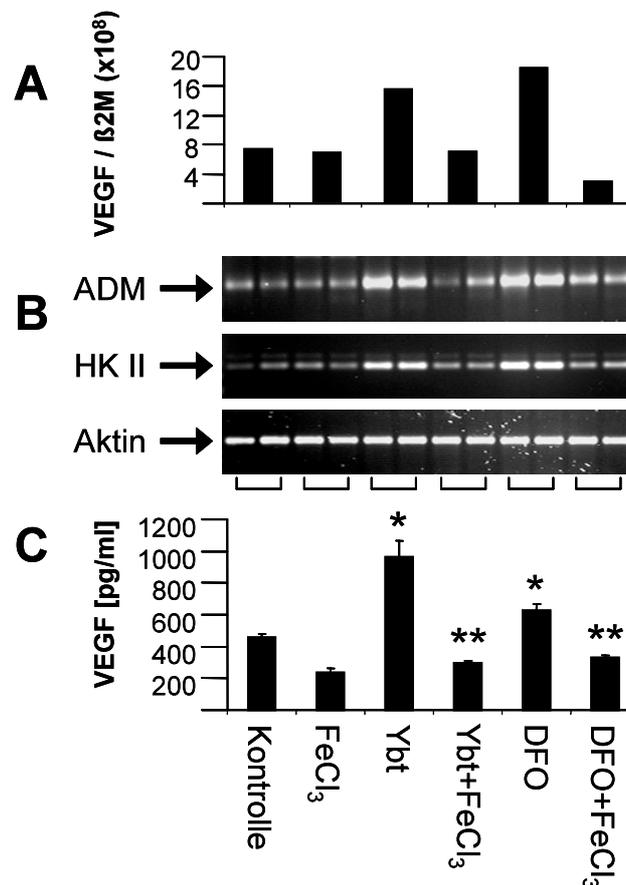


Abb. 15: Expression von HIF-1-regulierten Genen nach Inkubation von HeLa229-Zellen mit Yersiniabactin. Inkubation von HeLa229-Zellen mit Yersiniabactin (Ybt; 200 μ M) oder mit Eisen gesättigtem Ybt (Ybt+FeCl₃; 200 μ M). Als Negativkontrolle dienten unbehandelte HeLa229-Zellen (Kontrolle) oder mit FeCl₃ behandelte Zellen, als Positivkontrolle DFO (200 μ M) oder eisengesättigtes DFO (DFO+FeCl₃; beide 200 μ M). **(A)** Yersiniabactin-induzierte VEGF-mRNA-Transkription. Inkubation über 6 h. Quantifizierung der VEGF-mRNA im Light cycler (Ratio: VEGF/ $\beta 2$ -Mikroglobulin-Transkripte; Mittelwerte gezeigt). **(B)** Yersiniabactin-induzierte Adrenomedullin- und Hexokinase II -Transkription. ADM- und HK II-mRNA wurde über semiquantitative RT-PCR im Doppelansatz bestimmt. Ladekontrolle: Aktin. **(C)** Yersiniabactin-induzierte VEGF-Protein-Sekretion. Inkubation über 16h, VEGF-Bestimmung aus dem Zellüberstand, gemessen in pg/ml. Dreifachansatz. * Signifikante Unterschiede verglichen mit unbehandelten Kontrollzellen ($p < 0,01$). ** Signifikante Unterschiede zwischen Ybt- oder DFO-behandelten Zellen und Zellen, die mit Eisengesättigtem Ybt oder DFO behandelt wurden ($p < 0,01$).

Analoge Ergebnisse lagen auch für das Siderophor Aeb vor, wobei die HIF-1-Aktivierung ebenfalls durch Zusatz von FeCl_3 vermindert wurde (**Abb. 16A+B**). So konnten im Light Cycler VEGF und in RT-PCRs ADM und HK II nachgewiesen werden.

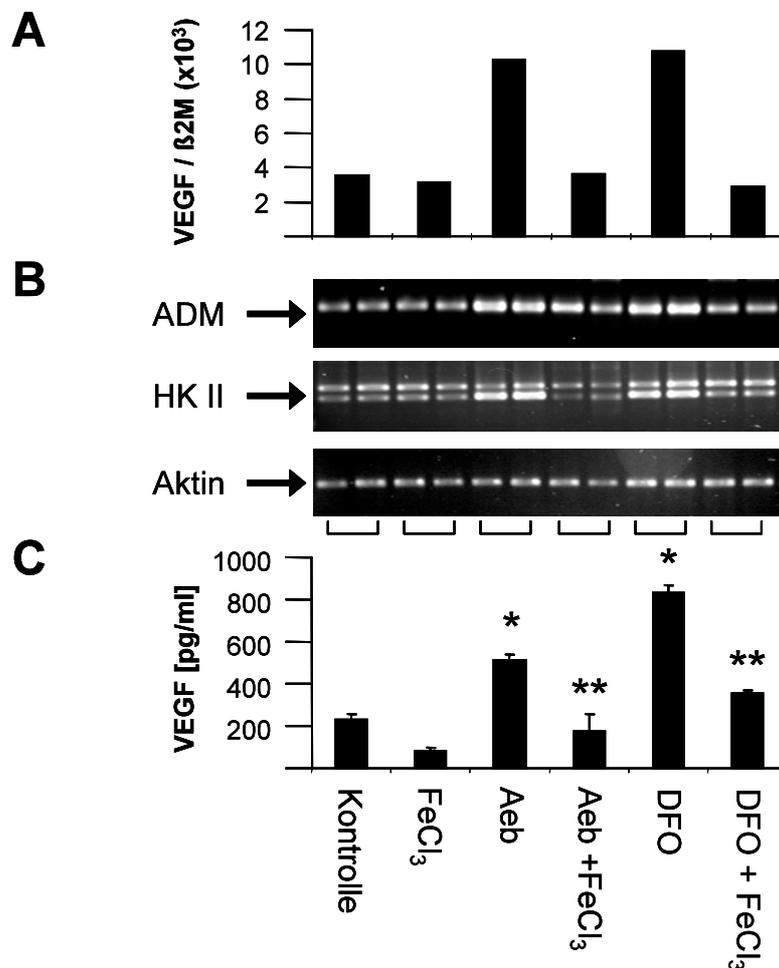


Abb. 16: Expression von HIF-1-regulierten Genen nach Inkubation von HeLa229-Zellen mit Aerobactin. Inkubation von HeLa229-Zellen mit Aerobactin (Aeb; 200 μ M) oder mit Eisen gesättigtem Aeb (Aeb+ FeCl_3 ; 200 μ M). Als Negativkontrolle dienten unbehandelte HeLa229-Zellen (Kontrolle) oder mit FeCl_3 behandelte Zellen, als Positivkontrolle DFO (200 μ M) oder eisengesättigtes DFO (DFO+ FeCl_3 ; beide 200 μ M). **(A)** Durch Aerobactin induzierte VEGF-mRNA-Transkription. Inkubation über 6 h. Quantifizierung der VEGF-mRNA im Light cycler (Ratio: VEGF/ β 2-Mikroglobulin-Transkripte; Mittelwerte gezeigt). **(B)** Aerobactin-induzierte Adrenomedullin- und Hexokinase II -Transkription. ADM- und HK II-mRNA wurde über semiquantitative RT-PCR im Doppelansatz bestimmt. Ladekontrolle: Aktin. **(C)** Aerobactin-induzierte VEGF-Protein-Sekretion. Inkubation über 16h, VEGF-Bestimmung aus dem Zellüberstand, gemessen in pg/ml. Dreifachansatz. * Signifikante Unterschiede verglichen mit unbehandelten Kontrollzellen ($p < 0,01$). ** Signifikante Unterschiede zwischen Aeb- oder DFO-behandelten Zellen und Zellen, die mit Eisen-gesättigtem Aeb oder DFO behandelt wurden ($p < 0,01$).

Auch im ELISA zeigte die Zugabe von Aeb eine deutlich erhöhte VEGF-Transkription gegenüber der Negativkontrolle, wobei dieser Effekt durch Eisensättigung des Siderophors aufgehoben wurde (**Abb. 16C**).

Die Versuche auf mRNA-Ebene bestätigten die Ergebnisse des HIF-1-Immunoblots. Eine Aktivierung des HIF-1-abhängigen Genprogramms durch die Siderophore Yersiniabactin und Aerobactin konnte hiermit bewiesen werden.

3.2.3 Nachweis der HIF-1-regulierten Gene auf Proteinebene mittels VEGF-ELISA

Um die HIF-1-Aktivierung durch Siderophore auch auf Proteinebene zu verifizieren, wurden HeLa-Zellen 16 h unter Zugabe von Ybt, Aeb und Sal, deren eisengesättigten Formen oder den gewohnten Negativ- oder Positivkontrollen inkubiert und anschließend aus dem Zellkulturüberstand das Zytokin VEGF mit Hilfe eines ELISA quantifiziert (**Abb. 15C, Abb. 16C, Abb. 17**).

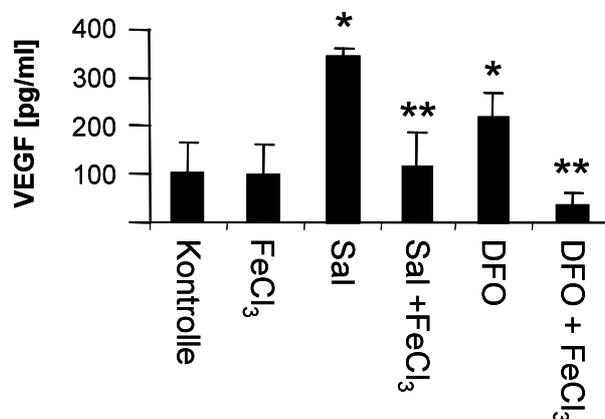


Abb. 17: VEGF-Sekretion von HeLa229-Zellen nach Inkubation mit Salmochelin. Inkubation von HeLa229-Zellen über 16 h mit Salmochelin (Sal; 200µM) oder eisengesättigtem Sal (Sal+FeCl₃: 200µM). Als Negativkontrolle wurden unbehandelte Zellen (Kontrolle) oder mit Eisen behandelte Zellen (FeCl₃: 200µM) verwendet, als Positivkontrolle mit DFO (200µM) oder mit Eisen gesättigtem DFO (DFO+FeCl₃: 200µM) behandelte Zellen. VEGF wurde im Dreifachansatz mittels ELISA aus dem Zellkulturüberstand quantifiziert (pg/ml). * Signifikante Unterschiede verglichen mit unbehandelten Kontrollzellen (p < 0,01). ** Signifikante Unterschiede zwischen Sal- oder DFO-behandelten Zellen und Zellen, die mit Eisen-gesättigtem Sal oder DFO behandelt wurden (p < 0,01).

Auch hier erbrachten die Ybt-Proben eine Verdopplung der Werte gegenüber der Negativkontrolle und einen Rückgang der Werte nach Sättigung von Ybt mit Eisen (**Abb. 15C**). Vergleichbare Ergebnisse wurden für die Siderophore Aeb (**Abb. 16C**) und Sal (**Abb. 17**) erzielt.

Somit konnte die HIF-1-Aktivierung durch bakterielle Siderophore in HeLa229-Zellen auf drei Ebenen (Transkriptionsfaktoranalyse, mRNA- und Proteinlevels) nachgewiesen werden. Die Vergleichbarkeit der Ergebnisse der drei unterschiedlichen Siderophore und der Rückgang der Werte nach Eisensättigung der bakteriellen Chelatoren läßt auf eine Abhängigkeit dieses Prozesses von der Anwesenheit der funktionstüchtigen Siderophore schließen.

3.3 Siderophor-abhängige Induktion der VEGF-Sekretion nach Infektion mit *Enterobacteriaceae*

Um in einem *in vitro*-Infektionsmodell die Abhängigkeit der VEGF-Sekretion von Wirtszellen von bakteriellen Siderophoren zu analysieren, wurden HeLa229-Zellen mit *Enterobacteriaceae*-Wildtypen oder den Siderophor-Aufnahme-negativen Mutanten infiziert. Diese Mutanten sind zwar in der Lage, Siderophore zu bilden, die Wiederaufnahme der eisengesättigten Siderophore in die Zelle ist aber aufgrund des Fehlens des Siderophor-Rezeptors nicht möglich. Diese Experimente wurden unter Verwendung von Transwellfiltern der Porengröße 0,4 µM vorgenommen, die die Bakterien von den Zellen trennten, jedoch die Siderophore frei passieren ließen. Dies verhinderte einen direkten Kontakt der Zellen mit den Bakterien. Als Negativkontrolle dienten unbehandelte Zellen, als Positivkontrolle mit DFO inkubierte Zellen (**Abb. 18**).

Nach einer Inkubationszeit von 16 Stunden wurde aus dem Zellkulturüberstand die VEGF-Konzentration mittels ELISA bestimmt. Dabei zeigte sich eine Erhöhung der VEGF-Sekretion in den mit Wildtypen infizierten Zellen gegenüber der Negativkontrolle. Die Mutanten dagegen erbrachten keine verstärkte Sekretion, die Werte lagen auf Höhe der Negativkontrolle.

Damit untermauern diese Daten die zuvor aufgezeigten Ergebnisse und lassen vermuten, dass eine starke Abhängigkeit der HIF-1-Aktivierung von der Bildung und Aufnahme der Siderophore existiert.

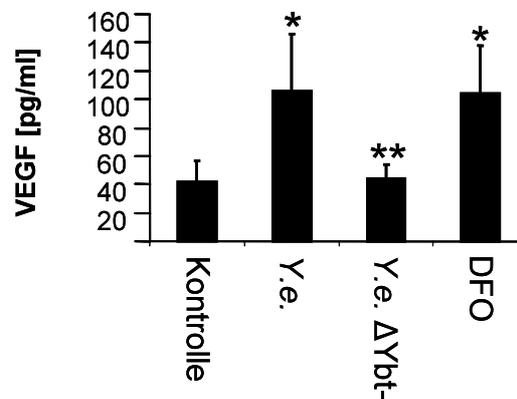


Abb. 18: Wirtszell-Sekretion von VEGF nach Infektion mit *Enterobacteriaceae* und Siderophor-Aufnahme-negativen Mutanten in einem Transwell-Filtersystem. Infektion von HeLa229-Zellen mit *Y. enterocolitica* (*Y. e.*) und deren Siderophor-Aufnahme-negative Mutante (*Y.e. ΔYbt-*). Negativkontrolle: unbehandelte Zellen, Positivkontrolle: mit 200μM DFO behandelte Zellen. Inkubationsdauer 16 h. VEGF-Quantifizierung aus dem Zellkulturüberstand (pg/ml). Vierfachansatz. *Signifikanter Unterschied zur Kontrolle ($p < 0,05$). **Signifikanter Unterschied zum Siderophor-sekretierenden Wildtyp ($p < 0,05$).

3.3.1 Nachweis der Siderophor-abhängigen HIF-1-Aktivierung mittels HIF-1α-Immunoblot und Reporterassay

Zusätzlich zum Nachweis der VEGF-Sekretion wurden in Kooperation mit Frau Dr. Hanna Hartmann HIF-1α-Immunoblots mit den Wildtypen von *Y. enterocolitica* und *S. enterica* spp. *enterica* und den Siderophor-Aufnahme-negativen Mutanten *Y. enterocolitica* Δ*Ybt* und *S. enterica* Δ*Sal* durchgeführt. Als Negativkontrolle dienten unbehandelte HeLa229-Zellen (siehe **Anhang Abb. 1A**).

Es zeigte sich eine erhöhte Aktivierung von HIF-1α in den mit *Enterobacteriaceae*-Wildtypen infizierten HeLa229-Zellen. Diese Aktivierung blieb bei Infektion mit Siderophor-Aufnahme-negativen Mutanten (Δ*Ybt*, Δ*Sal*) aus.

Des Weiteren wurde nachgewiesen, dass die Aktivierung des *Hypoxia-responsive Element* (HRE), der Erkennungssequenz für HIF-1 α , nach Infektion mit den Wildtypen gegenüber der Infektion mit den Mutanten signifikant verstärkt war (siehe **Anhang Abb. 1B**).

Durch diese Experimente wird die Abhängigkeit der HIF-1-Aktivierung durch *Enterobacteriaceae* von der Bildung und Wiederaufnahme der von ihnen gebildeten Siderophore deutlich. Außerdem konnte hierdurch eine mögliche Rolle von LPS in der Aktivierung von HIF-1 weitgehend ausgeschlossen werden.

3.4 Untersuchungen zur Spezifität der HIF-1-Aktivierung durch Siderophore

Um die Wirtszellantwort der HIF-1-Aktivierung auf Eisen-Komplementierung durch Siderophore zurückführen zu können, wurden verschiedene Kontrollexperimente vorgenommen und die Unabhängigkeit dieses Mechanismus von LPS oder dem Sauerstoffverbrauch gezeigt.

3.4.1 Ausbleibende HIF-1-Aktivierung durch LPS

Um die Spezifität der HIF-1-Aktivierung durch Siderophore zu bestätigen, sollte zunächst eine Aktivierung des Transkriptionsfaktors durch LPS über die Bestimmung von sekretiertem VEGF ausgeschlossen werden. Hierfür wurde aus *E. coli* isoliertes LPS für 16 Stunden zu HeLa229-Zellen gegeben. Als Negativkontrolle dienten wiederum unbehandelte Zellen, als Positivkontrolle mit DFO inkubierte Zellen. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde das HIF-1-regulierte Zytokin VEGF aus dem Zellkulturüberstand quantitativ erfasst (**Abb. 19**).

Es zeigte sich nach der Inkubation von HeLa229-Zellen mit LPS keinerlei statistisch relevante Erhöhung der VEGF-Expression im Vergleich mit Negativ- und Positivkontrolle. Damit erscheint eine Beteiligung von LPS an der HIF-1-Aktivierung unwahrscheinlich.

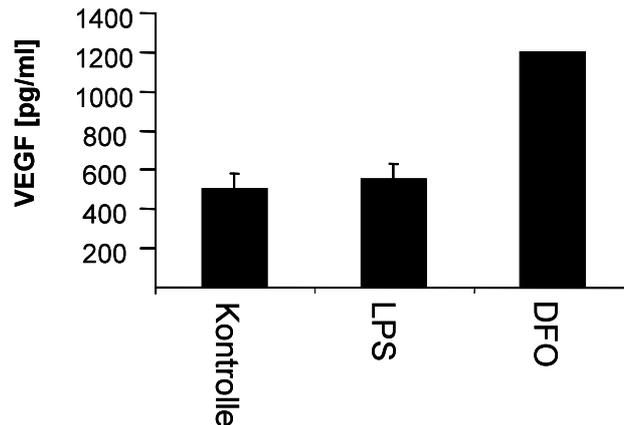


Abb. 19: Ausbleibende VEGF-Sekretion in HeLa229-Zellen nach Zugabe von Lipopolysacchariden von *E. coli*. 16-stündige Inkubation von HeLa229-Zellen mit LPS von *E. coli* (1pg/ml). Als Negativkontrolle dienen unbehandelte HeLa229-Zellen (Kontrolle), als Positivkontrolle mit DFO (200µM) inkubierte Zellen. VEGF wurde im Vierfachansatz aus dem Zellkulturüberstand quantifiziert (pg/ml).

3.4.2 Hypoxie-unabhängige HIF-1-Aktivierung durch *Enterobacteriaceae*

Da die Aktivierung von HIF-1 durch *B. henselae* bereits in anderen Arbeiten auf einen erhöhten Verbrauch des zellulären Sauerstoffs und einer daraus entstehenden Hypoxie zurückgeführt worden war ^{124,161}, sollte nun analysiert werden, ob im Gegensatz dazu die Aktivierung von HIF-1 durch *Enterobacteriaceae* unabhängig vom Sauerstoffverbrauch stattfindet.

Dies wurde in Infektionsexperimenten von HeLa229-Zellen mit *Y. enterocolitica* in Sauerstoff-durchlässigen und –undurchlässigen Kulturgefäßen und einer anschließenden HIF-1-Aktivitätsbestimmung untersucht (siehe **Anhang Abb. 2C**). Dabei ergab sich zwischen den beiden Untersuchungsgruppen keinerlei Unterschied in der Aktivierung von HIF-1 α .

Damit konnte bewiesen werden, dass die HIF-1-Aktivierung in HeLa229-Zellen durch *Enterobacteriaceae* einen sauerstoffunabhängigen Prozess darstellt. Diese Ergebnisse unterstreichen die Rolle des Eisenstoffwechsels (und der von den Bakterien gebildeten Siderophore) in der Aktivierung des Transkriptionsfaktors HIF-1.

3.5 Ausbleibende IL-8 Induktion in HeLa229-Zellen nach Behandlung mit Siderophoren

Um auszuschließen, dass die Aktivierung von HIF-1 durch *Enterobacteriaceae* und deren Siderophore Teil einer allgemeinen Aktivierung der Wirtszelle und damit auch anderer Transkriptionsfaktoren darstellt, sollte indirekt die Aktivität des Transkriptionsfaktors NF- κ B untersucht werden. Hierfür wurde exemplarisch die Transkription des NF κ B-regulierten Gens IL-8 analysiert.

Mittels real-time PCR und IL-8-ELISA sollten Transkription und Sekretion des Zytokins nach Inkubation mit den Siderophoren Yersiniabactin oder Salmochelin analysiert werden. HeLa229-Zellen wurden unbehandelt (Kontrolle) oder mit den gelösten Siderophoren über 6 h inkubiert, als Positivkontrolle wurde PMA verwendet. Nach Lysierung der Zellen erfolgte die Extraktion der mRNA, Umschreibung in cDNA und Analyse mittels real-time PCR. Als Standard diente das Gen der Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase (G6PDH) (**Abb. 20A+B**). Die IL-8-Konzentration wurde aus dem Zellkulturüberstand von infizierten Zellen bestimmt (**Abb. 20C**).

Sowohl für Ybt als auch für Sal konnte weder eine erhöhte Transkription des IL-8-Gens noch eine ernste IL-8-Sekretion nachgewiesen werden. Aus diesen Versuchen ergibt sich damit kein Hinweis auf eine Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B durch Siderophore.

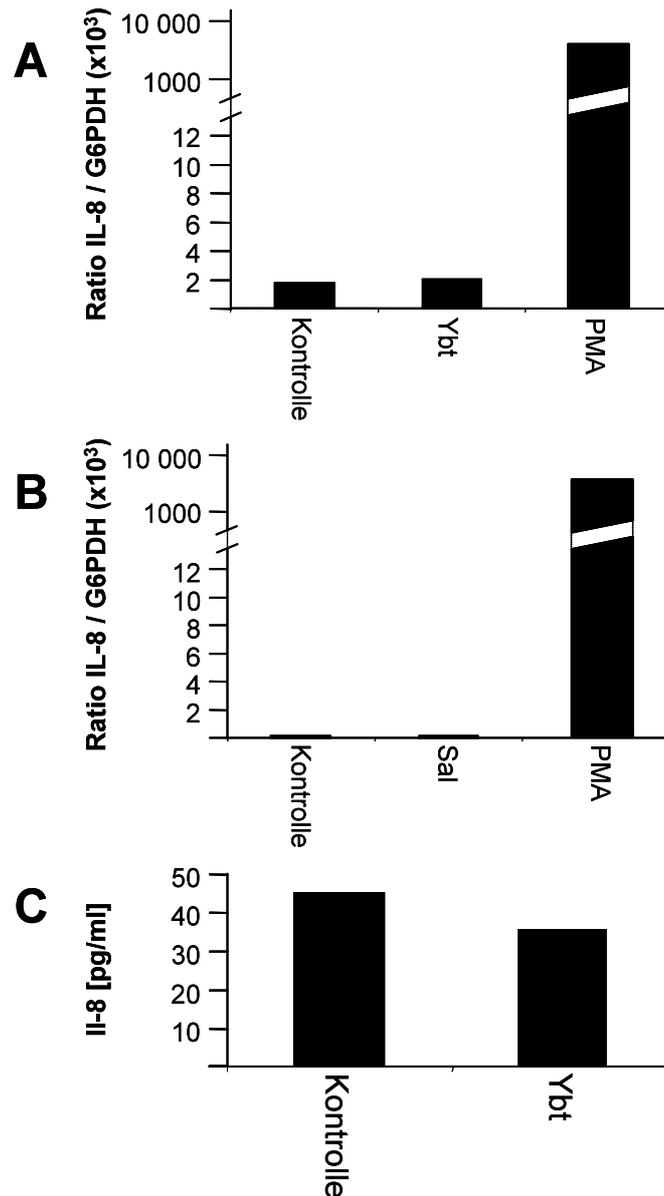


Abb. 20: Ausbleibende IL-8 Geninduktion in HeLa229-Zellen nach Behandlung mit Yersiniabactin oder Salmochelin. Inkubation von HeLa229-Zellen mit Yersiniabactin (Ybt; 200 μ M) oder Salmochelin (Sal; 200 μ M). Positivkontrolle: PMA (25ng/ml). Negativkontrolle: unbehandelte Zellen (Kontrolle). **(A)** Ausbleibende Induktion von IL-8 durch Yersiniabactin. Inkubation über 6 h. Quantifizierung der IL-8 mRNA im Light cycler (Ratio: IL-8/G6PDH-Transkripte; Mittelwerte gezeigt). **(B)** Ausbleibende Induktion von IL-8 durch Salmochelin. **(C)** Ausbleibende IL-8-Sekretion nach Inkubation mit Yersiniabactin. Inkubation über 24 h. IL-8-Quantifizierung im Dreifachansatz aus dem Zellkulturüberstand.

3.6 Induktion einer VEGF-Sekretion in HeLa229-Zellen durch Lactoferrin

Da die HIF-1-Aktivierung der *Enterobacteriaceae* durch die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente klar auf deren Bildung eisenbindender

Siderophore zurückzuführen ist, sollte nun untersucht werden, ob auch andere Eisenchelatoren diese Aktivierung in HeLa229-Zellen auslösen können. Die Auswahl fiel auf das humane Lactoferrin (LF), das einen potenten Eisenchelator darstellt¹⁸⁷. Nach der Lösung von LF in Infektionsmedium, erfolgte die Sättigung einer Lösungshälfte mit Eisen. HeLa229-Zellen wurden mit LF, eisengesättigten LF oder den Negativ- oder Positivkontrollen 16 h inkubiert und danach die VEGF-Konzentration aus dem Zellkulturüberstand mit Hilfe eines ELISAs ermittelt (**Abb. 21**).

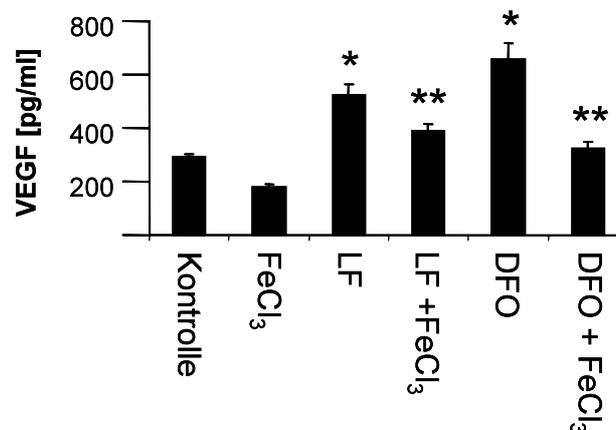


Abb. 21: VEGF-Sekretion von HeLa229-Zellen nach Inkubation mit Laktoferrin. Inkubation von HeLa229-Zellen über 16 h mit Laktoferrin (LF; 20µM) oder eisengesättigtem LF (LF+FeCl₃; LF: 20µM, FeCl₃: 200µM). Als Negativkontrolle wurden unbehandelte Zellen (Kontrolle) oder mit Eisen behandelte Zellen (FeCl₃: 200µM) verwendet, als Positivkontrolle mit DFO (200µM) oder mit Eisen gesättigtem DFO (DFO+FeCl₃; beide 200µM) behandelte HeLa229-Zellen. VEGF wurde im Vierfachansatz mittels ELISA aus dem Zellkulturüberstand quantifiziert (pg/ml). * Signifikante Unterschiede verglichen mit unbehandelten Kontrollzellen (p < 0,01). ** Signifikante Unterschiede zwischen LF- oder DFO-behandelten Zellen und Zellen, die mit Eisen-gesättigtem LF oder DFO behandelt wurden (p < 0,01).

Lactoferrin bewirkte in den HeLa229-Zellen eine deutlich erhöhte Sekretion von VEGF (im Gegensatz zur Negativkontrolle), die durch Sättigung mit Eisen aufgehoben wurde.

4 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, ob eine Infektion mit *Enterobacteriaceae* eine erhöhte HIF-1-Aktivität in Wirtszellen zur Folge hat. Es konnte gezeigt werden, dass (i) eine Infektion mit *Enterobacteriaceae* eine Aktivierung von HIF-1 und eine Induktion dessen Genprogramms hervorruft, (ii) diese HIF-1-Aktivierung auf die Bildung und Wiederaufnahme von bakteriellen Eisenchelatoren, sogenannten Siderophoren, zurückzuführen ist, (iii) dieser Aktivierungsweg eine hohe Abhängigkeit von der Eisenverfügbarkeit für die Zellen zeigt, (iv) andere Faktoren wie LPS dabei keine Rolle spielen und (v) weitere, z. B. NF- κ B regulierte Gene (z. B. IL-8) nicht induziert werden.

4.1 Aktivierung von HIF-1 in Endothelzellen nach Infektion mit *Enterobacteriaceae*

B. henselae ruft eine starke Aktivierung des Transkriptionsfaktors HIF-1 und dessen Genprogramms hervor^{161,162,248}. HIF-1 gilt als der wichtigste Transkriptionsfaktor in der Neu- und Umbildung von Blutgefäßen, der sogenannten Angiogenese. Die HIF-1-regulierten Zytokine VEGF, PDGF, PIGF und Endothelin-1 sowie die Enzyme eNOS und HO-1 bewirken in Endothelzellen eine verstärkte Proliferation, Fenestrierung und verstärktes Wachstum^{69,97,160,185,286,324} und damit eine Neu- und Umbildung der Blutgefäße. Das Bakterium *B. henselae* ist einzigartig in seiner Fähigkeit, vaskuloproliferative Erkrankungen zu verursachen. So bilden sich bei der bazillären Angiomatose und der Peliosis hepatis tumorartige, stark vaskularisierte Proliferate an der Haut und an anderen Organen^{144,169}. Dabei wird in Biopsaten aus diesen Tumoren eine verstärkte Gefäßneubildung beobachtet²⁴⁵. Erst kürzlich konnte unsere Arbeitsgruppe zeigen, dass diese Veränderungen auf die Aktivitätssteigerung des Transkriptionsfaktors HIF-1 α und dessen Genprogramms zurückzuführen ist¹⁶¹.

Bisher wurde noch nicht vollständig geklärt, wie bei einer *B. henselae*-Infektion HIF-1 aktiviert wird. Vermutlich liegt die Ursache in der Ausbildung hypoxischer Bedingungen während der Infektion¹⁶¹ und hierdurch scheinen die

HIF-1- regulierenden PHDs inaktiviert zu werden (s. Kapitel 4.4). Diese hydroxylieren zwei Prolinreste in der ODD von HIF-1 α nur dann, wenn Sauerstoff, Eisen und 2-Oxoglutarat vorhanden sind. Dadurch erst kann das „von Hippel-Lindau“-Tumorsuppressorprotein binden^{90,142,143}. Diese Bindung leitet die Ubiquitylierung und die anschließende Degradierung von HIF-1 α ein. Unter Hypoxie oder Eisenmangel werden damit die Prolylhydroxylasen inhibiert, sodass HIF-1 α stabil bleibt und im HIF-1-Komplex als Transkriptionsfaktor aktiv sein kann¹⁹⁹.

In dieser Arbeit konnte erstmalig gezeigt werden, dass auch *Enterobacteriaceae in vitro* den Transkriptionsfaktor HIF-1 und ein HIF-1-reguliertes Genprogramm in Endothelzellen aktivieren. Hierfür wurden HeLa229-Zellen mit dem Eisenchelator und bekannten HIF-1-Aktivator DFO behandelt und als Positivkontrolle verwendet. Nach Infektionen mit den *Enterobacteriaceae* (*Y. enterocolitica*, *E. aerogenes* und *S. enterica*) zeigt sich eine verstärkte Aktivierung von HIF-1 (s. Kapitel 3.1), die auch posttranskriptionell über eine Erhöhung der HIF-1-regulierten ADM-, HKII- und VEGF nachgewiesen werden konnte (s. Kapitel 3.1.1).

Die vorliegende Arbeit bildete des Weiteren den Grundstein für die Untersuchung der HIF-1-Aktivierung durch *Enterobacteriaceae in vivo*. Hierfür wurden Mäuse mit *Y. enterocolitica* infiziert und deren Peyersche Plaques (PPs) mit denen der uninfizierten Mäuse verglichen (**Anhang Abb. 3A**). Es zeigte sich eine makroskopisch sichtbare verstärkte Durchblutung und Neovaskularisierung der PPs nach Infektion. In einer immunhistologischen Untersuchung konnte eine verstärkte Aktivierung von HIF-1 α in den *Y. enterocolitica*-infizierten PPs nachgewiesen werden (**Anhang Abb. 3B**). Auch die VEGF-Konzentration im Serum nach Infektion mit *Y. e.* war signifikant gegenüber den Seren der uninfizierten Mäuse erhöht (**Anhang Abb. 3C**). Zusätzlich wurden HIF-1-deletierte Mäuse und Wildtyp-Mäuse mit *Y. enterocolitica* infiziert und die Überlebensrate beider Gruppen miteinander verglichen (**Anhang Abb. 3D**), hierbei zeigten die intestinalen HIF-1^{-/-} Mäuse eine signifikant erniedrigte Überlebensrate¹²⁴.

All diese Ergebnisse belegen eine deutliche Aktivierung von HIF-1 *in vivo* nach Infektion mit *Enterobacteriaceae*. Diese Aktivierung geht mit einer verstärkten Angiogenese in den ersten Immunbarrieren des Darms, den Peyerschen Plaques einher. Dies spricht dafür, dass dieser HIF-1-Aktivierung eine wichtige Rolle in der intestinalen Yersiniose zukommt.

Unsere Ergebnisse belegen, dass auch Infektionen mit anderen Bakteriengattungen als die der Bartonellen zu einer Aktivierung des Transkriptionsfaktors HIF-1 führen und damit zu einer Induktion proangiogenetischer Zytokine. Wie die *in vivo*-Ergebnisse zeigen, ist diese Aktivierung von großer funktioneller Bedeutung in der Überwindung intestinaler Infektionen.

4.2 Die Rolle des Transkriptionsfaktors HIF-1 in Infektion und Inflammation

In der Literatur tauchte in den letzten Jahren immer wieder die Hypothese auf, dass HIF-1 ein wichtiger Transkriptionsfaktor in Infektion und Inflammation sei. So zeigte sich wiederholt eine HIF-1-Aktivierung im Zusammenhang mit bakteriellen Infektionen. Ebenso wie *B. henselae* und die in dieser Arbeit verwendeten *Enterobacteriaceae* verursachten auch Streptokokken der Gruppe A, Methicillin-resistente *S. aureus* (MRSA), *P. aeruginosa* und *S. typhimurium* eine HIF-1-Aktivierung²³². Des Weiteren wurde nach Infektionen mit *Y. enterocolitica* und *M. tuberculosis* eine erhöhte Expression von HIF-1-regulierten Genen nachgewiesen^{29,241,263}. Zudem zeigen Makrophagen aus HIF-1 α -negativen Mäusen eine verringerte Fähigkeit zur Phagozytose, HIF-1 α -negative Mäuse weisen größere Nekroseherde der Haut bei Infektionen mit Streptokokken der Gruppe A auf und aus den Biopsaten konnten weit größere Mengen des Erregers isoliert werden als bei den Wildtyp-Mäusen. Eine weitere Studie kam zu dem Ergebnis, dass *P. aeruginosa* HIF-1 α auch in Enterozyten aktiviert¹⁷⁵.

Auch das Bakterium *Chlamydia pneumoniae* aktiviert unter hypoxischen Bedingungen der Wirtszelle HIF-1 und ermöglicht damit eine verbesserte

Glukoseaufnahme während der Infektion. Diese erhöhte HIF-1-Aktivität erwies sich als essentiell für die erfolgreiche Replikation von *C. pneumoniae* unter Hypoxie²⁵⁴.

In klinischen Studien zeigten sich Korrelationen zwischen erhöhter HIF-1-Aktivierung und infektiösen oder inflammatorischen Vorgängen bei Patienten. So konnte bei Patienten mit *Helicobacter pylori*-assoziierter Gastritis eine erhöhte Aktivität von HIF-1 und eine vermehrte VEGF-Transkription in den gastrischen Epithelzellen nachgewiesen werden³²¹. In Patienten mit Infektionen des RS-Virus (*respiratory syncytial-Virus*) im Respirationstrakt zeigte sich ebenfalls eine Aktivierung von HIF-1 in den epithelialen Bronchialzellen. Der Aktivierungsweg schien hierbei durch eine Freisetzung von *nitric oxide* (NO) induziert worden zu sein¹⁶⁴. Broncholavagen von Asthma-Patienten wiesen ebenfalls eine erhöhte HIF-1-Aktivität und Induktion von VEGF auf¹⁸⁶. Eine weitere Hypothese lautet, dass in entzündlichen Darmerkrankungen das Ubiquitin-Protein verändert ist, damit die Degradation von HIF-1 α nicht mehr stattfinden kann und so ebenfalls eine Aktivitätssteigerung dieses Transkriptionsfaktors entsteht²⁸⁹. Auch in artherosklerotischen Plaques konnte erhöhte HIF-1-Aktivität festgestellt werden, die mit einem atheromatösen, entzündlichen Plaquephänotyp einherging²⁹⁸. Außerdem konnte bewiesen werden, dass unter septischen Bedingungen im Menschen und der Maus die Serumkonzentration der HIF-1-regulierten Gene VEGF und PlGF signifikant erhöht ist und dass das Abfangen dieser freien Zytokine mit Hilfe von löslichen VEGF-Rezeptoren zu einer Verbesserung der kardialen Funktion führt³¹⁹. Eine neue Publikation weist darauf hin, dass während einer Sepsis HIF-1 in Makrophagen aktiviert wird und dass eine Zerstörung von HIF-1 eine Senkung der Mortalität und Morbidität unter Sepsis bewirkt²³¹.

Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, dass HIF-1 in Zellen des Immunsystems aktiviert wird, wenn es zu einer Infektion oder Inflammation kommt. So weisen vor allem Makrophagen^{48,130,231,287,298} eine erhöhte HIF-1-Aktivität auf. Durch Experimente mit HIF-1- oder VHL- (*von Hippel-Lindau-*

Protein) negativen Mutanten konnte die Bedeutung der HIF-1-Aktivierung für die Funktionsfähigkeit und die Überlebensfähigkeit von neutrophilen Granulozyten und anderen Vertretern der myeloischen Zelllinie gezeigt werden^{70,300,301}. Auch B-Lymphozyten zeigen eine starke Abhängigkeit ihrer Entwicklung und Funktionalität von HIF-1¹⁷¹.

Lokale Erwärmung und systemische Temperaturerhöhung sind typische Symptome für inflammatorische Prozesse. Temperaturen von >41°C bewirkten eine Akkumulation von HIF-1 α in Leber- und Nierenzellen¹⁵⁸. Des Weiteren zeigte sich, dass HIF-1 in Immunreaktionen verschiedenster Art involviert sein könnte. Die immunmodulatorischen Peptide Interleukin-1 (IL-1) und der Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) stimulieren HIF-1-abhängige Gene unter Normoxie über intrazelluläre Signalkaskaden, u. a. über die Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K/Akt) und die mitogen-aktivierte Proteinkinase (MAPK)^{127,279,325}. *Heat shock proteins* (HSPs) interagieren mit den α - und β -Untereinheiten von HIF-1 als Kofaktoren^{138,139,158,210}.

Die Summe dieser z. T. sehr neuen Erkenntnisse lässt vermuten, dass der Transkriptionsfaktor HIF-1 α ein wichtiges Agens des Immunsystems unter infektiösen und inflammatorischen Bedingungen darstellt. Die vorliegende Arbeit zeigt hierbei zum ersten Mal eine direkte Aktivierung von HIF-1 α durch verschiedene Vertreter der Gattung *Enterobacteriaceae* und damit einen weiteren Beweis der Aktivierung von HIF-1 durch Infektion mit Bakterien. Die weite Verbreitung dieser Aktivierung unter bakteriellen Infektionen sollte in Zukunft durch weitere Experimente mit anderen Gattungen näher untersucht werden.

4.3 Die Rolle bakterieller Siderophore und des Eisenstoffwechsels in der Aktivierung von HIF-1

Eisen ist eines der wichtigsten Spurenelemente pro- und eukaryotischer Zellen. Aufgrund der Konkurrenz von Bakterien mit ihren Wirtszellen um die vorhandenen Eisenelemente haben Bakterien Strategien entwickelt, um Eisen

für ihren Stoffwechsel nutzen zu können. Eine dieser Strategien ist die Bildung von Eisenchelatoren, den sogenannten bakteriellen Siderophoren. Diese Siderophore sind essentiell für den Stoffwechsel und die Virulenz der Bakterien^{125,149}. Die in dieser Arbeit verwendeten Siderophore Yersiniabactin, Aerobactin und Salmochelin werden von Vertretern der Gattung *Enterobacteriaceae* gebildet. Dabei ist das Yersiniabactin so essentiell für die Virulenz von *Y. enterocolitica*^{125,229}, wie Aerobactin für *E.coli*^{149,179,307}, *K. pneumoniae*²¹⁸ und *S. flexneri*²⁹⁹.

Wie viele andere Enzyme brauchen auch die wichtigsten Enzyme der Degradation der HIF-1 α -Untereinheit, die *proline hydroxylase domain containing proteins* (PHDs), das Element Eisen als Kofaktor. Wenn bei einer bakteriellen Infektion durch deren Bildung von Siderophoren der Eisengehalt sinkt, müssten die PHDs in ihrer Funktion eingeschränkt werden und somit eine HIF-1-Aktivitätssteigerung stattfinden. Eine solche HIF-1-Aktivierung konnte bereits durch Zugabe von DFO zu Wirtszellen gezeigt werden³⁰³. Dabei ist zu beachten, dass es sich bei DFO ebenfalls um ein bakterielles Siderophor handelt, das erstmals aus dem Bakterium *Streptomyces pilosus* isoliert wurde²⁴. Diese bakterielle Herkunft des DFO ist in der Tumorangio-genese-forschung, in der DFO häufig als Abgiogeneseinduktor benutzt wird, bislang völlig unbeachtet geblieben.

In der vorliegenden Arbeit konnte erstmalig gezeigt werden, dass isolierte bakterielle Siderophore in der Tat HIF-1 aktivieren und eine HIF-1-regulierte Genexpression induzieren. Siderophor-behandelte HeLa229-Zellen wiesen dabei eine HIF-1-Aktivierung und eine Induktion von VEGF, ADM und HK II auf. Dass diese Aktivierung an die Verfügbarkeit der Siderophore für die Bakterien gekoppelt ist, bewiesen Experimente mit Siderophor-Aufnahme-negativen Mutanten. Des Weiteren wurde nachgewiesen, dass eine Eisensättigung der Siderophore die HIF-1-Aktivierung in Wirtszellen hemmt. Obwohl der Zusammenhang zwischen der HIF-1-Aktivierung durch Siderophore und der Aktivität der PHDs hier nicht weiter untersucht werden konnte, darf aber aus

diesen Resultaten durchaus vermutet werden, dass die verminderte Eisenkonzentration durch die Siderophore die PHD-Aktivität verringert.

Die Reduzierung der Eisenkonzentration durch bakterielle Infektionen^{46,47,101} wird durch die eisenbindende Eigenschaft der von den Bakterien gebildeten Siderophore erklärt. Aufgrund der Abhängigkeit der Virulenz der verschiedenen Bakterien von der Bildung der Siderophore^{125,149,179,218,229,299,307} liegt es zudem nahe, zu vermuten, dass ebenso die daraus resultierende HIF-1-Aktivierung zur Virulenz in bakteriellen Infektionen beiträgt. Dies würde den Transkriptionsfaktor HIF-1, neben seiner Bedeutung in der Angiogenese, zu einem wichtigen Faktor im Rahmen von bakteriellen Infektionen machen. Hieraus würden sich auch durch die Beteiligung der bakteriellen Siderophore und deren Abhängigkeit von Eisen eventuell neue Therapieoptionen bei bakteriellen Infektionen ergeben.

B. henselae scheint HIF-1 durch zelluläre Hypoxie als Resultat eines erhöhten O₂-Verbrauchs der Wirtszellen zu aktivieren^{124,161}. Dabei fiel diese HIF-1-Aktivierung durch Infektion mit Bartonellen aus, sobald der zelluläre Sauerstoffverbrauch durch den spezifischen Atmungsketten-Inhibitor Myxothiazol blockiert wurde (**Anhang Abb. 2 A**)^{124,290}. Hierbei war der Sauerstoffpartialdruck durch die Zugabe von Myxothiazol stark erhöht, bei Infektion mit *B. henselae* unter Zugabe von Myxothiazol zwar gegenüber der Negativkontrolle geringgradig vermindert, eine Aktivierung von HIF-1 blieb aber aus (**Anhang Abb. 2 A+B**). Eine Hypoxie-induzierte HIF-1-Aktivierung durch *B. henselae* scheint damit sehr wahrscheinlich zu sein.

Die vorliegende Arbeit demonstriert eine HIF-1-Aktivierung durch die Gattung *Enterobacteriaceae*, die von der Bildung und Wiederaufnahme von bakteriellen Eisenchelatoren, den Siderophoren, abhängig ist. Eine Abhängigkeit der HIF-1-Aktivierung vom Sauerstoffgehalt liegt bei dieser Infektion nicht vor, da die Aktivierung sowohl in hypoxischen als auch normoxischen Bedingungen stattfand (**Anhang Abb. 2 C+D**)¹²⁴. Die *Enterobacteriaceae* *Y. enterocolitica*,

E. aerogenes und *S. enterica* scheinen demnach einen anderen Regulationsweg für die Aktivierung von HIF-1 zu nutzen als *B. henselae*.

Einige Arbeitsgruppen berichteten in der Vergangenheit über eine HIF-1-Aktivierung durch Lipopolysaccharide (LPS), vornehmlich in Makrophagen^{28,99,140}. Durch deren Bindung an den CD14/TLR2/MD2-Rezeptorkomplex lösen diese Bestandteile der bakteriellen Zellmembran eine starke Immunreaktion des Wirtes aus, was auf eine Bedeutung dieses Faktors unter inflammatorischen Bedingungen hinweist^{277,314,323}. Allerdings konnte in dieser Arbeit eine VEGF-Induktion durch bakterielles LPS ausgeschlossen werden und auch frühere Daten unseres Labors zeigen eindeutig, dass die Applikation von LPS zu Epithelzellen weder in einer HIF-1-Aktivierung noch einer VEGF-Sekretion resultierten^{29,161}. Die Unterschiedlichkeit dieser Ergebnisse und der anderer Arbeitsgruppen sollte in weiterführenden Experimenten untersucht werden.

4.4 HIF-1-Aktivierung und Angiogenese in chronisch entzündlichen Darmerkrankungen

Viele Erkrankungen des Gastrointestinaltraktes zeigen in der Literatur immer wieder einen Zusammenhang mit der Ausbildung von Hypervaskularisierung und der Expression von VEGF oder dessen Transkriptionsfaktor HIF-1.

In dieser Arbeit wurde nachgewiesen, dass bakterielle Infektionen mit *Enterobacteriaceae* HIF-1 aktivieren sowie HIF-1-regulierte Zytokine induzieren und eine erhöhte Mikrovaskularisierung in den Peyer'schen Plaques des Darmes hervorrufen¹²⁴. Inwieweit diese Veränderungen der Darmmukosa den Verlauf der akuten Infektion mit diesen Erregern und die Klinik dieser Erkrankung beeinflussen, muss im Detail untersucht werden.

Die chronisch entzündlichen Darmerkrankungen (CEDs) Morbus Crohn und Colitis ulcerosa stellen in der westlichen Bevölkerung mit einer Inzidenz von 3-4:100.000/J, eine weit verbreitete, chronisch rezidivierende Erkrankungen unklarer Genese dar. Die differentialdiagnostischen Merkmale beider Erkrankungen sind in **Tab. 25** zusammengefasst.

Tab. 25: Differentialdiagnostische Merkmale Morbus Crohn und Colitis ulcerosa

	Morbus Crohn	Colitis ulcerosa
Epidemiologie	Inzidenz: 4/100 000/J 20.-40. LJ Raucher häufig	Inzidenz: 3/100 000/J 20.-40. LJ Raucher selten
Ätiologie	Unbekannt; vermutet wird eine genetische Prädisposition mit verminderter Abwehr gegen bakterielle Infektionen ^{32,33}	Unbekannt; auch hier dominieren die Hypothesen der genetischen Prädisposition und daraus resultierender geschwächter Immunabwehr ^{32,33,52}
Genetik	NOD2/CARD15-Mutationen in 50 % <small>118,133,137,188,240</small>	unbekannt
Lokalisation	Terminales Ileum Alle Bereiche des GI-Traktes	Colon aboral beginnend
Befall	Transmural, segmental	Mukosal, kontinuierlich
Histologie	Ödematöse, fibrotische Darmwand Epitheloidzellgranulome mit mehrkernigen Riesenzellen, Lymphadenopathie, aphthenähnliche Geschwüre, Fissuren und Fisteln	Ödematöse, gerötete Darmwand (Kontaktblutung) Kryptenabszesse mit Granulozyteninfiltration, Schleimhautulzerationen und Pseudopolypen; bei fortgeschr. Stadium Schleimhautatrophie
Klinik		
- intestinal	Abdominalschmerzen und Diarrhoen (Ohne Blut)	Blutig schleimige Diarrhoen, Abdominalschmerzen, Fieber
- extra-intestinal	Pyoderma gangränosum, Erythema nodosum, Uveitis, Arthritis	selten
Komplikationen	Fisteln und Abszesse	Toxisches Megakolon Maligne Entartung (18% nach 30 J.)
Therapie	5-Aminosalicylsäure (Mesalazin) oder Prednisolon experimentell: Ciclosporin, IL-10, TNF-Antikörper chronisch aktiver Verlauf: Azathioprin, 6-Mercaptopurin oder Methotrexat	5-Aminosalicylsäure (Mesalazin) oder Prednisolon; bei schweren Verläufen auch Ciclosporin experimentell: IL-10, Heparin, TNF-Antikörper chronisch aktiver Verlauf: Azathioprin oder 6-Mercaptopurin chirurgisch: Proktokolektomie

Ätiologie und Pathogenese dieser Erkrankungen sind bisher weitgehend unbekannt und bilden einen Schwerpunkt in der aktuellen klinischen und experimentellen Forschung. Die Hypothesen über die Pathogenese der CEDs reichen von genetischen Prädispositionen über Ernährungsunverträglichkeiten bis zu autoimmunologischen Phänomenen. Mehr und mehr setzt sich die Annahme durch, dass es sich hier um bakteriell getriggerte Erkrankungen in genetisch prädispositionierten Patienten handelt^{32,33}. Allerdings zeigen die Variationen der bisher dargestellten genetischen Veränderungen und der klinischen Phänotypen, dass wahrscheinlich eine Multifaktorialität und große Heterogenität in der Ätiologie dieser Erkrankungen besteht^{2,30,234}.

Die VEGF-Konzentration in Seren von Morbus Crohn- und Colitis ulcerosa-Patienten im aktiven Entzündungsstadium ist gegenüber der von gesunden Probanden signifikant erhöht¹¹¹. Dabei zeigte sich kein Unterschied zwischen den Patienten in inaktivem Entzündungsstadium und den gesunden Probanden. Auch in Biopsien aus aktiven Entzündungsherden konnte eine erhöhte VEGF-Konzentration gemessen werden¹¹². Außerdem ist in der Mukosa von entzündlichen Darmerkrankungen die Dichte der Mikrogefäße erhöht⁷⁵. Zudem war der HIF-1-induzierte *Platelet derived growth factor* PDGF in Makrophagen und Fibroblasten in der Kolonmukosa von entzündeten Darmabschnitten vermehrt exprimiert²⁵⁸. Auch in dieser Studie wurde eine deutliche Steigerung der Dichte der Mikrogefäße in der stark entzündeten Mukosa nachgewiesen.

Die klinischen und histologischen Ähnlichkeiten zwischen akut infektiösen und chronisch entzündlichen Darmerkrankungen ließen schon früh die Hypothese aufkommen, dass ein ätiologischer oder zumindest pathogenetischer Zusammenhang zwischen beiden Entitäten bestehe. In einigen Studien der Vergangenheit wurde versucht, einen direkten Zusammenhang zwischen bakteriellen Infektionen und der Entwicklung von CEDs festzustellen. So zeigte sich eine statistisch relevante Korrelation mit der Infektion durch *Y. enterocolitica*^{152,181,257}, *E. coli*^{57,76,77,152}, Streptokokken⁵⁷ und verschiedenen

fäkalen Bakterien^{255,283}. Ein auslösendes Agens konnte aber nicht isoliert werden.

Eine andere Hypothese zur Entstehung der CEDs beinhaltet mögliche Variationen des Genoms von erkrankten Personen. In den letzten Jahren hat sich diese Theorie zumindest teilweise bestätigt, allerdings taucht auch hier der Zusammenhang mit infektiösen Mechanismen auf, da diese neu gefundenen Mutationen alle eine Verminderung der körpereigenen Abwehrfähigkeit gegenüber Mikroorganismen hervorrufen.

So wurde eine genetische Prädisposition für chronisch entzündliche Darmerkrankungen lange vermutet und konnte durch die Entdeckung von NOD2 (*nucleotide-binding oligomerization domain*) und dessen Mutationen bei Morbus Crohn bestätigt werden^{118,133,137,188,240}. Ein Zusammenhang mit der infektiösen Pathogenese zeigt sich dadurch, dass diese Veränderungen der Mukosa eine verminderte antimikrobielle Aktivität bewirken.

Die Proteine NOD1 und NOD2 sind intrazelluläre Rezeptoren, die bakterielle Peptidoglykane erkennen¹³⁵ und so wesentlich zur Abwehr bakterieller Infektionen beitragen, indem sie einen der wichtigsten Transkriptionsfaktoren des Immunsystems, NFκB, aktivieren^{136,137}. Über eine positive Rückkopplung wird NOD2 ebenso durch NFκB aktiviert¹²⁹. NOD1 wird durch das Gen CARD4 (*caspase recruitment domain*) kodiert, NOD2 durch CARD15³³. NOD2 erkennt das MDP (*muramyl dipeptide*), einen Bestandteil der Peptidoglykane von gram-negativen und gram-positiven Bakterien¹⁰⁶. In verschiedenen Studien wurde ein gehäuftes Auftreten von Mutationen am NOD2-Gen auf Chromosom 16 in Morbus Crohn - Patienten festgestellt^{118,133,137,188,240}. Diese Mutationen führten zu einer herabgesetzten Abwehrlage gegenüber bakteriellen Infektionen^{129,168} und bewirken eine verminderte Aktivierung von DMBT1 (*deleted in malignant brain tumors 1*), einem weiteren Pathogenbindungsprotein, das die Zellinvasion von *Salmonella enterica* inhibiert und ebenfalls NFκB aktiviert²⁵⁵.

In der Darmmukosa wird NOD2 hauptsächlich in Panethzellen exprimiert¹⁸⁰. Diese merokrinen Drüsenzellen bilden Granula, die unter anderem Lysozyme, Phospholipasen, Laktoferrin und α-Defensine enthalten. In Resektaten aus aktiv

entzündeten Dünndarmabschnitten bei Morbus Crohn-Patienten war eine stark verminderte Expression der Defensine 5 und 6 feststellbar, was mit einer verminderten antimikrobiellen Aktivität einherging³⁰⁸. Diese Veränderung der Aktivität der Panethzellen gilt als eine der führenden Hypothesen in der Pathogenese von Morbus Crohn.

CHI3L1 (*chitinase3-like lectin 1*), ein Protein, das mit verschiedenen pathogenen Bedingungen (z.B. mit kolorektalen Karzinomen^{62,63} oder Entzündungen^{147,148}) Korrelationen zeigt, dessen Bedeutung jedoch noch unklar ist, vermindert die inflammatorische Zellantwort auf TNF α und IL-1¹⁹². Kürzlich wurde nachgewiesen, dass Chi3L1 in Colitis ulcerosa- und Morbus Crohn-Patienten vermehrt exprimiert wird und dass dies in einer erleichterten Zellinvasion in die intestinale Mukosa durch *S. typhimurium* resultiert²¹¹. Auch andere Studien wiesen eine herabgesetzte Immunantwort der Mukosa auf mikrobielle Infektionen mit *Candida albicans* und *S. typhi* bei Morbus Crohn- und Colitis ulcerosa-Patienten nach. Dabei waren die Phagozytose der Monozyten und die antimikrobielle Aktivität der Lymphozyten stark reduziert⁵².

Interessant ist in diesem Zusammenhang auch die Entstehung der reaktiven Arthritis (REA) und des Reiter-Syndroms als Zweiterkrankung nach gastrointestinalen Infekten und der intestinalen Arthropathien bei CED-Patienten. Beide Erkrankungen gehören zum Formenkreis der seronegativen Spondylarthritiden (SPA), die mit dem *human leukocyte antigen B27* (HLA-B27) assoziiert sind^{3,79}. So zeigt sich bei der REA eine asymmetrische, entzündliche Oligo- oder Monoarthritis vor allem der unteren Extremität¹⁶³ nach gastrointestinalen oder urogenitalen Infekten mit den gram-negativen *Enterobacteriaceae Salmonella* spp.^{109,191,197}, *Yersinia* spp.^{4,110,278}, *Shigella* spp.^{120,296}, *Campylobacter jejuni*^{21,173} sowie *Chlamydia* spp.^{103,121}. Hierbei konnten die bakteriellen Erreger selbst nicht aus den Gelenkpunktaten isolieren werden, sondern nur deren Antigene.

Viele der Patienten mit CED erkranken im Verlauf der Jahre an enteropathischer Arthritis oder Sakroiliitis, wobei die Prozentangaben von

10-15%²³⁶ bis zu 33%²²⁸ reichen. Ob auch diese Form der SPA mit einer Ansammlung bakterieller Antigene in den entzündeten Gelenken einhergeht, wurde bisher nicht untersucht. Auch hier zeigt die klinische und serologische Aktivität der seronegativen Spondylarthritiden eine enge Korrelation mit der Höhe des VEGF-Spiegels im Serum⁸⁶.

Einen direkten Zusammenhang zwischen HIF-1-Aktivierung und dem Auftreten von CEDs wiesen Cummins und Taylor nach: die Applikation von DMOG (*dimethyloxalylglycine*), einer den Abbau von HIF-1 hemmenden Hydroxylase, hatte in einem Kolitismodell einen eindeutig protektiven Effekt auf die Entstehung von Colitis⁷⁴. Diese Publikation macht den Stellenwert der HIF-1-Aktivierung in der Darmschleimhaut bei CEDs deutlich und weist zudem in eine völlig neue Richtung der therapeutischen Ansatzmöglichkeiten.

In Einklang mit den aktuellen Forschungsergebnissen werfen unsere Ergebnisse nun die Frage auf, ob die HIF-1-Aktivierung durch *Enterobacteriaceae* einen ätiologischen oder pathogenetischen Zusammenhang mit der HIF-1-Aktivierung in chronisch entzündlichen Darmerkrankungen hat. Eine Vorschädigung der Darmmukosa durch eine bakterielle Infektion und damit ein höheres Risiko an CED zu erkranken, wäre durchaus denkbar. Eine weitere Hypothese könnte lauten, dass es sich bei den CEDs um eine reaktive Entzündung auf persistierende bakterielle Antigene handelt. Gestärkt wird diese Theorie durch die Entstehung der reaktiven Arthritis nach gastrointestinalen Infektionen durch *Salmonella* spp., *Yersinia* spp, *Campylobacter* u.a.^{110,191,197,278}. Auch die Entstehung neuer Entzündungsschübe von CEDs durch akute Infektionen mit *Enterobacteriaceae* und den damit verbundenen mukosalen Veränderungen muss in Betracht gezogen werden.

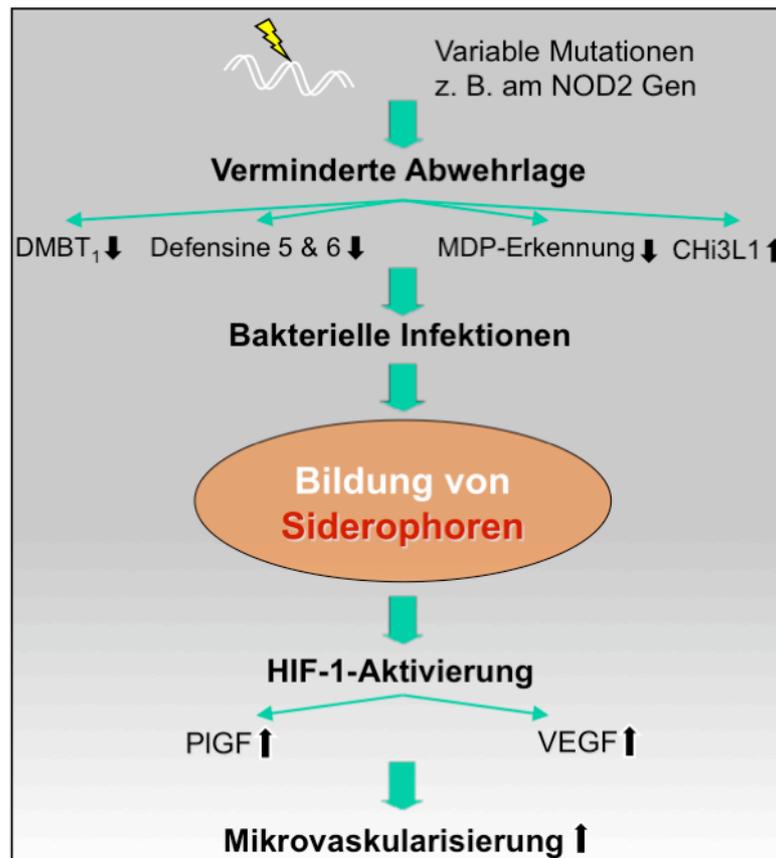


Abb. 22: Hypothese zur Rolle von Siderophoren in der Ätiologie der chronisch entzündlichen Darmerkrankungen. Verschiedene Mutationen (z.B. am NOD2 Gen) führen zu einer verminderten Abwehrlage des Organismus. Dies äußert sich in der Veränderung mehrerer Faktoren, so z. B. in der verminderten Aktivierung von DMBT1, in der verminderten Expression der Defensine 5 und 6, der verringerten Erkennung von MDP und einer vermehrten Expression von Chi3L1. Alle diese Veränderungen führen zu einer Erleichterung der Zellinvasion bei bakteriellen Infektionen (insbesondere durch Salmonellen) oder einer generellen Verminderung der antimikrobiellen Aktivität. Durch die Infektion mit Bakterien werden Siderophore ausgeschüttet, die, wie in dieser Arbeit gezeigt, eine HIF-1-Aktivierung bewirken und so durch die Transkription von VEGF und PIGF die Mikrovaskularisierung in der Mukosa anregen. Diese Mikrovaskularisierung ist eines der histologischen Merkmale der entzündeten Darmschleimhaut. NOD2: *nucleotide-binding oligomerization domain2*; DMBT1: *deleted in malignant brain tumors 1*; MDP: *muramyl deipeptide*; Chi3L1: *chitinase3-like lectin1*.

Inwieweit die Angiogenese in bakteriellen Entzündungen des Darmes eine pathologische Rolle spielt oder ob die Therapie mit anti-angiogenetischen Pharmaka (z. B. Bevacizumab, Avastatin ®; ein VEGF-Antikörper) eine Verbesserung des Verlaufs der Entzündungen bringt, muss sich erst noch herausstellen.

In diesem Zusammenhang sind die Ergebnisse von Cummins und Taylor ⁷⁴ bemerkenswert, die belegen, dass HIF-1 mittels DMOG gehemmt wird und so

einen protektiven Effekt auf die entzündete Darmschleimhaut in einem Kolitismodell bewirkt. Diese pharmakologische HIF-1-Hemmung wäre eine neue und unter Umständen sehr vielversprechende Therapiemöglichkeit der CEDs und sollte in weiterführenden Experimenten untersucht werden.

4.5 HIF-1 und maligne Neoplasien des GI-Traktes

Für das Wachstum solider Tumoren ist, wie für alle Zellsysteme, die Versorgung mit Sauerstoff ein limitierender Faktor. Ab einer Größe der Tumoren von $> 3\text{mm}^3$ entstehen zu große Diffusionsabstände zwischen den einzelnen Zellen und den sie mit O_2 versorgenden Blutgefäßen; in der Folge übersteigt der O_2 -Verbrauch des Zellverbandes das Angebot^{17,297}. Die so entstehende Hypoxie hemmt die Degradation der α -Untereinheit von HIF-1 durch PHDs und aktiviert so diesen Transkriptionsfaktor^{256,273,302}. Somit ist in Tumoren, die mehr als 1 mm im Durchmesser wachsen, HIF-1 stark aktiviert, um eine tumoreigene Mikrogefäßversorgung durch Aktivierung der Angiogenese zu gewährleisten^{203,297}. Einer der wichtigsten Stimulatoren der Angiogenese ist das HIF-1-regulierte Zytokin VEGF, das eine Proliferation, Migration und verstärkte Fenestrierung der vaskulären Endothelzellen bewirkt und dadurch die Bildung neuer Blutgefäße ermöglicht^{54,97}. Des Weiteren induziert HIF-1 eine Reihe von Genprodukten und Rezeptoren, die ebenfalls eine Rolle in der Angiogenese spielen, darunter PDGF, Endothelin-1, eNOS, ADM, PlGF und HO-1^{68,69,160,185,286,324}. HIF-1 ist zudem für die anaerobe Energiegewinnung durch Glykolyse in Tumorzellen verantwortlich^{297,311}. In normoxischen Zellen wird ATP hauptsächlich durch die oxidative Phosphorylierung gewonnen. Unter hypoxischen Bedingungen, wie sie zumeist in tumorösem Gewebe herrschen, ist dieser Stoffwechselweg nicht möglich. Über eine Aktivierung von HIF-1 werden daher der membranöse Glukosetransporter GLUT-1 und verschiedene Enzyme der Glykogenolyse (*Phosphoglycerat Kinase-1* (PGK-1), Enolase-1, Phospho-fructokinase-L (PFKL), Lactatdehydrogenase-1 (LDH-1), Aldolase A und Pyruvatkinase M) induziert^{107,275}. Dadurch gewährleisten Tumorzellen mit Hilfe der Aktivierung von HIF-1 die anaerobe Energiegewinnung durch Glukoseabbau für ihren

Stoffwechsel. *Talks et al.* konnten in einer umfassenden Studie zeigen, dass viele humane Tumoren eine erhöhte HIF-1-Aktivität zeigen, darunter Mammakarzinome, hepatozelluläre Karzinome, Hypernephrome, Kolonkarzinome, ovariale Adenokarzinome und adenomatöse Pankreaskarzinome²⁸⁷.

Auch die malignen Entartungen der gastrointestinalen Mukosa weisen eine Assoziation mit der Aktivierung des Transkriptionsfaktors HIF-1 auf. So zeigte die gastrale Mukosa von Patienten mit Magenkarzinomen eine signifikant erhöhte Mikrovaskularisierung, was zudem einen prognostisch ungünstigen Faktor für die Überlebensrate der Patienten darstellte⁵⁹. In *Helicobacter pylori*-positiven Gastritiden, der im Magen am häufigsten stattfindenden Infektion, konnte ebenfalls eine erhöhte HIF-1-Aktivierung und VEGF-Expression nachgewiesen werden³²¹.

In Biopsien aus humanen kolorektalen Karzinomen war eine erhöhte HIF-1-Aktivität feststellbar^{287,326}. Ebenso zeigte sich eine erhöhte VEGF-Expression und Hypervaskularisierung^{284,285}. Des Weiteren wiesen die malignen Epithelzellen des Darmes eine stark erhöhte Expression von VEGF-mRNA im Gegensatz zum normalen Epithel, hyperplastischen Polypen und Adenomen auf, alle mit wenig oder gar keiner Erhöhung der VEGF-Expression⁴⁴, wobei die Expression der VEGF-mRNA dabei abhängig von der HIF-1-Aktivierung war¹⁰⁰. Seit 2005 ist der VEGF-Antikörper Bevacizumab (Avastin®) in Kombination mit Chemotherapeutika für das metastasierte kolorektale Karzinom in Deutschland zugelassen. Die Zulassung gilt hierbei für eine Kombination von Bevacizumab mit 5-FU/FS oder 5-FU/FS/Irinotecan. Die FDA (amerikanische *food and drug association*) ließ Bevacizumab bereits 2004 unter Berufung auf zwei klinische Studien zu. *Hurwitz et al.* zeigten 2004 in einer randomisierten doppelblinden placebokontrollierten Phase III-Studie eine signifikante Verlängerung der Überlebenszeit unter der Therapie mit Bevacizumab in Patienten mit metastasiertem kolorektalen Karzinom. Hierfür wurden 402 Patienten einer

Behandlung mit Irinotecan, 5-FU und Leukovorin plus Bevacizumab (5mg/kg Körpergewicht alle 2 Wochen) unterzogen, 411 weitere Patienten erhielten das gleiche Chemotherapieschema plus Placebo. Die mittlere Überlebenszeit verlängerte sich in der Bevacizumab-Gruppe von 15,6 auf 20,3 Monate, das progressionsfreie Überleben stieg von 6,2 auf 10,6 Monate ¹³⁴.

Kabbinavar et al. zeigten 2003 in einer randomisierten placebokontrollierten Phase-II-Studie, dass auch die Kombination von Bevacizumab mit 5-FU und LV zu einer Verlängerung der medianen Überlebenszeit und des progressionsfreien Überlebens führte. Hierfür wurden 36 Patienten mit kolorektalem metastasierten Karzinom mit 5-FU und FV, 35 mit 5-FU/FV und niedrig dosiertem Bevacizumab (5mg/kg Körpergewicht alle 2 Wochen) und 33 Patienten mit 5-FU/FV plus hoch dosiertem Bevacizumab (10mg/kg Körpergewicht) behandelt. Hierbei stieg die mediane Überlebenszeit von 13.8 auf 21.5 Monate in der niedrig dosierten Bevacizumab-Gruppe und auf 16.2 Monate in der hoch dosierten Gruppe. Die Zeit bis zur Krankheitsprogression verlängerte sich von 5,2 auf 9,0 Monate und auf 7,2 Monate in der hoch-dosierten Gruppe. Nach diesen Ergebnissen wurde eine Dosierung von 5mg /kg Körpergewicht empfohlen ¹⁵⁰.

Mittlerweile hat die FDA weitere Indikationen zur Behandlung mit Bevacizumab zugelassen, darunter für metastasierte HER2-negative Mammakarzinome (Zulassung 2008), metastasierte nicht-kleinzellige-Lungenkarzinome (Zulassung 2006) und für die Kombination mit FOLFOX4-Schemata bei metastasierten kolorektalen Karzinomen.

Die Hypothese liegt nahe, dass bakterielle Infektionen durch ihre ähnliche Wirkung an der Mukosa über den Transkriptionsfaktor HIF-1 möglicherweise einen kausalen oder präventiven Zusammenhang mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen und malignen Neoplasien aufweisen könnten. Wie die Infektion mit *H. pylori* die *Ulcera ventriculi* und Gastritis auslöst ¹⁹⁸ und einen Risikofaktor für die Entwicklung von Magenkarzinomen darstellt ⁴², könnten auch Infektionen (z. B. mit *Enterobacteriaceae*) für die Entstehung eines Kolonkarzinoms prädestinieren. Dies könnte z. B. untersucht werden durch den Vergleich zwischen keimfreien Mäuse- oder Tumormodellen und bakteriell

infizierten Tumormodellen. Auch die Therapie mit Bevacizumab oder anderen Hemmstoffen der HIF-1-Aktivierung oder der Expression HIF-1-regulierter Zytokine sollte in diesen Modellen noch weiter erforscht werden.

5 Zusammenfassung

Verschiedene Bakterien bilden Siderophore, um während einer Infektion Eisenionen in ihrer Umgebung zu binden und für den eigenen Stoffwechsel zu nutzen. Besonders für die Gattungen der *Enterobacteriaceae* (z. B. *Y. enterocolitica*, *S. enterica* und *E. aerogenes*), sind Siderophore für deren Virulenz essentiell^{125,229}. *B. henselae* löst vaskuloproliferative Erkrankungen (BA, PH) aus. Für diese Gefäßproliferation sind vermutlich die Aktivierung von HIF-1 und eine Induktion des HIF-1-regulierten Genprogramms während der Infektion verantwortlich^{161,162,248}. HIF-1 wird dabei durch Zellhypoxie aktiviert^{124,161}. HIF-1 ist der Schlüsseltranskriptionsfaktor der Angiogenese. Er wird von PHDs inaktiviert, die hierfür Eisenionen als Kofaktoren benötigen^{90,142,143,199}. Unter Eisenmangel wird HIF-1 aktiviert und ein HIF-1-reguliertes Genprogramm induziert. Ein solcher Eisenmangel ist u. a. während bakterieller Infektionen nachweisbar^{46,47,101}.

In dieser Arbeit sollte in Wirtszellen die HIF-1-Aktivierung durch Infektion mit *Enterobacteriaceae* nachgewiesen werden. Dabei galt es zu erforschen, durch welche Mechanismen diese Aktivierung hervorgerufen wird. Insbesondere die Rolle von bakteriellen Siderophore sollte hierbei untersucht werden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden folgende Ergebnisse erzielt:

1. *Enterobacteriaceae* (z. B. *Y. enterocolitica*, *S. enterica* und *E. aerogenes*) aktivieren HIF-1 und induzieren eine Sekretion HIF-1-regulierter Zytokine und Enzyme.
2. Die HIF-1-Aktivierung ist auf die Bildung solubler Substanzen zurückzuführen, da eine Trennung der Bakterien von den Wirtszellen durch Filtersysteme ebenfalls eine HIF-1-Aktivierung hervorrief.
3. Siderophore bewirken eine HIF-1-Aktivierung in den Wirtszellen.

-
4. Die Absättigung mit Eisen verhindert die Aktivierung von HIF-1 durch Siderophore.
 5. Die Aktivierung von HIF-1 ist von der Bildung und eisenbindenden Funktion von Siderphoren abhängig, da sie in Infektionen mit Siderophoraufnahme-defizienten Mutanten von *Y. enterocolitica* und *S. enterica* fast vollständig aufgehoben war.
 6. Die beobachtete HIF-1-Aktivierung ist während der Infektion mit *Y. enterocolitica* (im Gegensatz zur Infektion mit *B. henselae*) unabhängig von der zellulären Sauerstoffkonzentration¹²⁴.
 7. LPS bewirkt in Epithelzellen keine HIF-1-Aktivierung.

Die HIF-1-Aktivierung und die daraus resultierende Sekretion HIF-1-regulierter Zytokine und Enzyme wie z. B. VEGF scheint ein weitgehend unbekannter Mechanismus in der Wirtszellantwort während bakterieller Infektionen zu sein. Weitere Untersuchungen zur möglichen Rolle der HIF-1-Aktivierung während bakterieller Infektionen und insbesondere die der *Enterobacteriaceae* erscheinen dringend notwendig.

6 Literaturverzeichnis

- 1 Aguilu, *et al.*, „Bacteriostatic activity of human lactoferrin against *Staphylococcus aureus* is a function of its iron-binding properties and is not influenced by antibiotic resistance,“ *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **31**(2), 145 (2001).
- 2 T. Ahmad, S. E. Marshall, and D. Jewell, „Genetics of inflammatory bowel disease: the role of the HLA complex,“ *World J. Gastroenterol.* **12**(23), 3628 (2006).
- 3 K. Aho, *et al.*, „HL-A27 in reactive arthritis. A Study of *Yersinia* arthritis and Reiter's disease,“ *Arthritis Rheum.* **17**(5), 521 (1974).
- 4 P. Ahvonen, K. Sievers, and K. Aho, „Arthritis associated with *Yersinia enterocolitica* infection,“ *Acta Rheumatol. Scand.* **15**(3), 232 (1969).
- 5 K. Alitalo and P. Carmeliet, „Molecular mechanisms of lymphangiogenesis in health and disease,“ *Cancer Cell* **1**(3), 219 (2002).
- 6 R. P. Allaker, C. Zihni, and S. Kapas, „An investigation into the antimicrobial effect of adrenomedullin on members of the skin, oral, respiratory tract and gut microflora,“ *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **23**(4), 289 (1999).
- 7 R. Arnold, *et al.*, „Effects of *Listeria monocytogenes* and *Yersinia enterocolitica* on cytokine gene expression and release from human polymorphonuclear granulocytes and epithelial (HEp-2) cells,“ *Infect. Immun.* **61**(6), 2545 (1993).
- 8 R. R. Arnold, M. F. Cole, and J. R. McGhee, „A bactericidal effect for human lactoferrin,“ *Science* **197**(4300), 263 (1977).
- 9 I. B. Autenrieth, *et al.*, „Deferoxamine B but not deferoxamine G1 inhibits cytokine production in murine bone marrow macrophages,“ *J. Infect. Dis.* **172**(2), 490 (1995).
- 10 I. B. Autenrieth and R. Firsching, „Penetration of M cells and destruction of Peyer's patches by *Yersinia enterocolitica*: an ultrastructural and histological study,“ *J. Med. Microbiol.* **44**(4), 285 (1996).
- 11 I. B. Autenrieth, *et al.*, „Defense mechanisms in Peyer's patches and mesenteric lymph nodes against *Yersinia enterocolitica* involve integrins and cytokines,“ *Infect. Immun.* **64**(4), 1357 (1996).

-
- 12 I. B. Autenrieth, *et al.*, „Desferrioxamine-promoted virulence of *Yersinia enterocolitica* in mice depends on both desferrioxamine type and mouse strain,“ *J. Infect. Dis.* **169**(3), 592 (1994).
 - 13 S. Bach, Almeida A. de, and E. Carniel, „The *Yersinia* high-pathogenicity island is present in different members of the family *Enterobacteriaceae*,“ *FEMS Microbiol. Lett.* **183**(2), 289 (2000).
 - 14 A. Bagg and J. B. Neilands, „Molecular mechanisms of regulation of siderophore-mediated iron assimilation,“ *Microbiol. Rev.* **51**(4), 509 (1987).
 - 15 F. Barona-Gomez, *et al.*, „Multiple biosynthetic and uptake systems mediate siderophore-dependant iron acquisition in *Streptomyces coelicolor* A3(2) and *Streptomyces ambofaciens* ATCC 23877,“ *Microbiology* **152**(Pt11), 3355 (2006).
 - 16 A. J. Baumler and K. Hantke, „A lipoprotein of *Yersinia enterocolitica* facilitates ferrioxamine uptake in *Escherichia coli*,“ *J. Bacteriol.* **174**(3), 1029 (1992).
 - 17 N. J. Beasley, *et al.*, „Carbonic anhydrase IX, an endogenous hypoxia marker, expression in head and neck squamous cell carcinoma and its relationship to hypoxia, necrosis, and microvessel density,“ *Cancer Res.* **61**(13), 5262 (2001).
 - 18 D. L. Becton and P. Bryles, „Deferoxamine inhibition of human neuroblastoma viability and proliferation,“ *Cancer Res.* **48**(24 Pt 1), 7189 (1988).
 - 19 W. Bellamy, *et al.*, „Antibacterial spectrum of lactoferricin B, a potent bactericidal peptide derived from the N-terminal region of bovine lactoferrin,“ *J. Appl. Bacteriol.* **73**(6), 472 (1992).
 - 20 L. E. Benjamin, *et al.*, „Selective ablation of immature blood vessels in established human tumors follow vascular endothelial growth factor withdrawal,“ *J. Clin. Invest* **103**(2), 159 (1999).
 - 21 J. H. Berden, H. L. Muytjens, and L. B. van de Putte, „Reactive arthritis associated with *Campylobacter jejuni* enteritis,“ *Br. Med. J.* **1**(6160), 380 (1979).
 - 22 I. Berner, *et al.*, „Characterization of ferrioxamine E as the principal siderophore of *Erwinia herbicola* (*Enterobacter agglomerans*),“ *Biol. Met.* **1**(1), 51 (1988).

-
- 23 L. Bianchi, L. Tacchini, and G. Cairo, „HIF-1-mediates activation of transferrin receptor gene transcription by iron chelation,“ *Nucleic Acids Res.* **27**(21), 4223 (1999).
- 24 H. Bickel, *et al.*, „Stoffwechselprodukte von Actinomyceten: Über die Isolierung und Charakterisierung der Ferrioxamine A-F, neuer Wuchsstoff der Sideramin-Gruppe,“ In 43 ed. 1960), pp.2118-2128).
- 25 B. Bister, *et al.*, „The structure of salmochelins: C-glycosylated enterobactins of *Salmonella enterica*,“ *Biometals* **17**(4), 471 (2004).
- 26 M. J. Bjorn, *et al.*, „Effect of iron on yield of exotoxin A in cultures of *Pseudomonas aeruginosa* PA-103,“ *Infect. Immun.* **19**(3), 785 (1978).
- 27 J. Blatt and S. Stitely, „Antineuroblastoma activity of desferoxamine in human cell lines,“ *Cancer Res.* **47**(7), 1749 (1987).
- 28 C. Blouin, *et al.*, „Hypoxic gene activation by lipopolysaccharide in macrophages: implication of hypoxia-inducible factor 1 alpha,“ *Blood* **103**(3), 1124 (2004).
- 29 Bohn, *et al.*, „Gene expression patterns of epithelial cells modulated by pathogenically factors of *Yersinia enterocolitica*,“ *Cell Microbiol.* **6**(2), 129 (2004).
- 30 C. R. Boland, *et al.*, „Infection, inflammation, and gastrointestinal cancer,“ *Gut* **54**(9), 1321 (2005).
- 31 A. Bomford, *et al.*, „The effect of desferrioxamine on transferrin receptors, the cell cycle and growth rates of human leukaemic cells,“ *Biochem. J.* **236**(1), 243 (1986).
- 32 D. K. Bonen and J. H. Cho, „The genetics of inflammatory bowel disease,“ *Gastroenterology* **124**(2), 521 (2003).
- 33 D. K. Bonen, *et al.*, „Crohn’s disease-associated NOD2 variants share a signaling defect in response to lipopolysaccharide and peptidoglycan,“ *Gastroenterology* **124**(1), 140 (2003).
- 34 E. J. Bottone, „*Yersinia enterocolitica*: the charisma continues,“ *Clin. Microbiol. Rev.* **10**(2), 257 (1997).
- 35 E. J. Bottone, „*Yersinia enterocolitica*: overview and epidemiologic correlates,“ *Microbes. Infect.* **1**(4), 323 (1999).
- 36 E. Bouza, *et al.*, „*Yersinia enterocolitica* Septicemia,“ *Am. J. Clin. Pathol.* **74**(4), 404 (1980).

-
- 37 V. Braun, K. Gunter, and K. Hantke, „Transport of iron across the outer membrane,“ *Biol. Met.* **4**(1), 14 (1991).
- 38 V. Braun, *et al.*, „Functional organization of the outer membrane of *Escherichia coli*: phage and colicin receptors as components of iron uptake systems,“ *J. Supramol. Struct.* **5**(1), 37 (1976).
- 39 V. Braun, K. Hantke, and W. Koster, „Bacterial iron transport: mechanisms, genetics, and regulation,“ *Met. Ions. Biol. Syst.* **35**, 67 (1998).
- 40 D. Brem, *et al.*, „Functional analysis of yersiniabactin transport genes of *Yersinia enterocolitica*,“ *Microbiology* **147**(Pt 5), 1115 (2001).
- 41 D. J. Brenner, „Characterisation and clinical identification of *Enterobacteriaceae* by DNA hybridization,“ *Prog. Clin. Pathol.* **7**, 71 (1978).
- 42 H. Brenner, *et al.*, „Individual and joint contribution of family history and *Helicobacter pylori* infection to the risk of gastric carcinoma,“ *Cancer* **88**(2), 274 (2000).
- 43 K. A. Brogden, „Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria?,“ *Nat. Rev. Microbiol.* **3**(3), 238 (2005).
- 44 L. F. Brown, *et al.*, „Expression of vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) and its receptors in adenocarcinomas of the gastrointestinal tract,“ *Cancer Res.* **53**(19), 4727 (1993).
- 45 R. K. Bruick and S. L. McKnight, „A conserved family of prolyl-4-hydroxylases that modify HIF,“ *Science* **294**(5545), 1337 (2001).
- 46 J. J. Bullen, H. J. Rogers, and E. Griffith, „Role of iron in bacterial infection,“ *Curr. Top. Microbio. Immunol.* **80**, 1 (1978).
- 47 J. J. Bullen, *et al.*, „Iron and Infection: the heart of the matter,“ *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **43**(3), 325 (2005).
- 48 B. Burke, *et al.*, „Expression of HIF-1alpha by human macrophages: implications for the use of macrophages in hypoxia-regulated cancer gene therapy,“ *J Pathol.* **196**(2), 204 (2002).
- 49 B. R. Byers and J. E. Arceneaux, „Microbiol iron transport: Iron acquisition by pathogenic microorganisms,“ *Met. Ions. Biol. Syst.* **35**, 37 (1998).
- 50 G. Camenisch, R. H. Wenger, and M. Gassmann, „DNA-binding activity of hypoxia-inducible factors (HIFs),“ *Methods Mol. Biol.* **196**, 117(2002).

-
- 51 I. Caniggia, *et al.*, „Hypoxia-inducible factor-1 mediates the biological effects of oxygen on human trophoblast differentiation through TGFbeta(3),“ *J. Clin. Invest* **105**(5), 577 (2000).
- 52 L. Caradonna, *et al.*, „Phagocytosis, killing, lymphocyte-mediated antibacterial activity, serum autoantibodies, and plasma endotoxins in inflammatory bowel disease,“ *Am. J. Gastroenterol.* **95**(6), 1495 (2000).
- 53 P. Carmeliet, „Angiogenesis in health and disease,“ *Nat. Med.* **9**(6), 653 (2003).
- 54 P. Carmeliet, *et al.*, „Role of HIF-1alpha in hypoxia-mediated apoptosis, cell proliferation and tumour angiogenesis,“ *Nature* **394**(6692), 485 (1998).
- 55 E. Carniel, *et al.*, „Molecular cloning, iron-regulation and mutagenesis of the *irp2* gene encoding HMWP2, a protein specific for the highly pathogenic *Yersinia*,“ *Mol. Microbiol.* **6**(3), 379 (1992).
- 56 K. M. Caron and O. Smithies, „Extreme hydrops fetalis and cardiovascular abnormalities in mice lacking a functional Adrenomedullin gene,“ *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **98**(2), 615 (2001).
- 57 R. W. Cartun, *et al.*, „An immunocytochemical search for infectious agents in Crohn’s disease,“ *Mod. Pathol.* **6**(2), 212 (1993).
- 58 T. B. Chaston, *et al.*, „Examination of the antiproliferative activity of iron chelators: multiple cellular targets and the different mechanism of action of triapine compared with desferrioxamine and the potent pyridoxal isonicotinoyl hydrazone analogue 311,“ *Clin. Cancer Res.* **9**(1), 402 (2003).
- 59 C. N. Chen, *et al.*, „Association of color Doppler vascularity index and microvessel density with survival in patients with gastric cancer,“ *Ann. Surg.* **235**(4), 512 (2002).
- 60 B. B. Chomel, *et al.*, „*Bartonella* spp. in pets and effect on human health,“ *Emerg. Infect. Dis.* **12**(3), 389 (2006).
- 61 B. B. Chomel, *et al.*, „Clinical impact of persistent *Bartonella* bacteremia in humans and animals,“ *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **990**, 267 (2003).
- 62 C. Cinton, *et al.*, „Serum YKL-40 and colorectal cancer,“ *Br. J. Cancer* **79**(9-10), 1494 (1999).
- 63 C. Cinton, *et al.*, „High serum YKL-40 level after surgery for colorectal carcinoma is related to short survival,“ *Cancer* **95**(2), 267 (2002).

-
- 64 M. E. Cockman, *et al.*, „Hypoxia inducible factor-1 binding and ubiquitylation by the von Hippel-Lindau tumor suppressor protein,“ *J. Biol. Chem.* **275**(33), 25733 (2000).
- 65 B. Colona, *et al.*, „Composite IS1 elements encoding hydroxamate-mediated iron uptake in Flme plasmids from epidemic *Salmonella* spp,“ *J. Bacteriol.* **162**(1), 307 (1985).
- 66 B. Colonna, *et al.*, „Organization of aerobactin hemolysin, and antibacterial resistance genes in lactose-negative *Escherichia coli* strains of serotype O4 isolated from children with diarrhea,“ *Infect. Immun.* **60**(12), 5224 (1992).
- 67 T. G. Cooper, „Biochemische Arbeitsmethoden,“ (1981)
- 68 S. Cormier-Regard, S. V. Nguyen, and W. C. Claycomb, „Adrenomedullin gene expression is developmentally regulated and induced by hypoxia in rat ventricular cardiac myocytes,“ *J. Biol. Chem.* **273**(28), 17787 (1998).
- 69 F. Coulet, *et al.*, „Identification of hypoxia-response element in the human endothelial nitric-oxide synthase gene promoter,“ *J. Biol. Chem.* **279**(47), 46230 (2003).
- 70 T. Cramer, *et al.*, „HIF-1 α is essential for myeloid cell-mediated inflammation,“ *Cell* **112**(5), 654 (2003).
- 71 R. R. Crichton and R. J. Ward, „Iron metabolism - new perspectives in view,“ *Biochemistry* **31**(46), 1125 (1992).
- 72 P. O. Cuiv, *et al.*, „FoxB of *Pseudomonas aeruginosa* functions in the utilization of the xenosiderophores ferrichrome, ferrioxamine B, and schizokinen: evidence of redundancy at the inner membrane,“ *J. Bacteriol.* **189**(1), 284 (2007).
- 73 E. P. Cummins, *et al.*, „Prolyl hydroxylase-1 negatively regulates I κ B kinase- β , giving insight into hypoxia-induced NF κ B activity,“ *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **103**(48), 18154 (2006).
- 74 E. P. Cummins, *et al.*, „The hydroxylase inhibitor dimethylallylglycine is protective in a murine model of colitis,“ *Gastroenterology* **134**(1), 156 (2008).
- 75 S. Danese, *et al.*, „Angiogenesis as a novel component of inflammatory bowel disease pathogenesis,“ *Gastroenterology* **130** (7), 2060 (2006).

-
- 76 A. Darfeuille-Michaud, *et al.*, „High prevalence of adherent-invasive *Escherichia coli* associated with ileal mucosa in Crohn’s disease,“ *Gastroenterology* **127**(2), 412 (2004).
- 77 A. Darfeuille-Michaud, *et al.*, „Presence of adherent *Escherichia coli* strains in ileal mucosa of patients with Crohn’s disease,“ *Gastroenterology* **115**(6), 1405 (1998).
- 78 A. M. de Almeida, *et al.*, „Chromosomal *irp2* gene in *Yersinia*: distribution expression deletion and impact on virulence,“ *Microb. Pathog.* **14**(1), 9 (1993).
- 79 J. A. de Castro, „HLA-B27 and the pathogenesis of spondylarthropathies,“ *Immuno Lett.* **108**(1), 27 (2007).
- 80 V. Lorenzo de, *et al.*, „Aerobactin biosynthesis and transport genes if plasmid ColV-K30 in *Escherichia coli* K12,“ *J Bacteriol.* **165**(2), 570 (1986).
- 81 C. Dehio, „Molecular and cellular basis of *Bartonella* pathogenesis,“ *Annu. Rev. Microbiol.* **58**, 365 (2004).
- 82 J. Dequeker, R. Jamar, and M. Walravens, „HLA-B27, arthritis and *Yersinia enterocolitica* infection,“ *J. Rheumatol.* **7**(5), 706 (1980).
- 83 L. Dhaenens, F. Szczebara, and M. O. Husson, „Identification, characterization, and immunogenicity of the lactoferrin-binding protein from *Helicobacter pylori*,“ *Infect. Immun.* **65**(2), 514 (1997).
- 84 A. Donfrancesco, *et al.*, „Effects of a single course of deferoxamine in neuroblastoma patients,“ *Cancer Res.* **50**(16), 4929 (1990).
- 85 M. Drancourt, *et al.*, „New serotype of *Bartonella henselae* in endocarditis and cat-scratch disease,“ *Lancet* **347**(8999), 441 (1996).
- 86 M. Drouart, *et al.*, „High serum vascular endothelial growth factor correlates with disease activity of spondylarthropathies,“ *Clin. Exp. Immunol.* **132**(1), 158 (2003).
- 87 H. F. Dvorak, *et al.*, „Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor and the significance of microvascular hyperpermeability in angiogenesis,“ *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **237**, 97 (1999).
- 88 E. B. Edmondson and J. P. Sanford, „*Klebsiella-Enterobacter* (*Aerobacter*)-*Serratia* group. A clinical and bacteriological evaluation,“ *Medicine (Baltimore)* **46**(4), 323 (1967).

-
- 89 P. R. Edwards and F. Kauffmann, „A simplification of the Kauffmann-White schema,“ *Am. J. Clin. Pathol.* **22**(7), 692 (1952).
- 90 A. C. Epstein, *et al.*, „*C. elegans* EGL-9 and mammalian homologs define a family of dioxygenases that regulate HIF by prolyl hydroxylation,“ *Cell* **107**(1), 42 (2001).
- 91 B. Escudier, *et al.*, „Sorafenib in advanced clear-cell renal-cell carcinoma,“ *N. Engl. J. Med.* **356**(2), 125 (2007).
- 92 Z. Estrov, *et al.*, „In vitro and in vivo effects of deferoxamine in neonatal acute leukemia,“ *Blood* **69**(3), 757 (1987).
- 93 A. Fasano, *et al.*, „Enterotoxine and cytotoxin production by enteroinvasive *Escherichia coli*,“ *Infect. Immun.* **58**(11), 3717 (1990).
- 94 D. Feldser, *et al.*, „Reciprocal positive regulation of the hypoxia-inducible factor 1alpha and insulin-like growth factor 2,“ *Cancer Res.* **59**(16), 3915 (1999).
- 95 N. Ferrara, „Vascular endothelial growth factor: molecular and biological aspects,“ *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **237**, 1 (1999).
- 96 N. Ferrara and T. vis-Smyth, „The biology of vascular endothelial growth factor,“ *Endocr. Rev* **18**(1), 4 (1997).
- 97 J. A. Forsythe, *et al.*, „Activation of vascular endothelial growth factor gene transcription by hypoxia-inducible factor 1“ *Mol. Cell Biol.* **16**(9), 4604 (1996).
- 98 S. Frede, *et al.*, „The proinflammatory cytokine interleukin 1beta and hypoxia cooperatively induce the expression of adrenomedullin in ovarian carcinoma cells through hypoxia inducible factor 1 activation,“ *Cancer Res.* **65**(11), 4690 (2005).
- 99 S. Frede, *et al.*, „Bacterial lipopolysaccharide induce HIF-1 activation in human monocytes via p44/42 MAPK and NF-kappa B,“ *Biochem. J* **396**(3), 517 (2006).
- 100 R. Fukuda, B. Kelly, and G. L. Semenza, „Vascular endothelial growth factor gene expression in colon cancer cells exposed to prostaglandin E2 is mediated by hypoxia-inducible factor 1,“ *Cancer Res.* **63**(9), 2330 (2003).
- 101 A. M. Ganzoni and M. Puschmann, „Iron deficiency in infection,“ *Haematol. Blood Transfus.* **21**, 95 (1978).

-
- 102 M. Garayoa, *et al.*, „Hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) up-regulates adrenomedullin expression in human tumor cell lines during oxygen deprivation: a possible promotion mechanism of carcinogenesis,“ *Mol. Endocrinol.* **14**(6), 848 (2000).
- 103 H. C. Gerard, *et al.*, „Synovial *Chlamydia trachomatis* in patients with reactive arthritis/Reiter’s syndrome are viable but show aberrant gene expression,“ *J Rheumatol.* **25**(4), 734 (1998).
- 104 F. Gibson and D. I. Magrath, „The isolation and characterization of a hydroxamic acid (aerobactin) formed by *Aerobacter aerogenes* 62-I,“ *Biochem. Biophys. Acta* **192**(2), 175 (1969).
- 105 J. L. Gifford, H. N. Hunter, and H. J. Vogel, „Lactoferricin: a lactoferrin-derived peptide with antimicrobial, antiviral, antitumor, and immunological properties,“ *Cell Mol. Life Sci.* **62**(22), 2588 (2005).
- 106 S. E. Gardin, *et al.*, „Nod2 is a general sensor of peptidoglycan through muramyl dipeptide (MDP) detection,“ *J. Biol. Chem.* **278**(11), 8869 (2003).
- 107 J. M. Gleadle and P. J. Ratcliffe, „Induction of hypoxia-inducible factor-1, erythropoetin, vacular endothelial growth factor, and glucose transporter-1 by hypoxia: evidence against a regulatory role for Scr-kinase,“ *Blood* **89**(2), 503 (1997).
- 108 U. Gophna, *et al.*, „Yersinia HPI in septicemic *Escherchia coli* strains isolated from diverse hosts,“ *FEMS Microbiol. Lett.* **196**(1), 57 (2001).
- 109 K. Granfors, *et al.*, „*Salmonella* lipopolysacchardide in synovial cells from patients with reactive arthritis,“ *Lancet* **335**(8691), 685 (1990).
- 110 K. Granfors, *et al.*, „*Yersinia* antigens in synovial-fluid cells from patients with reactive arthritis,“ *N. Engl. J. Med.* **320**(4), 216 (1989).
- 111 T. Griga, *et al.*, „Increased serum levels of vascular endothelial growth factor in patients with inflammatory bowel disease,“ *Scand. J. Gastroenterol.* **33**(5), 504 (1998).
- 112 T. Griga, *et al.*, „Increased production of vascular endothelial growth factor by intestinal mucosa of patients with inflammatory bowel disease,“ *Hepatogastroenterology* **46**(26), 920 (1999).
- 113 R. Gross, F. Engelbrecht, and V. Braun, „Identification of the genes and their polypeptide responsible for aerobactin synthesis by pColV plasmids,“ *Mol. Gen. Genet.* **201**(2), 204 (1985).

-
- 114 H. M. Grunig, *et al.*, „The chromosomal fur gene regulates the extracellular haemolytic activity encoded by certain hly plasmids,“ *Zentralbl. Bakteriol. Mikrobiol. Hyg. (A)* **266** (1-2), 231 (1987).
- 115 M. L. Guerinot, „Microbial iron transport,“ *Annu. Rev. Microbiol.* **48**, 743 (1994).
- 116 G. Y. Gwak, *et al.*, „Hypoxia stimulates proliferation of the human hepatoma cells through the induction of hexokinase II expression,“ *J. Hepatol.* **42**(3), 358 (2005).
- 117 H. Haag, *et al.*, „Purification of yersiniabactin: a siderophore and possible virulence factor of *Yersinia enterocolitica*,“ *J. Gen. Microbiol.* **139**(9), 2159 (1993).
- 118 J. Hampe, *et al.*, „Association of NOD2 (CARD15) genotype with clinical course of Crohn’s disease: a cohort study,“ *Lancet* **359**(9318), 1661 (2002).
- 119 H. W. Hann, *et al.*, „Antitumor effect of deferoxamine on human hepatocellular carcinoma growing in athymic nude mice,“ *Cancer* **70**(8), 2051 (1992).
- 120 T. Hannu, *et al.*, „Reactive arthritis attributable to *Shigella* infection: a clinical and epidemiological nationwide study,“ *Ann. Rheum. Dis.* **64**(4), 594 (2005).
- 121 T. Hannu, M. Puolakkainen, and M. Leirisalo-Repo, „*Chlamydia pneumoniae* as a triggering infection in reactive arthritis,“ *Rheumatology (Oxford)* **38**(5), 411 (1999).
- 122 M. Hannuksela and P. Ahvonen, „Erythema nodosum due to *Yersinia enterocolitica*,“ *Scand. J. Infect. Dis.* **1**(1), 17 (1969).
- 123 K. Hantke, *et al.*, „Salmochelins, siderophores of *Salmonella enterica* and uropathogenic *Escherichia coli* strains, are recognized by the outer membrane receptor IroN,“ *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **100**(7), 3677 (2003).
- 124 H. Hartmann, 2006
- 125 J. Heesemann, *et al.*, „Virulence of *Yersinia enterocolitica* is closely associated with siderophore production, expression of an iron-repressible outer membrane polypeptide of 65,000 Da and pesticin sensitivity,“ *Mol. Microbiol.* **8**(2), 397 (1993).

-
- 126 J. Heesemann and R. Laufs, „Construction of a mobilizable *Yersinia enterocolitica* virulence plasmid,“ *J. Bacteriol.* **155**(2), 761 (1983).
- 127 T. Hellwig-Brugel, *et al.*, „Interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha stimulate DNA binding of hypoxia-inducible factor-1,“ *Blood* **94**(5), 1561 (1999).
- 128 R. Higuchi, *et al.*, „Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions,“ *Biotechnology (N. Y.)* **11**(9), 1026 (1993).
- 129 T. Hisamatsu, M. Suzuki, and D. K. Podolsky, „ Interferon-gamma augments CARD4/NOD1 gene and protein expression through interferon regulatory factor-1 in intestinal epithelial cells,“ *J. Biol. Chem.* **278**(35), 32962 (2003).
- 130 A. P. Hollander, *et al.*, „Expression of hypoxia-inducible factor 1alpha by macrophages in the rheumatoid synovium: implications for targeting of therapeutic genes to the inflamed joint,“ *Arthritis Rheum.* **44**(7), 1540 (2001).
- 131 J. Huang, *et al.*, „IOP1, a novel hydrogenase-like protein that modulates hypoxia-inducible factor-1alpha activity,“ *Biochem. J.* **401**(1), 341 (2007).
- 132 J. Huang, *et al.*, „Sequence determinates in hypoxia-inducible factor-1alpha for hydroxylation by the prolyl hydroxylases PHD1, PHD2, and PHD3,“ *J. Biol. Chem.* **277**(42), 39792 (2002).
- 133 J. P. Hugot, *et al.*, „Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn’s disease,“ **411**(6837), 599 (2001).
- 134 H. Hurwitz, *et al.*, „Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer,“ *N. Engl. J. Med.* **350**(23), 2335 (2004).
- 135 N. Inohara and G. Nunez, „The NOD: a signaling module that regulates apoptosis and host defense against pathogens,“ *Oncogene* **20**(44), 6473 (2001).
- 136 N. Inohara and G. Nunez, „NODs: intracellular proteins involved in inflammation and apoptosis,“ *Nat. Rev. Immunol.* **3**(5), 371 (2003).
- 137 N. Inohara, *et al.*, „Human Nod1 confers responsiveness to bacterial lipopolysaccharide,“ *J. Biol. Chem.* **276**(4), 2551 (2001).

-
- 138 J. S. Isaacs, *et al.*, „Hsp90 regulates a von Hippel-Lindau-independent hypoxia-inducible factor-1 alpha-degradative pathway,“ *J Biol. Chem.* **277**(33 29936 (2002).
- 139 J. S. Isaacs, Y. J. Jung, and L. Neckers, „Aryl hydrocarbon nuclear translocator (ARNT) promotes oxygen-independent stabilization of hypoxia-inducible factor-1alpha by modulating an Hsp90-dependant regulator pathway,“ *J. Biol. Chem.* **279** (16), 16128 (2004).
- 140 H. Itaya, *et al.*, „Expression of vascular endothelial growth factor in human monocyte/macrophages stimulated with lipopolysaccharide,“ *Thromb. Haemost.* **85**(1), 171 (2001).
- 141 M. Ivan, *et al.*, „Biochemical purification and pharmacological inhibition of a mammalian prolyl hydroxylase acting on hypoxia-inducible factor,“ *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. A* **99**(21), 13459 (2002).
- 142 M. Ivan, *et al.*, „HIFalpha targeted for VHL-mediated destruction by proline hydroxylation: implications for O₂ sensing,“ *Science* **292**(5516), 464 (2001).
- 143 P. Jaakkola, *et al.*, „Targeting of HIF-alpha to the von Hippel-Lindau ubiquitylation complex by O₂-regulated prolyl hydroxylation,“ *Science* **292**(5516), 468 (2001).
- 144 V. Jacomo, P. J. Kelly, and D. Raoult, „Natural history of *Bartonella* infections (an exception to Koch's postulate),“ *Clin. Diagn. Lab Immunol.* **9**(1), 8 (2001).
- 145 B. H. Jiang, *et al.*, „Hypoxia-inducible factor 1 levels vary exponentially over a physiologically relevant range of O₂ tension,“ *Am. J. Physiol.* **271**(4 Pt1), C1172-C1180 (1996).
- 146 B. Jin, *et al.*, „Iron acquisition systems for ferric hydroxamates, haemin and haemoglobin in *Listeria monocytogenes*,“ *Mol. Microbiol.* **59**(4), 1185 (2006).
- 147 J. S. Johanson, *et al.*, „YKL-40 in giant cells and macrophages from patients with giant cell arthritis,“ *Arthritis Rheum.* **42**(12), 2624 (1999).
- 148 J. S. Johanson, *et al.*, „Serum YKL-40 concentrations in patients with rheumatoid arthritis: relation to disease activity,“ *Rheumatology (Oxford)* **38**(7), 618 (1999).
- 149 T. J. Johanson, *et al.*, „DNA sequence of a COIV plasmid and prevalence of selected plasmid-encoded virulence genes among avian *Escherchia coli* strains,“ *J. Bacteriol.* **188**(2), 75 (2006).

-
- 150 F. Kabbinavar, *et al.*, „Phase II, randomized trial comparing bevacizumab plus fluorouracil (FU)/leucovorin (LV) with FU/LV alone in patients with metastatic colorectal cancer,“ *J. Clin. Oncol.* **21**(1), 60 (2003).
- 151 S. Kajimura, K. Aida, and C. Duan, „Understanding hypoxia-induced gene expression in early development: in vitro and in vivo analysis of hypoxia-inducible factor 1-regulated zebra fish insulin-like growth factor binding protein 1 gene expression,“ *Mol. Cell Biol.* **26**(3), 1142 (2006).
- 152 F. Kallinowski, *et al.*, „Prevalance of enteropathogenic bacteria in surgically treated chronic inflammatory bowel disease,“ *Hepatogastroenterology* **45**(23), 1552 (1998).
- 153 P. J. Kallio, *et al.*, „Regulation of the hypoxia-inducible transcription factor 1alpha by the ubiquitin-proteasome pathway,“ *J. Biol. Chem.* **274**(10), 6519 (1999).
- 154 D. Kampik, R. Schulte, and I. B. Autenrieth, „*Yersinia enterocolitica* invasin protein triggers differential production of interleukin-1, interleukin-8, monocyte chemoattractant protein 1, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, and tumor necrosis factor alpha in epithelial cells: implications for understanding the early cytokine network in *Yersinia* infections,“ *Infect. Immun.* **68**(5), 2484 (2000).
- 155 T. Kamura, *et al.*, „Activation of HIF1alpha ubiquitination by a reconstituted von Hippel-Lindau (vHL) tumor suppressor complex,“ *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **97**(19), 10430 (2000).
- 156 H. Kano, *et al.*, „Adrenomedullin as a novel antiproliferative factor of vascular smooth muscle cells,“ *J. Hypertens.* **14**(2), 209 (1996).
- 157 H. Kato, *et al.*, „Adrenomedullin as an autocrine/paracrine apoptosis survival factor for rat endothelial cells,“ *Endocrinology* **138**(6), 2615 (1997).
- 158 D. M. Katschinski, *et al.*, „Heat induction of the unphosphorylated form of hypoxia-inducible factor-1alpha is dependant on heat shock protein-90 activity,“ *J. Biol. Chem.* **277**(11), 9262 (2002).
- 159 H. Keberle, „The biochemistry of desferrioxamine and its relation to iron metabolism,“ *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **119**, 758 (1964).
- 160 B. D. Kelly, *et al.*, „Cell type-specific regulation of angiogenic growth factor gene expression and induction of angiogenesis in

- nonischemic tissue by a constitutively active form of hypoxia-inducible factor 1," *Circ. Res.* **93**(11), 1074 (2003).
- 161 V. A. Kempf, *et al.*, „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 (2005).
- 162 V. A. Kempf, *et al.*, „Evidence of a leading role for VEGF in *Bartonella henselae*-induced endothelial cell proliferations," *Cell Microbiol* **3**(9), 623 (2001).
- 163 M. A. Khan, „Update on spondyloarthropathies," *Ann. Intern. Med.* **136**(12), 896 (2002).
- 164 M. M. Kilani, *et al.*, „RSV causes HIF-1alpha stabilization via NO release in primary bronchial epithelial cells," *Inflammation* **28**(5), 245 (2004).
- 165 R. A. Kingsley, *et al.*, „Ferrioxamine-mediated Iron (III) utilization by *Salmonella enterica*," *Appl. Environ. Microbiol.* **65**(4), 1610 (1999).
- 166 K. Kitamura, *et al.*, „Adrenomedullin: a novel hypotensive peptide isolated from human pheochromocytome," *Biochem. Biophys. Res. Commun* **192**(2), 553 (1993).
- 167 H. J. Knowles, *et al.*, „Effect of ascorbate on the activity of hypoxia-inducible factor in cancer cells," *Cancer Res.* **63**(8), 1764 (2003).
- 168 K. S. Kobayashi, *et al.*, „Nod2-dependant regulation of innate and adaptive immunity in the intestinal tract," *Science* **307**(5710), 731 (2005).
- 169 J. E. Koehler, „*Bartonella*-associated infections in HIV-infected patients," *AIDS Clin. Care* **7**(12), 97 (1995).
- 170 J. E. Koehler, „*Bartonella* infections," *Adv. Pediatr. Infect. Dis.* **11**, 1 (1996).
- 171 H. Kojima, *et al.*, „Abnormal B Lymphocyte development and autoimmunity in hypoxia-inducible factor 1alpha-deficient chimeric mice," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **99**(4), 2170 (2002).
- 172 H. J. Koornhof, R. A. Smego, Jr., and M. Nicol, „Yersiniosis. II: The pathogenesis of *Yersinia* infections," *Eur. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **18**(2), 87 (1999).
- 173 T. U. Kosunen, *et al.*, „Reactive arthritis after *Campylobacter jejuni* enteritis in patients with HLA-B27," *Lancet* **1**(8181), 1312 (1980).

-
- 174 L. E. Kotch, *et al.*, „Defective vascularisation of HIF-1alpha-null embryos is not associated with VEGF deficiency but with mesenchymal cell death,“ *Dev. Biol.* **209**(2), 254 (1999).
- 175 J. Koury, *et al.*, „Persistent HIF-1alpha activation in gut ischemia/reperfusion injury: potential role of bacteria and lipopolysaccharide,“ *Shock* **22**(3), 270 (2004).
- 176 E. Kukk, *et al.*, „VEGF-C receptor binding and pattern of expression with VEGFR-3 suggests a role in lymphatic vascular development,“ *Development* **122**(12), 3829 (1996).
- 177 C. A. Kunkle and M. P. Schmitt, „Analysis of the *Corynebacterium diphtheriae* Dtx regulon: identification of a putative siderophore synthesis and transport system that is similar to the *Yersinia* high-pathogenicity island-encoded yersiniabactin synthesis and uptake system,“ *J. Bacteriol.* **185**(23), 6826 (2003).
- 178 U. K. Laemmli, „Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4,“ *Nature* **227**(5259), 680 (1970).
- 179 J. P. Lafont, *et al.*, „Presence and expression of aerobactin genes in virulent avian strains of *Escherichia coli*,“ *Infect. Immun.* **55**(1), 193 (1987).
- 180 S. Lala, *et al.*, „Crohn’s disease and the NOD2 gene: a role for paneth cells,“ *Gastroenterology* **125**(1), 47 (2003).
- 181 L. W. Lamps, *et al.*, „Pathogenic *Yersinia* DNA is detected in bowel and mesenteric lymph nodes from patients with Crohn’s disease,“ *Am. J. Surg. Pathol.* **27**(2), 220 (2003).
- 182 D. Lando, *et al.*, „FIH-1 is an asparaginyl hydroxylase enzyme that regulates the transcriptional activity of hypoxia-inducible factor,“ *Genes Dev.* **16**(12), 1466 (2002).
- 183 K. M. Lawlor and S. M. Payne, „Aerobactin genes in *Shigella* spp.,“ *J. Bacteriol.* **160**(1), 266 (1984).
- 184 M. S. Lawlor, C. O’Connor, and V. L. Miller, „Yersiniabactin is a virulence factor for *Klebsiella pneumoniae* during pulmonary infection,“ *Infect. Immun.* **75**(3), 1463 (2007).
- 185 P. J. Lee, *et al.*, „Hypoxia-inducible factor-1 mediates transcriptional activation of the heme oxygenase-1 gene in response to hypoxia,“ *J. Biol. Chem.* **272**(9), 5375 (1997).

-
- 186 S. Y. Lee, *et al.*, „Expression of vascular endothelial growth factor and hypoxia-inducible factor in the airway of asthmatic patients,“ *Ann. Allergy Asthma Immunol.* **97**(6), 794 (2006).
- 187 M. S. Leffell and J. K. Spitznagel, „Fate of human lactoferrin and myeloperoxidase in phagocytizing human neutrophils: effects of immunoglobulin G subclasses and immune complexes coated on latex beads,“ *Infect. Immun.* **12**(4), 813 (1975).
- 188 S. Lesage, *et al.*, „CARD15/NOD2 mutational analysis and genotype-phenotype correlation in 612 patients with inflammatory bowels disease,“ *Am. J. Hum. Genet.* **70**(4), 845 (2002).
- 189 D. W. Leung, *et al.*, „Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen,“ *Science* **246**(4935), 1306 (1989).
- 190 P. F. Levay and M. Viljoen, „Lactoferrin: a general view,“ *Haematologica* **80**(3), 252 (1995).
- 191 J. Levine, P. J. Honig, and T. Boyle, „*Salmonella* reactive arthritis: clues to diagnosis,“ *J. Pediatr.* **94**(4), 596 (1979).
- 192 H. Ling and A. D. Recklies, „The chitinase 3-like protein human cartilage glycoprotein 39 inhibits cellular responses to the inflammatory cytokines interleukin-1 and tumour necrosis factor-alpha,“ *Biochem. J.* **380**(Pt3), 651 (2004).
- 193 J. M. Ling and A. B. Schryvers, „Perspectives on interactions between lactoferrin and bacteria,“ *Biochem. Cell Biol.* **84**(3), 27 (2006).
- 194 D. Linke, *et al.*, „Trimeric autotransporter adhesins: variable structure, common function,“ *Trends Microbiol.* **14**(6), 264 (2006).
- 195 K. J. Livak, *et al.*, „Oligonucleotides with fluorescent dyes at opposite ends provide a quenched probe system useful for detecting PCR product and nucleic acid hybridization,“ *PCR Methods Appl.* **4**(6), 357 (1995).
- 196 P. C. Mahon, K. Hirota, and G. L. Semenza, „FIH-1: a novel protein that interacts with HIF-1alpha and VHL to mediate repression of HIF-1 transcriptional activity,“ *Genes Dev.* **15**(20), 2675 (2001).
- 197 O. Maki-Ikola and K. Gransfors, „*Salmonella*-triggered reactive arthritis,“ *Lancet* **339**(8801), 1096 (1992).
- 198 B. J. Marshall and J. R. Warren, „Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration,“ *Lancet* **1**(8390), 1311 (1984).

-
- 199 N. Masson and P. J. Ratcliffe, „HIF prolyl and asparaginyl hydroxylases in the biological response to intracellular O₂ levels,“ *J. Cell Sci* **116**(Pt15), 3041 (2003).
- 200 P. L. Masson and J. F. Heremans, „Lactoferrin in milk from different species,“ *Comp Biochem. Physiol B* **39**(1), 119 (1971).
- 201 S. P. Mathupala, A. Rempel, and P. L. Pedersen, „Glucose catabolism in cancer cells: identification and characterization of a marked activation response of the type II hexokinase gene to hypoxic conditions,“ *J. Biol. Chem.* **276**(46), 43407 (2001).
- 202 M. Maurin, R. Birtles, and D. Raoult, „Current knowledge of *Bartonella* species,“ *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **16**(7), 487 (1997).
- 203 P. H. Maxwell, C. W. Pugh, and P. J. Ratcliffe, „Activation of the HIF pathway in cancer,“ *Curr Opin. Genet. Dev.* **11**(3), 293 (2001).
- 204 P. H. Maxwell, *et al.*, „The tumor suppressor protein VHL targets hypoxia-inducible factors for oxygen-dependant proteolysis,“ **399**(6733), 271 (1999).
- 205 L. A. Mc Neill, *et al.*, „Hypoxia-inducible factor asparaginyl hydroxylase (FIH-1) catalyses hydroxylation at the beta-carbon of asparagine-803,“ *Biochem. J.* **367**(Pt3), 571 (2002).
- 206 K. I. Mecklenburgh, *et al.*, „Involvement of a ferroprotein sensor in hypoxia-mediated inhibition of neutrophil apoptosis,“ *Blood* **100**(8), 3008 (2002).
- 207 M. H. Metz-Boutigue, *et al.*, „Human lactotransferrin: amino acid sequence and structural comparison with other transferrins,“ *Eur. J. Biochem.* **145**(3), 659 (1984).
- 208 E. Metzen, *et al.*, „Intracellular localisation of human HIF-1 alpha hydroxylases: implications for oxygen sensing,“ *J. Cell Sci.* **116**(Pt7), 1319 (2003).
- 209 T. A. Mietzner and S. A. Morse, „The role of iron-binding proteins in the survival of pathogenic bacteria,“ *Ann. Rev. Nutr.* **14**, 471 (1994).
- 210 E. Minet, *et al.*, „Hypoxia-induced activation of HIF-1: role of HIF-1alpha-Hsp90 interaction,“ *FEBS Lett.* **460**(2), 251 (1999).
- 211 E. Mizoguchi, „Chitinase 3-like-1 exacerbates intestinal inflammation by enhancing bacterial adhesion and invasion in colonic epithelial cells,“ *Gastroenterology* **130**(2), 398 (2006).

-
- 212 J. Mokracka, R. Koczura, and A. Kaznowski, „Yersiniabactin and other siderophores produced by clinical isolates of *Enterobacter* spp. and *Citrobacter* spp,“ FEMS Immunol. Med. Microbiol. **40**(1), 51 (2004).
- 213 J. Z. Montgomerie, *et al.*, „Association of hydroxamate siderophore (aerobactin) with *Escherichia coli* isolated from patients with bacteremia,“ Infect. Immun. **46**(3), 835 (1984).
- 214 J. E. Moss, *et al.*, „The selC-associated SHI-2 pathogenicity island of *Shigella flexneri*,“ Mol. Microbiol. **33**(1), 74 (1999).
- 215 R. J. Motzer, *et al.*, „Sunitinib versus interferon alfa in metastatic renal-cell carcinoma,“ N. Engl. J. Med. **356**(2), 115 (2007).
- 216 M. Moulin-Schouleur, *et al.*, „Common virulence factors and genetic relationships between O18:K1:H7 *Escherichia coli* isolates of human and avian origin,“ J. Clin. Microbiol. **44**(1), 3484 (2006).
- 217 T. Murohara, *et al.*, „Vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor enhances vascular permeability via nitric oxide and prostacyclin,“ Circulation **97**(1), 99 (1998).
- 218 X. Nassif and P. J. Sansonetti, „Correlation of the virulence of *Klebsiella pneumoniae* K1 and K2 with the presence of a plasmid encoding aerobactin,“ Infect. Immun. **54**(3), 603 (1986).
- 219 J. B. Neilands, „Iron absorption and transport in microorganisms,“ Annu. Rev. Nutr. **1**, 27 (1981).
- 220 J. B. Neilands, „Siderophores: structure and function of microbial iron transport compounds,“ J. Biol. Chem. **270**(45), 26723 (1995).
- 221 M. Nelson and P. J. Szaniszlo, „TonB-independent ferrioxamine B-mediated iron transport in *Escherichia coli* K12,“ FEMS Microbiol. Lett. **79**(1-3), 191 (1992).
- 222 G. Neufeld, *et al.*, „Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors,“ FASEB J. **13**(1), 9 (1999).
- 223 T. Niki, *et al.*, „Expression of vascular endothelial growth factors A, B, C, and D and their relationship to lymph node status in lung adenocarcinoma,“ Clin. Cancer Res. **6**(6), 2431 (2000).
- 224 T. V. O’Halloran, „Transition metals in control of gene expression,“ Science **261**(5122), 715 (1993).

-
- 225 M. K. Oehler, *et al.*, „Adrenomedulin promotes formation of xenografted endometrial tumors by stimulation of autocrine growth and angiogenesis,“ *Oncogene* **21**(18), 2815 (2002).
- 226 F. Oehme, *et al.*, „Overexpression of PH-4, a novel putative proline 4-hydroxylase, modulates activity of hypoxia-inducible transcription factors,“ *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **296**(2), 343 (2002).
- 227 M. Ohh, *et al.*, „Ubiquitination of hypoxia-inducible factor requires direct binding to the beta-domain of the von Hippel-Lindau protein,“ *Nat. Cell Biol.* **2**(7), 423 (2000).
- 228 J. M. Paredes, *et al.*, „Joint disease in inflammatory bowel disease,“ *Gastroenterol. Hepatol.* **28**(4), 240 (2005).
- 229 C. Pelludat, M. Hogardt, and J. Heesemann, „Transfer of the core region genes of the *Yersinia enterocolitica* WA-C serotype O:8 high-pathogenicity island to *Y. enterocolitica* MRS40, a strain with low levels of pathogenicity, confers a yersiniabactin biosynthesis phenotype and enhanced mouse virulence,“ *Infect. Immun.* **70**(4), 1832 (2002).
- 230 C. Pelludat, *et al.*, „The yersiniabactin biosynthetic gene cluster of *Yersinia enterocolitica*: organization and siderophore-dependant regulation,“ *J. Bacteriol.* **180**(3), 539 (1998).
- 231 C. Peyssonnaud, *et al.*, „Cutting edge: Essential role of hypoxia inducible factor-1alpha in development of lipopolysaccharide-induced sepsis,“ *J Immunol.* **179**(12), 7516 (2007).
- 232 C. Peyssonnaud, *et al.*, „HIF-1alpha expression regulates the bactericidal capacity of phagocytes,“ *J. Clin. Invest* **115**(7), 1806 (2005).
- 233 H. Pilegaard, *et al.*, „Influence of pre-exercise muscle glycogen content on exercise-induced transcriptional regulation of metabolic genes,“ *J. Physiol.* **541**(Pt1), 261 (2002).
- 234 D. K. Podolsky, „Inflammatory bowel disease,“ *N. Engl. J. Med.* **347**(6), 417 (2002).
- 235 M. Y. Popoff, J. Bockemuhl, and L. L. Gheesling, „Supplement 2002 (no. 46) to the Kauffmann-White scheme,“ *Res. Microbiol.* **155**(7), 568 (2004).
- 236 U. Protzer, *et al.*, „Enteropathic spondylarthritis in chronic inflammatory bowel disease: prevalence, manifestation pattern and HLA association,“ *Med. Klin. (Munich)* **91**(6), 330 (1996).

-
- 237 C. W. Pugh and P. J. Ratcliffe, „Regulation of angiogenesis by hypoxia: role of the HIF system,“ *Nat. Med* **9**(6), 677 (2003).
- 238 G. E. Purdy and S. M. Payne, „The SHI-3 iron transport island of *Shigella boydii* 0-1392 carries the genes for aerobactin synthesis and transport,“ *J Bacteriol.* **183**(14), 4176 (2001).
- 239 A. R. Rabson, A. F. Hallett, and H. J. Koornhof, „Generalized *Yersinia enterocolitica* infection,“ *J. Infect. Dis.* **131**(4), 441 (1975).
- 240 G. Radford-Smith and N. Pandeya, „Association between NOD2/CARD15 genotype and phenotype in Crohn’s disease – Are we there yet?,“ *World J. Gastroenterol.* **12**(44), 7097 (2006).
- 241 S. Ragno, *et al.*, „Changes in gene expression in macrophages infected with *Mycobacterium tuberculosis*: a combined transcriptomic and proteomic approach,“ *Immunology* **104**(1), 99 (2001).
- 242 A. Rakin, *et al.*, „The pesticin receptor of *Yersinia enterocolitica*: a novel virulence factor with dual function,“ *Mol. Microbiol* **13**(2), 253 (1994).
- 243 A. Rapisarda, *et al.*, „Identification a small molecule inhibitors of hypoxia-inducible factor 1 transscriptional activation oathway,“ *Cancer Res.* **61**(15), 4316 (2002).
- 244 K. Redhead, T. Hill, and H. Chart, „Interaction of lactoferrin and transferrin with the outer membrane of *Bordetella pertussis*,“ *J. Gen. Microbiol.* **133**(4), 891 (1987).
- 245 D. A. Relman, *et al.*, „The organism causing bacillary angiomatosis, peliosis hepatis, and fever and bacteremia in immunocompromised patients,“ *N. Engl. J. Med.* **324**(21), 1514 (1991).
- 246 D. Richardson, P. Ponka, and E. Baker, „The effect of the iron (III) chelator, desferrioxamine, on iron and transferrin uptake by the human malignant melanoma cell,“ *Cancer Res.* **54**(3), 685 (1994).
- 247 S. R. Riddle, *et al.*, „Hypoxia induces hexokinase II gene expression in human lung cell line A549,“ *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol* **278**(2), L407-L416 (2000).
- 248 T. Riess, *et al.*, „*Bartonella* adhesin A mediates a proangiogenic host cell response,“ *J Exp. Med* **200**(10), 1267 (2004).
- 249 S. Rodriguez-Martinez, *et al.*, „Lipopolysaacharide from *Escherichia coli* induces the expression of vascular endothelial growth

- factor via toll-like receptor 4 in human limbal fibroblasts," *Exp. Eye Res.* **83**(6), 1373 (2006).
- 250 J. M. Rolain, *et al.*, „Recommendations for treatment of human infections caused by *Bartonella* species," *Antimicrob. Agents Chemother.* **48**(6), 1921 (2004).
- 251 J. M. Rolain, *et al.*, „Immunofluorescent detection of intraerythrocytic *Bartonella henselae* in naturally infected cats," *J. Clin. Microbiol.* **39**(8), 2978 (2001).
- 252 A. Rolfs, *et al.*, „Oxygen-regulated transferrin expression is mediated by hypoxia-inducible factor-1," *J. Biol. Chem.* **272**(32), 20055 (1997).
- 253 P. Rosenstiel, *et al.*, „Regulation of DMBT1 via NOD2 and TLR4 in intestinal epithelial cells modulates bacterial recognition and invasion," *J. Immunol.* **178**(12), 8203 (2007).
- 254 J. Rupp, *et al.*, „*Chlamydia pneumoniae* directly interferes with HIF-1alpha stabilization in human host cells," *Cell Microbiol.* **9**(9), 2181 (2007).
- 255 P. Rutgeerts, *et al.*, „Effect of faecal stream diversion on recurrence of Crohn's disease in the neoterminal ileum," *Lancet* **338**(8770), 771 (1991).
- 256 H. E. Ryan, *et al.*, „Hypoxia-inducible factor-1alpha is a positive factor in solid tumor growth," *Cancer Res.* **60**(15), 4010 (2000).
- 257 A. Seabo, *et al.*, „Inflammatory bowel disease associated with *Yersinia enterocolitica* O:3 infection," *Eur. J. Intern. Med.* **16**(3), 176 (2005).
- 258 S. Saito, *et al.*, „Expression of platelet-derived endothelial cell growth factor in inflammatory bowel disease," *J. Gastroenterol.* **38**(3), 229 (2003).
- 259 S. Salceda and J. Caro, „Hypoxia-inducible factor 1alpha (HIF-1alpha) protein is rapidly degraded by the ubiquitin-proteasome system under normoxic conditions. Its stabilization by hypoxia depends on redox-induced changes," *J. Biol. Chem.* **272**(36), 22642 (1997).
- 260 N. Sang, *et al.*, „Carboxyl-terminal transactivation activity of hypoxia-inducible factor 1 alpha is governed by a von Hippel-Lindau protein-independent, hydroxylation-regulated association with p300/CBP," *Mol. Cell Biol.* **22**(9), 2984 (2002).

-
- 261 M. Sauer, K. Hantke, and V. Braun, „Sequence of the *fhuE* outer-membrane receptor gene of *Escherichia coli* K12 and properties of mutants,“ *Mol. Microbiol.* **4**(3), 427 (1990).
- 262 N. Sauvonnnet, *et al.*, „Regulation of mRNA expression in macrophages after *Yersinia enterocolitica* infection. Role of different Yop effectors,“ *J. Biol. Chem.* **277**(28), 25133 (2002).
- 263 M. Scharte, *et al.*, „LPS increases hepatic HIF-1alpha protein and expression of the HIF-1-dependant gene aldolase A in rats,“ *J. Surg. Res.* **135**(2), 262 (2006).
- 264 A. B. Schryvers and B. C. Lee, „Comparative analysis of the transferrin and lactoferrin binding protein in the family *Neisseriaceae*,“ *Can. J. Microbiol.* **35**(3), 409 (1989).
- 265 S. Schubert, *et al.*, „High-pathogenicity island of *Yersinia pestis* in *Enterobacteriaceae* isolated from blood cultures and urine samples: prevalence and functional expression,“ *J. Infect. Dis.* **182**(4), 1268 (2000).
- 266 S. Schubert, D. Fischer, and J. Heesemann, „Ferric enterochelin transport in *Yersinia enterocolitica*: molecular and evolutionary aspects,“ *J. Bacteriol.* **181**(20), 6387 (1999).
- 267 S. Schubert, *et al.*, „Yersinia high-pathogenicity island contributes to virulence in *Escherichia coli* causing extraintestinal infections,“ *Infect. Immun.* **70**(9), 5335 (2002).
- 268 R. Schulte, *et al.*, „*Yersinia enterocolitica* invasin protein triggers IL-8 production in epithelial cells via activation of Rel p65-p65 homodimers,“ *FASEB J* **14**(11), 1471 (2000).
- 269 M. T. Sebulsy, *et al.*, „Identification and characterization of a membrane permease involved in iron-hydroxamate transport in *Staphylococcus aureus*,“ *J. Bacteriol.* **182**(16), 4394 (2000).
- 270 G. L. Semenza, „Hypoxia-inducible factor-1: master regulator of O₂ hemostasis,“ *Curr. Opin. Genet. Dev.* **8**(5), 588 (1998).
- 271 G. L. Semenza, „HIF-1 and human disease: one highly involved factor,“ *Genes. Dev.* **14**(16), 1983 (2000).
- 272 G. L. Semenza, „HIF-1, O(2), and the 3 PHDs: how animal cells signal hypoxia to the nucleus,“ *Cell* **107**(1), 1 (2001).
- 273 G. L. Semenza, „Hypoxia-inducible factor 1: control of oxygen homeostasis in health and disease,“ *Pediatr. Res.* **49**(5), 614 (2001).

-
- 274 G. L. Semenza, „Hypoxia-inducible factor-1: oxygen homeostasis and disease pathophysiology,“ *Trends Mol. Med.* **7**(8), 345 (2001).
- 275 G. J. Semenza, *et al.*, „Transcriptional regulation of genes encoding glycolytic enzymes by hypoxia-inducible factor 1,“ *J. Biol. Chem.* **269**(38), 23757 (1994).
- 276 D. R. Senger, *et al.*, „A highly conserved vascular permeability factor secreted by a variety of human and rodent tumor cell lines,“ *Cancer Res.* **46**(11), 5629 (1986).
- 277 R. Shimazu, *et al.*, „MD-2, a molecule that confers lipopolysaccharide responsiveness on Toll-like receptor4,“ *J. Exp. Med.* **189**(11), 1777 (1999).
- 278 J. Sieper, „Disease mechanisms in reactive arthritis,“ *Curr. Rheumatol. Rep.* **6**(2), 110 (2004).
- 279 A. Sodhi, *et al.*, „MAPK and Akt act cooperatively but independantly on hypoxia inducible factor-1alpha in rasV12 upregulation of VEGF,“ *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **287**(1), 292 (2001).
- 280 S. Soker, *et al.*, „Neuropilin-1 is expressed by endothelial and tumor cells as an isoform-specific receptor for vascular endothelial growth factor,“ *Cell* **92**(6), 735 (1998).
- 281 T. M. Staggs, *et al.*, „Identification of lactoferrin-binding proteins from *Treponema pallidum* subspecies *pallidum* and *Treponema denticola*,“ *Mol. Microbiol.* **12**(4), 613 (1994).
- 282 C. H. Sutter, E. Laughner, and G. L. Semeza, „Hypoxia-inducible factor 1alpha protein expression is controlled by oxygen-regulated ubiquitination that is disrupted by deletions and missense mutations,“ *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **97**(9), 4748 (2000).
- 283 A. Swidsinski, *et al.*, „Mucosal flora in inflammatoy bowel disease,“ *Gastroenterology* **122**(1), 44 (2002).
- 284 Y. Takahashi, *et al.*, „Expression of vascular endothelial growth factor and its receptors, KDR, correlates with vascularity, metastasis, and proliferation of human colon cancer,“ *Cancer Res.* **55**(18), 3964 (1995).
- 285 Y. Takahashi, *et al.*, „Vessel counts and expression of vascular endothelial growth factor as prognostic factors in node-negative colon cancer,“ *Arch. Surg.* **132**(5), 5541 (1997).

-
- 286 M. Takanashi, *et al.*, „Establishment of Hypoxia inducible factor-1alpha overexpressing cells that produce endothelin-1,“ J. Cardiovasc. Pharmacol. **44 Suppl 1**, S268-S273 (2004).
- 287 K. L. Talks, *et al.*, „The expression and distribution of the hypoxia-inducible factors HIF-1alpha and HIF-2alpha in normal human tissues, cancers, and tumor-associated macrophages,“ Am. J. Pathol. **157**(2), 411 (2000).
- 288 N. Tang, *et al.*, „Loss of HIF-1alpha in endothelial cells disrupts a hypoxia-driven VEGF autocrine loop necessary for tumorigenesis,“ Cancer Cell **6**(5), 485 (2004).
- 289 C. Taylor and C. Jobin, „Ubiquitin protein modification and signal transduction: implications for inflammatory bowel diseases,“ Inflamm. Bowel Dis. **11**(12), 1097 (2005).
- 290 G. Thierbach and H. Reichenbach, „Myxothiazol, a new inhibitor of the cytochrome b-c1 segment of the respiratory chain,“ Biochem. Biophys. Acta **638**(2), 282 (1981).
- 291 E. Tischer, *et al.*, „The human gene for vascular endothelial growth factor. Multiple protein forms are encoded through alternative exon splicing,“ J. Biol. Chem. **266**(18), 11947 (1991).
- 292 A. Toivanen, *et al.*, „Pathogenesis of *Yersinia*-triggered reactive arthritis: immunological, microbiological and clinical aspects,“ Immuno. Rev. **86**, 47 (1985).
- 293 H. Towbin, T. Staehelin, and J. Gordon, „Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamid gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications.1797,“ Biotechnology **24**, 145 (1992).
- 294 V. V. Tryon and J. B. Baseman, „The acquisition of human lactoferrin by *Mycoplasma pneumoniae*,“ Microb. Pathog. **3**(6), 437 (1987).
- 295 M. Valdebenito, *et al.*, „The detection of salmochelin and yersiniabactin in uropathogenic *Escherchia coli* strains by a novel hydrolysis-fluorescence-detection (HFD) method,“ Int. J. Med. Microbiol. **295**(2), 99 (2005).
- 296 C. G. van Bohemen, *et al.*, „HLA-B27M1M2 and high immune responsiveness to *Shigella flexneri* in post-dysenteric arthritis,“ Immunol. Lett. **13**(1-2), 71 (1986).

-
- 297 P. Vaupel, F Kallinowski, and P. Okunieff, „Blood flow, oxygen and nutrient supply, and metabolic microenvironment of human tumors: a review,“ *Cancer Res.* **49**(23), 6449 (1989).
- 298 A. Vink, *et al.*, „HIF-1alpha expression is associated with an atheromatous inflammatory plaque phenotype and upregulated in activated macrophages,“ *Atherosclerosis* **195**(2), 69 (2007).
- 299 S. A. Vokes, *et al.*, „The aerobactin iron transport system genes in *Shigella flexneri* are present within a pathogenicity island,“ *Mol. Microbiol.* **33**(1), 63 (1999).
- 300 S. R. Walmsley, *et al.*, „Neutrophils from patients with heterozygous germline mutations in the von Hippel-Lindau protein(pVHL) display delayed apoptosis and enhanced bacterial phagocytosis,“ *Blood* **108**(9), 3176 (2006).
- 301 S. R. Walmesly, *et al.*, „Hypoxia-induced neutrophil survival is mediated by HIF-1alpha-dependant NF-kappaB activity,“ *J Exp. Med.* **201**(1), 105 (2005).
- 302 G. L. Wang, *et al.*, „Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O₂ tension,“ *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **92**(12), 5510 (1995).
- 303 G. L. Wang and G. L. Semenza, „Desferrioxamine induces erythropoetin gene expression and hypoxia-inducible factor 1 DNA-binding activity: implications for models of hypoxia signal transduction,“ *Blood* **82**(12), 3610 (1993).
- 304 G. L. Wang and G. L. Semenza, „Purification and characterization of hypoxia-inducible factor 1,“ *J. Biol. Chem.* **270**(3), 1230 (1995).
- 305 R. M. Wanner, *et al.*, „Epolones induce erythropoetin expression via hypoxia-inducible factor-1alpha activation,“ *Blood* **96**(4), 1558 (2000).
- 306 P. P. Ward, E. Paz, and O. M. Conneely, „Multifunctional role of lactoferrin: a critical overview,“ *Cell Mol. Life Sci.* **62**(22), 2540 (2005).
- 307 P. J. Warner, *et al.*, „ColV plasmid-specific aerobactin synthesis by invasive strains of *Escherichia coli*,“ *Infect. Immun.* **33**(2), 540 (1981).
- 308 J. Wehkamp, *et al.*, „NOD2 (CARD15) mutations in Crohn’s disease are associated with diminished mucosal alpha-defensine expression,“ *Gut* **53**(11), 1658 (2004).
- 309 E. D. Weinberg, „Iron and infection,“ *Microbiol. Rev.* **42**(1), 45 (1978).

-
- 310 S. Wellmann, *et al.*, „Specific reverse transcription-PCR quantification of vascular endothelial growth factor (VEGF) splice variants by LightCycler technology,“ *Clin. Chem.* **47**(4), 654 (2001).
- 311 R. H. Wenger, „Cellular adaptation to hypoxia: O₂-sensing protein hydroxylases, hypoxia-inducible transcription factors, and O₂-regulated gene expression,“ *Faseb J.* **16**(19), 1151 (2002).
- 312 P. Williams, *et al.*, „Novel aerobactin receptor in *Klebsiella pneumoniae*,“ *J. Gen. Microbiol.* **135**(12), 3173 (1989).
- 313 R. J. Williams, „Biom mineralization: iron and the origin of life,“ **343**(6255), 213 (1990).
- 314 S. D. Wright, *et al.*, „CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein,“ *Science* **249**(4975), 1431 (1990).
- 315 W. Xu, *et al.*, „The role of nitric oxide in cancer,“ *Cell Res.* **12**(5-6), 311 (2002).
- 316 K. Yamanaka, *et al.*, „Desferrioxamine E produced by *Streptomyces griseus* stimulates growth and development of *Streptomyces tanashiensis*,“ *Microbiology* **151**(Pt 9), 2899 (2005).
- 317 H. Yan, *et al.*, „Hypoxia-stimulating agents and selective stimulation of arsenic trioxide-induced growth arrest and cell differentiation in acute promyelocytic leukemic cells,“ *Haematologica* **90**(12), 1607 (2005).
- 318 J. C. Yang, *et al.*, „A randomized trial of bevacizumab, an anti-vascular endothelial growth factor antibody, for metastatic renal cancer,“ *N. Engl. J. Med.* **349**(5), 427 (2003).
- 319 K. Yano, *et al.*, „Vascular endothelial growth factor is an important determinant of sepsis morbidity and mortality,“ *J Exp. Med.* **203**(6), 1447 (2006).
- 320 S. Yasuda, *et al.*, „Hexokinase II and VEGF expression in liver tumors: correlation with hypoxia-inducible factor 1alpha and its significance,“ *J. Hepatol.* **40**(1), 117 (2004).
- 321 M. Yeo, *et al.*, „Novel action of gastric proton pump inhibitor on suppression of *Helicobacter pylori* induced angiogenesis,“ *Gut* **55**(1), 26 (2006).

-
- 322 H. Y. Yeung, *et al.*, „Hypoxia-inducible factor-1-mediated activation of stanniocalcin-1 in human cancer cells,“ *Endocrinology* **146**(11), 4951 (2005).
- 323 A. Yoshimura, *et al.*, „Cutting edge: recognition of Gram-positive bacterial cell wall components by the innate immun system occurs via Toll-like receptor 2,“ *J. Immunol.* **163**(1), 1 (1999).
- 324 S. X. Zhang, *et al.*, „Hypoxia induces an autocrine-paracrine survival pathway via platelet-derived growth factor (PDFG)-B/PDGF-beta receptor/phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling in RN46A neuronal cells,“ *FASEB J.* **17**(12), 1709 (2003).
- 325 H. Zhong, *et al.*, „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 (2000).
- 326 H. Zhong, *et al.*, „Overexpression of hypoxia-inducible factor 1alpha in common human cancers and their metastases,“ *Cancer Res.* **59**(22), 5830 (1999).

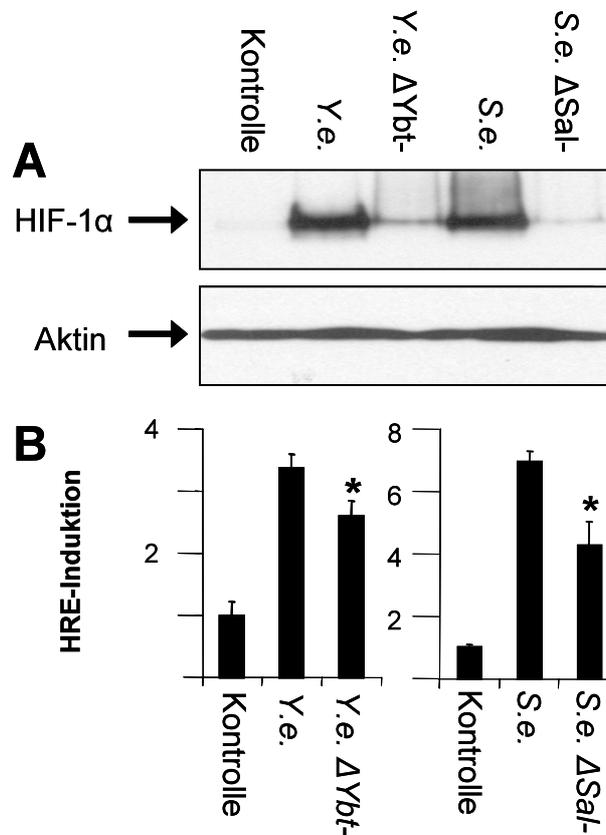
7 Abkürzungen

β_2 -M	β_2 -Mikroglobulin	EDTA	Ethylen-Diamin-N,N,N',N'-Tetraacetat
°C	Grad Celsius	EHEC	Enterohämorrhagische <i>E. coli</i>
μ m	Mikrometer	EIEC	Enteroinvasive <i>E. coli</i>
AB	Antibiotika	ELISA	<i>enzyme linked immunosorbent assay</i>
ADM	Adrenomedullin	eNOS	<i>Endothelial nitric oxide synthase</i>
Aeb	Aerobactin	EPEC	Enteropathogene <i>E. coli</i>
AIDS	<i>acquired immune deficiency syndrome</i>	ESBL	<i>extended spectrum β-Lactamasen</i>
APS	Ammoniumperoxidsulfat	ETEC	Enterotoxische <i>E. coli</i>
AraC	Arabinofuranosylcytosin	FCS	<i>fetal calf serum</i>
ARNT	<i>aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator</i>	FIH	<i>factor-inhibiting-HIF</i>
<i>B. h.</i>	<i>Bartonella henselae</i>	Fur	<i>ferric uptake regulation</i>
BA	Bazilläre Angiomatose	fw	<i>forward</i>
BadA	<i>Bartonella Adhesin A</i>	Fyu	<i>ferric yersiniabactin uptake</i>
bHLA	<i>basic helix-loop-helix</i>	<i>g</i>	Erdbeschleunigung
BSA	<i>bovine serum albumin</i>	<i>g</i>	Gramm
CARD	Caspase recruitment domain	G-6-PDH	Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase
CBP	<i>CREB binding protein</i>	GM-CSF	<i>Granulocyte macrophage colony-stimulating factor</i>
CD	<i>cluster of differentiation</i>	h	Stunde
cDNA	<i>copy desoxyribonucleotic acid</i>	HIF	<i>hypoxia inducible factor</i>
CED	chronisch entzündliche Darmerkrankungen	HIV	<i>human immunodeficiency virus</i>
ColV	Colicin V Plasmid	HK II	Hexokinase II
DAPI	4',6-Diamidino-2-Phenylindol-2HCl	HLA	<i>human leukocyte antigen</i>
dest.	destilliert	HMECs	<i>human microvessel endothelial cells</i>
DFO	Desferrioxamin	HO	<i>Heme oxygenase</i>
DHBS	Dihydroxybenzoylserin	HPI	<i>high pathogenicity island</i>
dI-dC	deoxyinosinic-deoxycytidylic acid	HRE	<i>hypoxia responsive element</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid	HRP	<i>hypoxia responsive element</i>
DNA	<i>desoxyribonucleotic acid</i>	HSP	<i>heat shock proteins</i>
dNTPs	Desoxynukleotidtriphosphat	IGFBP	<i>Insulin-like growth factor-binding protein</i>
DTT	Dithiothreitol	IL	Interleukin
<i>E. a.</i>	<i>Enterobacter aerogenes</i>		
<i>E. coli</i>	<i>Escheria coli</i>		

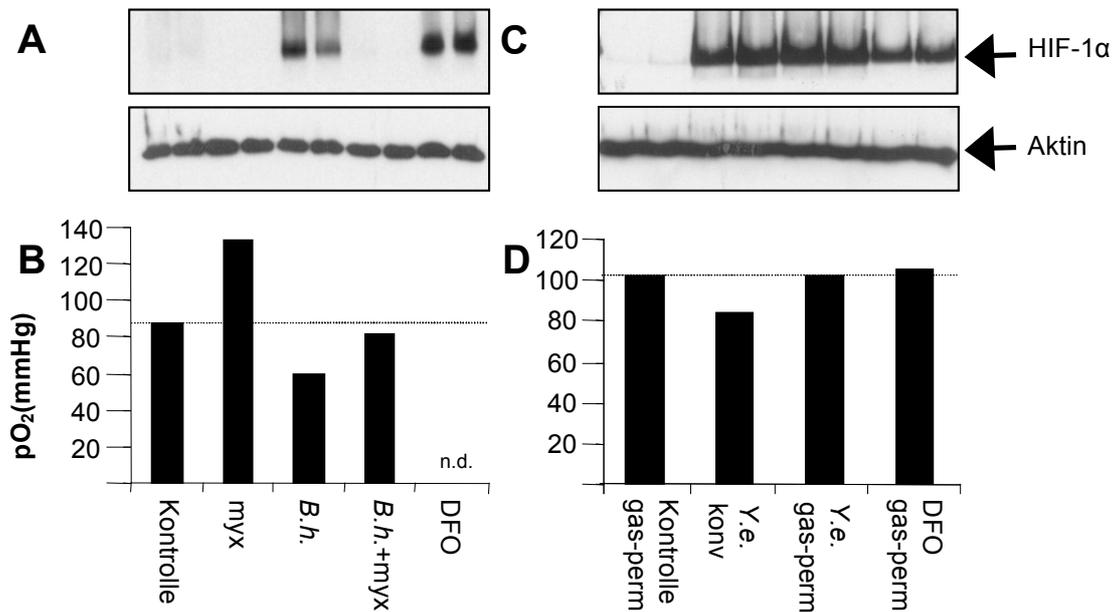
IOP	<i>iron-only hydrogenase like protein</i>	OD	oligomerization domain Optische Dichte
iroN	<i>Iron-regulated outer membrane protein N</i>	ODD	<i>oxygen dependant degradation</i>
J	Jahr	PAS	<i>periodic acid schiff</i>
Kan	Kanamycin	PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
kb	Kilobasenpaare	PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
kDa	Kilodalton	PDGF	<i>Platelet-derived growth factor</i>
KKK	Katzenkratzkrankheit	PFKL	Phosphofruktokinase-L
Konz.	Konzentration	PGK	<i>Phosphoglycerate kinase</i>
KZ	Keimzahl	PH	Peliosis hepatis
l	Liter	PHD	<i>proline hydroxylase domain containing proteins</i>
LB-Medium	Luria-Bertani-Medium	PI3K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
LC	LightCycler	PIGF	<i>Placental growth factor</i>
LDH	Lactatdehydrogenase	PMA	Phorbol 12-Myristat 13-Acetat
LF	Lactoferrin	PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
LJ	Lebensjahr	PNPP	Para-Nitrophenylphosphat
LK	Lymphknoten	pO ₂	Sauerstoffpartialdruck
LPS	Lipopolysaccharid	PPs	Peyerschen Plaques
M	Molar	PVDF	Polyvinylidifluorid
mA	Milliampere	Qu.	Quelle
MAPK	mitogen-aktivierte Proteinkinase	REA	Reaktive Arthritis
MCP	<i>monocyte chemotactic protein</i>	rev	<i>reverse</i>
MDP	Muramyl dipeptide	RNA	<i>ribonucleic acid</i>
Meth.	Methode	RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
mg	Milligramm	RT	Raumtemperatur
MHC	<i>major histocompatibility complex</i>	RT-PCR	<i>real time polymerase chain reaction</i>
min	Minuten	s	Sekunden
ml	Milliliter	S. e.	<i>Salmonella enterica</i>
MM	Magermilch	Sal	Salmochelmin
mM	Millimolar	SDS	Sodium dodecyl sulfat
MOI	Multiplicity of Infection	spp.	Subspezies
mRNA	<i>messenger ribonucleic acid</i>	suppl.	supplementiert
Nal	Nalidixin	TAD	Transaktivierungsdomäne
NFκB	<i>nuclear factor kappa B</i>	TAE	Tris/Acetat/EDTA-Puffer
ng	Nanogramm	TBE	Tris/borate/EDTA-Puffer
nm	Nanometer	TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyl-Ethylen-Diamin
NOD	Nucleotide-binding		

TGF- β	<i>Transforming growth factor-β</i>	VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i>
TLR	<i>toll like receptor</i>	vHL	von-Hippel-Lindau-Protein
TNF	Tumornekrosefaktor	w/v	Gewicht pro Volumen
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan	WB	Western Blot
U	Units	<i>Y. e.</i>	<i>Yersinia enterocolitica</i>
üN	über Nacht	Ybt	Yersiniabactin
V	Volt		

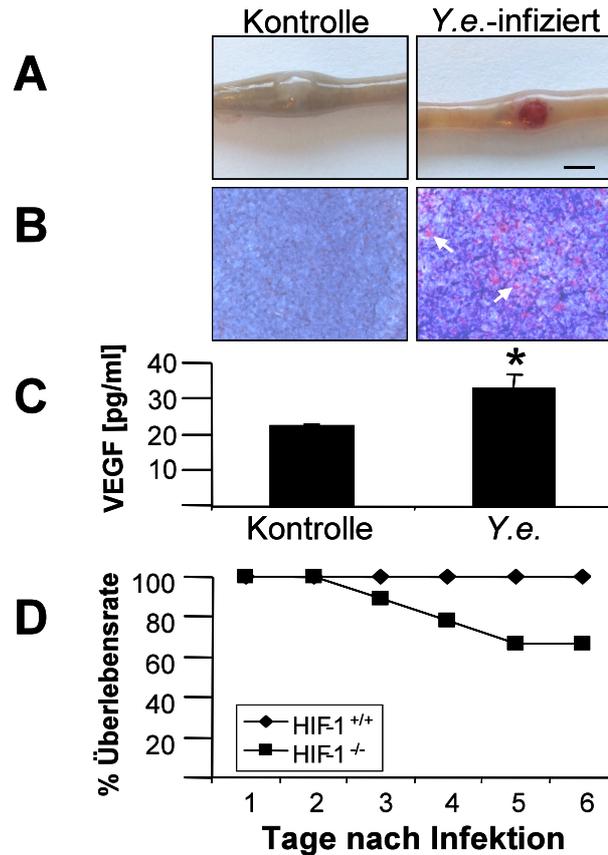
8 Anhang



Zusätzliche Abb. 1: Eisenaufnahme-abhängige HIF-1-Aktivierung bei *Y. enterocolitica*- und *S. enterica* spp. *enterica*-Infektionen. Aktivierung von HIF-1 6 h nach Infektion mit *Y. enterocolitica* (Y.e.), einer *Y. enterocolitica*-Eisenaufnahmemutante (Y.e. ΔYbt-), *S. enterica* spp. *enterica* (S.e.) und der entsprechenden Eisenaufnahmemutante (S.e. ΔSal-, alle MOI 20). Als Negativkontrolle in diesem Versuch dienten uninfizierte Zellen. **(A)** HIF-1α (120 kDa) wurde in HeLa229-Zellen mittels Immunoblot nachgewiesen. Ladekontrolle: Aktin. **(B)** Zur Untersuchung der Induktion einer HIF-1-abhängigen Luziferase-Aktivität in Epithelzellen wurden HeLa-Zellen 24 h vor Infektion mit einem HRE-Luziferase-Reporterkonstrukt transfiziert. 6 h nach Infektion wurde die Induktion über Chemilumineszenz gemessen. * Signifikante Unterschiede im Vergleich zu Zellen, die mit den entsprechenden Wildtyp-Stämmen infiziert wurden ($p < 0,01$; in Kooperation mit Frau Dr. Hanna Hartmann).



Zusätzliche Abb. 2: Hypoxie-abhängige (*B. henselae*) und Hypoxie-unabhängige (*Y. enterocolitica*) HIF-1-Aktivierung. (A) Aktivierung von HIF-1 in HMECs 24 h nach Infektion mit *B. henselae* (*B. h.*, MOI 500) und Behandlung mit Myxothiazol (Hemmstoff der mitochondrialen Atmungskette) in konventionellen Sauerstoff-undurchlässigen Kulturgefäßen. Als Negativkontrolle dienten uninfizierte Zellen, als Positivkontrolle DFO (200µM). **(B)** Der pO₂ wurde im Medium von unbehandelten und *B. henselae*-infizierten HMECs gemessen, die in luftdicht verschlossenen und vollständig mit Medium gefüllten Gefäßen kultiviert wurden. Die Messung erfolgte 24 h nach Infektion. **(C)** Aktivierung von HIF-1 in HeLa229-Zellen, die mit *Y. enterocolitica* (*Y.e.*, MOI: 20) infiziert und in konventionellen Sauerstoff-undurchlässigen Kulturgefäßen bzw. speziellen Sauerstoff-durchlässigen Gefäßen kultiviert wurden. Als Negativkontrolle dienten uninfizierte Zellen, als Positivkontrolle DFO (200µM). HIF-1α (120kDa) wurde 6 h nach Infektion im Immunoblot nachgewiesen. Als Ladekontrolle diente Aktin. **(D)** Der pO₂ im Medium von unbehandelten und *Y. enterocolitica*-infizierten HeLa229-Zellen wurde 6 h nach Infektion gemessen. Daten entnommen aus ¹²³.



Zusätzliche Abb. 3: HIF-1-Aktivierung nach *Y. enterocolitica*-Infektion *in vivo*. (A) C57BL/6-Mäuse wurden oral mit 5×10^8 *Y. enterocolitica* infiziert. Die Peyerschen Plaques (PPs) wurden zwei Tage später entnommen. Makroskopische Veränderungen der PPs sind starke Durchblutung und eine sichtbare Neovaskularisierung. Es sind repräsentative Aufnahmen von insgesamt 19 oral infizierten Mäusen aus vier unabhängigen Experimenten gezeigt. Skalierung: 2 mm. (B) Gezeigt ist der immunhistochemische Nachweis von HIF-1 in uninfizierten (links) und infizierten (rechts) PPs unter Verwendung eines HIF-1-spezifischen Antikörpers (rote Färbung, Hämatoxylin-Gegenfärbung). Die Pfeile zeigen zahlreiche HIF-1-positive Zellkerne. (C) Serum-VEGF-Spiegel nach *Y. enterocolitica*-Infektion *in vivo*. BALB/c-Mäuse wurden intravenös mit 5×10^6 *Y. enterocolitica*-Bakterien infiziert. Der VEGF-Spiegel (pg/ml) wurde im Serum 36 h nach Infektion mittels ELISA gemessen. * Signifikanter Unterschied verglichen mit der Negativkontrolle ($p < 0,03$). (D) Überlebensrate von HIF-1^{+/+}- und HIF-1^{-/-}-Mäusen nach Infektion mit *Y. enterocolitica*. Mäuse wurden oral mit einer subletalen Dosis von 5×10^8 Bakterien infiziert. Die Überlebensrate 6 Tage nach Infektion lag bei den Mäusen mit HIF-1-Deletion im intestinalen Epithel (Quadrate, n=9) bei nur 67% im Vergleich zu 100% Überlebensrate bei den Wildtypmäusen (Rauten, n=9). Daten entnommen aus: ¹²⁴.

9 Publikationen

Hartmann H, Eltzhig HK, Wurz H, Hantke K, Rakin A, Yazdi AS, Matteoli G, Bohn E, Autenrieth IB, Karhausen J, Neumann D, Colgan SP, Kempf VA. Hypoxia-independent activation of HIF-1 by *Enterobacteriaceae* and their siderophores. *Gastroenterology*. 2008 Mar;134(3):756-67.

10 Danksagung

Die vorliegende Arbeit entstand am Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene des Universitätsklinikums Tübingen.

Mein herzlichster Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. Volkhard Kempf für die hervorragende Betreuung und Unterstützung, für sein fortwährendes Engagement verbunden mit seiner ständigen Bereitschaft zur Diskussion.

Herrn Prof. Dr. Ingo Autenrieth danke ich für die exzellenten Arbeitsbedingungen am Institut.

Herrn Prof. Dr. Klaus Hantke gilt mein Dank für die Produktion des Salmochelins und die Bereitstellung der Salmonellen-Stämme, sein beständiges Interesse sowie hilfreiche Anregungen zu dieser Arbeit.

Für ihre Kooperationsbereitschaft und Hilfestellung, ohne die Teile meiner Arbeit nicht möglich gewesen wären, danke ich Frau Dr. Hanna Hartmann, Frau Dr. Maria Lebidziejewski, Herrn Dr. Erwin Bohn und Herrn Dr. Alexander Rakin.

Mein besonderer Dank richtet sich an Diana Neumann und Andrea Schäfer, ohne deren Hilfe und Engagement gerade in den Anfangs- und Endtagen dieser Arbeit die Durchführung der Experimente im Labor nicht möglich gewesen wäre.

Bei der gesamten Arbeitsgruppe bedanke ich mich für die angenehme Zusammenarbeit, das hervorragende Arbeitsklima und das Korrekturlesen meiner Arbeit. Dies gilt ganz besonders für Tanja Rieß, Yoo-Hee Wälzlein, Urs Eehalt, Tanja Mändle, Christian Eberhardt, Patrick Kaiser und Carola Wagner.

Ich danke auch allen anderen Mitarbeitern des Instituts für die gute Arbeitsatmosphäre, zahlreiche Tipps und die ständige Hilfsbereitschaft.

Zudem möchte ich mich besonders bei meiner Kommilitonin und guten Freundin Nina Wiedmaier bedanken, ohne deren gute Laune und Ratschläge viele Stunden Arbeit nur halb so effektiv gewesen wären.

Von ganzem Herzen danke ich Dominik und meiner Familie, die mich während meiner Promotion liebevoll unterstützt haben.

11 Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name Helena Sophia Wurz
Geburtsort Leimen
Geburtsdatum 24. Februar 1982

Schulbildung:

1988-1992 Müller-Guttenbrunn Grundschule, Mosbach
1992-1998 Nicolaus-Kistner Gymnasium, Mosbach
1998-1999 Thomas Worthington High School; Worthington,
Ohio, USA ; Abschluss Diploma 1999
1999-2001 Nicolaus-Kistner Gymnasium Mosbach; Abschluss
Allgemeine Hochschulreife

Studium:

2001-2002 Physik- und Chemiestudium auf Staatsexamen,
Eberhard-Karls-Universität, Tübingen
2002-2008 Medizinstudium, Eberhard-Karls-Universität,
Tübingen; Staatsexamen 12. Juni 2008
08/05-02/06 Brown University; Providence, Rhode Island, USA
03/06-04/06 University of Malawi, Klinik für Chirurgie; Blantyre,
Malawi
10/07-01/08 Universitätsklinikum Zürich, Klinik für Kinderchirurgie;
Zürich, Schweiz

Promotion:

2004-2009 Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene
Universitätsklinikum Tübingen
Thema: „Aktivierung von HIF-1 nach Infektion mit
Enterobacteriaceae“, betreut durch Prof. Dr. med. V.
Kempf

Beruflicher Werdegang:

Juli 2008 Assistenzärztin Allgemein- und Visceralchirurgie,
Diakonissen-Stiftungs-Krankenhaus Speyer
CA PD Dr. Dirk Jentschura