

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Substanzen

Produkt	Hersteller
Azeton	Merck
Akrylamid	Serva
Agarose	Promega
Ammoniumpersulfat (APS)	Serva
Amphoterizin	Boehringer
Antipain	Sigma
Aprotinin	Sigma
1,4-Dithiothreitol (DTT)	Merck
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma
Eisessig	Merck
Ethanol	J.T.Baker
Ethidiumbromid	Sigma
Ethylendiamintetraazetat (EDTA)	Roth
Fetales Kälberserum (FCS)	Gibco
Formaldehyd 37%	Sigma
Gelatine	Sigma
L-Glutamin	Gibco
Glyzin	Serva

MATERIAL UND METHODEN

N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-Ethansulfonsäure (HEPES)	Roth
Kaliumchlorid	Merck
Kaliumhydrogenphosphat	Merck
Leupeptin	Sigma
Magnesiumchlorid	Sigma
β -Mercaptoethanol	Serva
Methanol	Merck
Natriumchlorid	Merck
Natriumdeoxycholat, minimum 97%	Sigma
Natriumhydrogencarbonat	Merck
Natriumhydrogenphosphat	Merck
Nonidet P 40	BioChemika
Orange G	Sigma
Paraformaldehyd (PFA)	Sigma
Phosphatgepufferte Salzlösung ohne Kalzium und Magnesium (PBS-/-)	PAA
Pepstatin A	Sigma
Phenylmethylsulphonylfluorid (PMSF)	Sigma
Schwefelsäure 95-97%	Merck
Sodiumdodezylsulfat (SDS)	Serva
Sodium Fluorid	Sigma
Sodium Pyrophosphat	Sigma
Sodium Orthovanadat	Sigma

MATERIAL UND METHODEN

Trichloressigsäurelösung 50%	Merck
Trizma Base, minimum 99,9% Titration	Sigma
Trypsin EDTA	Gibco
Tween 20	Sigma
N,N,N',N'-Tetramethyldiamin (TEMED)	R and D-Systems

3.1.2 Enzyme

Produkt	Hersteller
Proteinase K	Merck
Ribonuklease A (RNase A)	AppliChem

3.1.3 Kulturmedien

Produkt	Hersteller
HUVEC-Kultivierungsmedium	
Endothel-Basal-Medium 500 ml	PAA
5 ml L-Glutamin (200 mM)	Gibco
0,2 ml Amphotericin B (500X)	Roche
0,1 ml EGF (200µg/ml)	Sigma
10% FCS	PAA
7 ml Penicillin/Streptomycin (10000µg/ml)	BiochromAG
10% Endothel Cell Growth Medium	PromoCell
Supplement Mix	PromoCell
Zur Inaktivierung von Komplementfaktoren musste das FCS zunächst für 30 min bei 56 °C erhitzt werden.	

MATERIAL UND METHODEN

HUVEC-Infektionsmedium	
Endothel-Basal-Medium 500 ml	PAA
5 ml L-Glutamin (200 mM)	Gibco
5-10% FCS	PAA
Zur Inaktivierung von Komplementfaktoren musste das FCS zunächst für 30 min bei 56 °C erhitzt werden.	
HAEC-Kultivierungsmedium	
Endothelzell-Basal-Medium-2 (EBM-2)	Clonetics
Fetales Bovines Serum (FBS) 10 ml	Clonetics
Hydrokortison 0,2 ml	Clonetics
Humaner Fibroblasten Wachstumsfaktor B (HFGF-B) 2 ml	Clonetics
Vaskulärer Endothelialer Wachstumsfaktor (VEGF) 0,5 ml	Clonetics
Rekombinanter „Long R“ Insulinähnlicher Wachstumsfaktor-1 (R ³ -IGF-1) 0,5 ml	Clonetics
Ascorbinsäure 0,5 ml	Clonetics
Rekombinanter Humaner Epidermaler Wachstumsfaktor (HEGF) 0,5 ml	Clonetics
Gentamyzinsulfat/Amphotericin B (GA-1000) 0,5 ml	Clonetics
Heparin 0,5 ml	Clonetics
HAEC-Infektionsmedium	
Endothelzell-Basal-Medium-2 (EBM-2)	Clonetics

MATERIAL UND METHODEN

HEp-2-Kultivierungsmedium	
EARLE`s MEM 500 ml	Gibco
5 ml L-Glutamin (200 mM)	Gibco
1 ml Amphotericin B (500x)	Roche
0,5 ml Gentamycin	Gibco
5 ml Nichtessentielle Aminosäuren	Gibco
HEp-2-Infektionsmedium	
EARLE`s MEM 500 ml	Gibco
5 ml L-Glutamin (200 mM)	Gibco
5 ml Nichtessentielle Aminosäuren	Gibco
0,5 ml Cycloheximid (1 Mg/ml)	Fluka Biochemika
Listerien-Anzucht	
37 g Bacto Brain Heart Infusion (BHI)	Becton, Dickinson and Company
1000 ml Aqua bidest.	

3.1.4 Zellen

Humane umbilikalvenöse Endothelzellen (HUVEC)

Die Nabelschnüre für die Gewinnung von humanen Endothelzellen aus der Nabelschnurvene wurden freundlicherweise aus der Geburtshilfe-Abteilung des Humboldt Krankenhauses in Reinickendorf (Berlin) zur Verfügung gestellt.

Humane aortale Endothelzellen (HAEC)

Die HAEC sind primäre Endothelzellen aus der Aorta und stammten von der Firma Cambrex (Cambrex Bio Science Walkersville, Inc.). Sie wurden von der Firma aus humanem Gewebe (aortalem Endothel) isoliert und im Labor bei $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ in flüssigem Stickstoff für die weitere Anzucht aufbewahrt.

HEp-2-Zellen

HEp-2-Zellen (American Type Culture Collection) sind Karzinomzellen vom Mundboden, die ein Plattenepithel bilden.

3.1.5 Bakterienstämme

***Listeria monocytogenes* Bakterienstamm EGD, Serotyp 1/2a und *Listeria innocua* Bakterienstamm ATCC 33090 (INN), Serotyp 6b**

Der pathogene Wildtyp-Stamm EGD, Serotyp 1/2a von *Listeria monocytogenes* und der apathogene Stamm ATCC 33090 (INN), Serotyp 6b von *Listeria innocua* wurden freundlicherweise von Prof. Dr. T. Chakraborty, Institut für Medizinische Mikrobiologie der Justus Liebig Universität zu Giessen, zur Verfügung gestellt.

***Chlamydomphila pneumoniae* Bakterienstamm ATCC VR-1310 (CWL-029)**

Der Bakterienstamm von *Chlamydomphila pneumoniae* wurde dem Labor freundlichst zur weiteren Anzucht von Prof. Dr. med. Matthias Maas, Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene der Medizinischen Universität zu Lübeck, überlassen.

***Chlamydomphila trachomatis* Bakterienstamm CTK, Serovar K**

Dieser Bakterienstamm von *Chlamydomphila trachomatis* wurde dem Labor zur weiteren Anzucht freundlichst von J.G. Kuipers, Institut für Rheumatologie der Medizinischen Hochschule Hannover, zur Verfügung gestellt.

3.1.6 Puffer und Lösungen

Lösung für Zellkultur

Substanz	eingesetzte Menge
Gelatine	5,0 g
Aqua bidest.	ad 100,0 ml
Zum Lösen auf 80 °C erhitzt und steril filtriert.	

MATERIAL UND METHODEN

Puffer für IL-8-ELISA

Substanz	eingesetzte Menge
Carbonatpuffer, 0,1 M, pH 9,5	
NaHCO ₃	4,2 g
Na ₂ CO ₃	1,78 g
Aqua bidest.	ad 500,0 ml
Block-Puffer	
PBS (1x)	45,0 ml
FCS	5,0 ml
ELISA-Stopplösung	
H ₂ SO ₄ 97%	27,47 ml
Aqua bidest.	472,53 ml

Puffer und Gele für Western Blot

Substanz	eingesetzte Menge
Phospho-Proteinwaschpuffer	
Na ₄ P ₂ O ₇	150 mM
NaF	1 M
Na ₃ VO ₄	200 mM
Aqua bidest.	ad 505,0 ml
Lyse-Puffer (1,0 ml)	
Tris HCl, 50 mM, pH 7,4	100,0 µl
Nonidet P 40	50,0 µl

MATERIAL UND METHODEN

PMSF, 1 mM	10,0 µl
Antipain, 10 µg/ml	5,0 µl
Leupeptin, 10 µg/ml	5,0 µl
Pepstatin A, 10 µg/ml	5,0 µl
Phospho-Proteinwaschpuffer	833,0 µl
Laemmli-Puffer (4x)	
Glyzerol	0,8 ml
Tris-HCl, 0,5 M, pH 8,3	1,0 ml
SDS 10%	1,6 ml
Bromphenolblau 1%	0,4 ml
2-Mercaptoethanol 1%	0,4 ml, erst kurz vor Gebrauch hinzufügen
Aqua bidest.	0,95 ml
Laemmli-Puffer (1x)	
Glyzerol	0,8 ml
Tris-HCl, 0,5 M, pH 8,3	1,0 ml
SDS 10%	1,6 ml
Bromphenolblau 1%	0,4 ml
2-Mercaptoethanol 1%	0,4 ml, erst kurz vor Gebrauch hinzufügen
Aqua bidest.	3,8 ml
PBS-Stammlösung (20x)	
NaCl	320,0 g
Na ₂ HPO ₄	58,5 g
KH ₂ PO ₄	9,8 g

MATERIAL UND METHODEN

Aqua bidest.	ad 1000,0 ml
PBS (1x)	
PBS (20x)	50,0 ml
Aqua bidest.	ad 1000,0 ml
Lauf-Puffer (5x)	
Glyzin	72,0 g
Tris Base	15,0 g
SDS	5,0 g
Aqua bidest.	ad 1000,0 ml
Lauf-Puffer (1x)	
Lauf-Puffer (5x)	200,0 ml
Aqua bidest.	ad 1000,0 ml
Blot-Puffer (10x)	
Glyzin	144,0 g
Tris Base	30,0 g
Aqua bidest.	ad 1000,0 ml
Blot-Puffer (1x)	
Methanol	200,0 ml
Blot-Puffer (10x)	80,0 ml
Aqua bidest.	ad 1000,0 ml
Sammelgel-Puffer 0,5 M Tris-HCl, pH 6,8	
Tris Base	6,0 g
Aqua bidest.	ad 100,0 ml

MATERIAL UND METHODEN

Trenngel-Puffer 1,5 M, pH 8,8	
Tris Base	18,15 g
Aqua bidest.	ad 100,0 ml
Sammelgel	
Aqua bidest.	6,0 ml
Sammelgel-Puffer	2,5 ml
Akrylamid/Bisakrylamid	1,33 ml
SDS 10%	0,1 ml
Ammoniumpersulfat	0,05 ml
TEMED	0,01 ml, erst kurz vor Gebrauch hinzufügen
Trenngel	
Aqua bidest.	entsprechend dem molekularen Gewicht des Zielproteins
Trenngel-Puffer	2,5 ml
Akrylamid/Bisakrylamid	entsprechend dem molekularen Gewicht des Zielproteins
SDS 10%	0,1 ml
Ammoniumpersulfat	0,05 ml
TEMED	0,005 ml, erst kurz vor Gebrauch hinzufügen
Ponceau-S-Proteinfärbung	
Ponceau S	1,0 g
Eisessig	50,0 ml
Aqua bidest.	ad 1000,0 ml

MATERIAL UND METHODEN

Puffer und Lösungen für Western Blot Protein Extraktion für säurelösliche Proteine (z. B. Histone)

Substanz	eingesetzte Menge
Lysepuffer (Stocklösung)	
HEPES Puffer, pH 7,9	10 mM
KCl	10 mM
MgCl ₂	1,5 mM
PMSF	1,5 mM, erst kurz vor Gebrauch in den Lysepuffer geben
DTT	0,5 mM, erst kurz vor Gebrauch in den Lysepuffer geben
ELISA-Stopplösung	
H ₂ SO ₄ 97%	27,47 ml
Aqua bidest.	472,53 ml

Fixierlösung, Puffer und Agarosegel für Chromatin-Immunpräzipitation (ChIP)

Substanz	eingesetzte Menge
Fixierlösung	
PBS-/-	40 ml
Formaldehyd	1%
ChIP-Ripa-Puffer	
NaCl	150 mM
Tris, pH 7,5	10 mM

MATERIAL UND METHODEN

EDTA	1 mM
Nonidet P 40	1%
Desoxycholat	1%
Aprotinin	1% direkt in das gewonnene Zelllysate
High-Salt-Puffer	
NaCl	2 M
Tris, pH 7,5	10 mM
EDTA	1 mM
Nonidet P 40	1%
Desoxycholat	0,5%
TE-Puffer	
Tris, pH 7,5	10 mM
EDTA	1 mM
Aqua bidest.	ad 500,0 ml
Eluierungspuffer	
Tris, pH 7,5	10 mM
EDTA	1 mM
SDS	1%
Aqua bidest.	ad 20,0 ml
TAE-Puffer (50x)	
Tris Base, pH 8,7	242,0 g
EDTA	50 mM
Eisessig	51,1 ml

MATERIAL UND METHODEN

Aqua bidest.	ad 1000,0 ml
TAE-Puffer (1x)	
TAE-Puffer (50x)	20,0 ml
Aqua bidest.	ad 1000,0 ml
Orange G (5x)	
Glyzerol	5,0 ml
EDTA, 0,5 M	1,0 ml
Orange G 2%	1,0 ml
SDS 10%	0,1 ml
Aqua bidest.	2,9 ml
Orange G (1x)	
Orange G (5x)	1,0 ml
Aqua bidest.	4,0 ml
2%iges Agarosegel	
Agarose	2,0 g
TAE-Puffer (1x)	100,0 ml

3.1.7 Zellinhibitoren

Produkt	Funktion	Hersteller
NSC23766	Rac1-Inhibitor	Calbiochem
Suberoylanilid hydroxamic acid (SAHA)	HDAC-Inhibitor	ALEXIS Biochemicals
Simvastatin	Rho-Inhibitor	Calbiochem

MATERIAL UND METHODEN

SB202190	p38-Inhibitor	Calbiochem
SB203580	p38-Inhibitor	Calbiochem
SB202474	negative Kontrolle für MAP Kinase Studien	Calbiochem
SP600125	JNK-Inhibitor	Calbiochem
U0126	MEK1/2-Inhibitor	Calbiochem
Trichostatin A (TSA)	HDAC-Inhibitor	Sigma

3.1.8 Antikörper

Antikörper für Western Blot

Produkt	Spezies	Hersteller
Anti-Maus IgG	Ziege	Rockland
Anti-Kaninchen-IgG	Ziege	Rockland
ERK 2 (D-2)	Maus	Santa Cruz
p-ERK	Maus	Santa Cruz
p-JNK	Maus	Santa Cruz
p38	Maus	Santa Cruz
p-p38	Maus	Santa Cruz

Antikörper für Chromatin-Immunpräzipitation und Histonextraktion

Produkt	Spezies	Hersteller
Anti-azetyl-Histon H4	Kaninchen	upstate
Anti-phospho(S10)-azetyl(K14)-Histon H3	Kaninchen	upstate

MATERIAL UND METHODEN

HDAC 1 (H-51)	Kaninchen	Santa Cruz
NF κ B p65 (C-20)	Kaninchen	Santa Cruz
Pol II (N-20)	Kaninchen	Santa Cruz

3.1.9 Spezielle Reagenzien und Kits für ChIP

Produkt	Hersteller
Protein G PLUS Agarose Immunpräzipitations Reagenz	Santa Cruz
Protein A Agarose Immunpräzipitations Reagenz	Santa Cruz
PCR Purification Kit	Qiagen
Hotstart Taq Polymerase	Qiagen

3.1.10 Farbstoffe für Konfokale Laser Scanning Mikroskopie

Produkt	Hersteller
4'-6'-diamidino-2-phenylindole (DAPI)	Sigma
Phalloidin A488	Molecular Probes

3.1.11 Zubehör

Produkt	Hersteller
Filter (75 mm)	Nalgene
Hybond-ECL-Membran	Amershan Biosciences
Gel-Blotting-Papier	Roth
Pasteurpipetten (230 mm)	Brand

MATERIAL UND METHODEN

Platten (6-, 24-Multiwell)	Falcon
Röhrchen (15 ml, 50 ml)	Falcon
Pipetten (5 ml, 10 ml, 25 ml)	Falcon
Reaktionsgefäße (0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml)	Eppendorf
Scraper	Costar
Urinbecher (100 ml)	Sarstedt
Zellkulturflaschen (T25, T75)	BD Falcon
Zellkulturschalen (10 cm)	Falcon

3.1.12 Spezielle Geräte

Produkt	Hersteller
Bandelin Sonoplus (Sonifikator)	Bandelin
765 Calimatic (Kalorimeter)	Knick
Digitalkamera (Amedia)	Olympus
Drehschüttler REA x2	Heidolph
Forschungsmikroskop BX 60	Olympus
HERA CELL 240 (Zellkultur-Inkubator)	Heraeus
Holten Lamin Air Model 1.2 (Sterilbank)	Holten
MIKRO 24-48R (Kühlzentrifuge)	Hettich
MS2 Minishaker (Vortexer)	IKA®
PowerPac HCTM (Stromerzeuger)	BioRad
Rotanta/ RP (Zentrifuge)	Hettich
Systec V-65 (Sterilisator)	Heraeus

MATERIAL UND METHODEN

Thermocycler (Gradient Cycler, Biozym)	Biozym
Thermomixer comfort	Eppendorf
UVICON Spektrophotometer 922	Bio-Tek Kontron Instruments

3.2 Methoden

3.2.1 Zellbiologische Methoden

Isolation und Kultur von humanen Endothelzellen aus der Nabelschnurvene (HUVEC)

Die Geburtshilfe-Abteilung des Humboldt Krankenhauses Reinickendorf (Berlin) stellte freundlicherweise die Nabelschnüre zur Verfügung. Die Isolation der Endothelzellen erfolgte wöchentlich nach einem modifizierten Protokoll von Jaffé et al. (Jaffe *et al.*, 1973). Die Nabelschnurvenen wurden zunächst unter sterilen Bedingungen mittels einer Braunüle (Braunüle R, 18 G, Braun Melsungen) kanüliert, mit sterilem PBS+/- gespült und schließlich für 20 min mit 0,025% Typ II Kollagenase gefüllt. Durch mehrfaches Massieren und Ausspülen mit M 199 wurden die Endothelzellen aus der Vene gewonnen. Die isolierten Zellen wurden für 10 min bei 350 x g zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Zellpellet in HUVEC-Kultivierungsmedium gelöst und in T75-Flaschen überführt. Die so gewonnene Primärkultur der HUVEC wurde für 3-5 Tage im Brutschrank (37 °C, 5% CO₂) gelagert.

Konfluente HUVEC wurden je nach Verwendungszweck in 6-Loch- (Western Blot) oder 24-Loch-Platten (IL-8-ELISA und Bio-Plex Assay), in 10 cm-Schalen (Histonextraktion), T25- (ChIP mit Chlamydien) oder T75-Flaschen (Chip mit Listerien) ausgesät, welche zuvor für mindestens eine halbe Stunde mit einer 0,5%igen Gelatinelösung behandelt wurden. Hierbei wurden die Endothelzellen mit sterilem PBS-/- gewaschen, mit 0,5% Trypsin-EDTA abgelöst, wieder in Kulturmedium aufgenommen und entsprechend in die gelatinierten Gefäße überführt.

Die humanen Endothelzellen wurden im Brutschrank gehalten bis sie konfluent waren und nach morphologischen Kriterien Jaffés (Jaffé und Posnett, 1984) charakterisiert.

Anzucht von humanen Endothelzellen aus der Aorta (HAEC)

Die Anzucht von HAEC in T75-Flaschen erfolgte für ca. 1,5 Wochen in antibiotikahaltigem Endothelzell-Basal-Medium-2 (EBM-2) mit einem FCS-Gehalt von 2% sowie geringeren Mengen an Hydrokortison, Wachstumsfaktoren, Ascorbinsäure, Gentamycin/Amphotericin B und Heparin.

Konfluente HAEC wurden zur weiteren Verwendung nach dem gleichen Verfahren wie die HUVEC in 24-Loch-Platten gesplittet.

Anzucht von HEp-2-Zellen

Die Kultivierung von HEp-2-Zellen erfolgte in antibiotikahaltigem Anzuchtmedium (EARLE`s MEM, 10% FCS, Glutamin, nichtessentielle Aminosäuren, Gentamycin und Amphotericin). Die HEp-2-Zellen wurden im Brutschrank (37 °C, 5% CO₂) in T25-Flaschen kultiviert, bis sie zu 70-80% konfluent waren. Zur weiteren Anzucht mussten die Zellen zweimal pro Woche gesplittet werden, wobei die Ablösung der Zellen vom Flaschenboden mit EDTA-Trypsin erfolgte.

Vorbereitung der Endothelzellen für verschiedene Versuche

ELISA (HUVEC und HAEC)

Die Zellen wurden in 24-Loch-Platten kultiviert, bis sie konfluent waren. Danach wurde direkt vor der Stimulation bzw. im Falle einer Vorinkubation mit Zellinhibitoren direkt vor der Vorinkubation mit dem Inhibitor ein Wechsel des Mediums vorgenommen, d. h. die Zellen wurden von antibiotikahaltigem Kultivierungsmedium (Endothel-Basal-Medium, 10% FCS, Glutamin, Amphotericin, Penicillin/Streptomycin, EGF) in antibiotikafreies Infektionsmedium (Endothel-Basal-Medium, Glutamin, 5-10% FCS) überführt. Anschließend wurden in die Löcher verschiedene Zellinhibitoren hinein pipettiert. Für HAEC war diese Vorbereitung ebenfalls zu treffen, wobei ein anderes Kultivierungs-/Infektionsmediums zu verwenden war (siehe 3.1.3).

Western Blot

Die Zellen wurden in 6-Loch-Platten kultiviert, wobei die Stimulation konfluenter Zellen pro Wert in einem Loch einer 6-Loch-Platte erfolgte. Am Tag der Stimulation wurden die Zellen ca. 3 h vor der Stimulation mit Bakterien von antibiotikahaltigem Kultivierungsmedium (Endothel-Basal-Medium, 10% FCS, Glutamin, Amphotericin, Penicillin/Streptomycin, EGF) in antibiotikafreies Infektionsmedium (Endothel-Basal-Medium, Glutamin, 5-10% FCS) überführt.

Western Blot Protein Extraktion für säurelösliche Proteine (z. B. Histone)

Die Zellen wurden entweder in 6-Loch-Platten (im Falle einer Stimulation mit Chlamydien) oder in 10 cm Schalen (im Falle einer Stimulation mit Listerien) kultiviert, wobei die Stimulation konfluenter Zellen pro Wert entweder in zwei Löchern einer 6-Loch-Platte oder in einer 10 cm Schale erfolgte.

Am Tag der Stimulation wurden die Zellen ca. 3 h vor der Stimulation mit Bakterien von antibiotikahaltigem Kultivierungsmedium (Endothel-Basal-Medium, 10% FCS, Glutamin, Amphotericin, Penicillin/Streptomycin, EGF) in antibiotikafreies Infektionsmedium (Endothel-Basal-Medium, Glutamin, 5-10% FCS) überführt.

Konfokale Laser Scanning Mikroskopie

Die Zellen wurden auf Glasplättchen in 24-Loch-Platten kultiviert, bis sie konfluent waren. Am Tag der Stimulation wurden die Zellen von antibiotikahaltigem Kultivierungsmedium (Endothel-Basal-Medium, 10% FCS, Glutamin, Amphotericin, Penicillin/Streptomycin, EGF) in antibiotikafreies Infektionsmedium (Endothel-Basal-Medium, Glutamin, 5-10% FCS) überführt.

Chromatin-Immunpräzipitation (ChIP)

Am Tag vor der Stimulation wurden die in T25- (zur Stimulation mit Chlamydien) bzw. T75-Flaschen (zur Stimulation mit Listerien) kultivierten Zellen von antibiotikahaltigem Kultivierungsmedium (Endothel-Basal-Medium, 10% FCS, Glutamin, Amphotericin, Penicillin/Streptomycin, EGF) in antibiotikafreies Infektionsmedium (Endothel-Basal-Medium, Glutamin, 5-10% FCS) überführt, um etwaigen Stimulationen von Kinasen am Tag der Stimulation entgegen zu wirken. Zur Gewinnung eines Wertes benötigte man konfluente Zellen einer T75-Flasche (ca. 6×10^6 / ml) im Falle einer Stimulation mit Listerien bzw. dreier T25-Flaschen (ca. 2×10^6 / ml) im Falle einer Infektion mit Chlamydien.

3.2.2 Mikrobiologische Methoden

Anzucht von Chlamydien in HEp-2-Zellen

Vor der Infektion mit Chlamydien wurden die HEp-2-Zellen von dem Anzuchtmedium in das Infektionsmedium (EARLE`s MEM, Glutamin, nichtessentielle Aminosäuren, Gentamicin, Cycloheximid und Amphotericin) überführt.

Die Infektion der HEp-2-Zellen erfolgte mit dem Bakterienstamm ATCC VR-1310 (CWL-029) von *Chlamydomphila pneumoniae* bzw. mit dem *Chlamydomphila trachomatis* Bakterienstamm CTK, Serovar K, die bis zur Infektion bei -80 °C gelagert wurden.

Dabei wurden die Chlamydien direkt in das Infektionsmedium auf die Zellen gegeben. Anschließend wurden die Zellkulturflaschen für 60 min bei 37 °C und 800 g zentrifugiert, um

eine bessere Adhäsion und Invasion der Bakterien zu erreichen. Zur Vermehrung der Chlamydien wurden die HEp-2-Zellen für 3-4 Tage im Brutschrank (37 °C, 5% CO₂) gelagert. Anschließend wurden die infizierten Zellen in Medium abgekratzt, in 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt, mit Glasperlen vermischt und für 2 min auf dem Minishaker (Vortex) zerkleinert. Dieses Gemisch aus zertrümmerten Zellen und Chlamydien wurde entweder mit Infektionsmedium aufgefüllt und diente zur weiteren Infektion von HEp-2-Zellen, oder es wurde bei –80 °C gelagert.

Zur Herstellung eines Bakterienstammes mussten die Chlamydien aufgereinigt werden. Dazu wurden Chlamydien aufgetaut, nochmals auf dem Minishaker für 5 min zerkleinert, in neue Zentrifugenröhrchen überführt, das entstandene Pellet (Zelltrümmer) verworfen und der Überstand für 1 h bei 20000 g und 4 °C zentrifugiert. Anschließend wurde das verbleibende Pellet (Chlamydien mit vereinzelt Zelltrümmern) in SPG-Puffer (PBS-Puffer mit 0,25 M Saccharose) aufgenommen, in Cryoröhrchen aliquotiert und bei –80 °C aufbewahrt. Die Bestimmung des infektiösen Titers der Stämme erfolgte durch serielle Verdünnung und Infektion von HEp-2-Zellen auf Deckgläschen in 24-Loch-Platten. Dazu wurden die Zellen 2 Tage nach der Infektion fixiert und mit einem speziellen Antikörper gefärbt. Infektiöse EBs konnten unter dem Fluoreszenzmikroskop ausgezählt werden, wobei theoretisch eine Inklusion aus einem EB hervorgegangen war. Der Titer der Stämme wurde als IFU (Infection Forming Unit)/ml angegeben, die zur Infektion eingesetzte Menge an Chlamydien als MOI (=Bakterien(EBs)/Zellzahl).

Infektion der Endothelzellen mit *L. monocytogenes* (EGD, Serotyp 1/2a)

Die Anzucht von *L. monocytogenes* (EGD, Serotyp 1/2a) und *L. innocua* (ATCC 33090 (INN), Serotyp 6b) erfolgte zunächst über Nacht in Form einer Vorkultur. Dabei wurden die bei –80 °C gelagerten Bakterien mittels einer Impföse in 5 ml BHI-Medium überführt und über Nacht bei 37 °C in einem Schüttelinkubator inkubiert. Am nächsten Tag wurden 500 µl dieser Übernachtskultur 1:500 in neuem BHI-Medium verdünnt. Nach ca. 3,5 - 4 h Wachstum bei 37 °C im Schüttelinkubator erfolgte die Messung der optischen Dichte bei 600 nm im Spektralphotometer. Die gemessene optische Dichte multipliziert mit 10⁹ ergab dabei die Bakterienanzahl pro ml. Nach 1,5 h Inkubation, wurden die HUVEC zweimal mit PBS gewaschen und anschließend in antibiotikahaltiges Kultivierungsmedium mit einem Gentamyzingehalt von 100 µg/ml überführt, um extrazelluläre Bakterien zu eliminieren.

Infektion der Endothelzellen mit *C. pneumoniae* (ATCC VR-1310 (CWL-029))

Die Infektion mit dem Erreger *Chlamydophila pneumoniae* (ATCC VR-1310, CWL-029) erfolgte mit einer MOI zwischen 0,5 und 5, die Infektion mit dem Erreger *Chlamydophila trachomatis* (CTK, Serovar K) mit einer MOI von 5. Zur Hitzeinaktivierung von *Chlamydophila pneumoniae* (ATCC VR-1310, CWL-029) wurden diese für 30 min bei 90 °C und 1200 rpm in den Heizschüttler (Thermomixer comfort, Eppendorf) überführt. Zur Infektion wurden die Chlamydien direkt in das Infektionsmedium auf die Zellen gegeben, und die Zellkulturflaschen für 60 min bei 37 °C und 800 g zentrifugiert, um eine bessere Adhäsion und Invasion der Bakterien zu erreichen.

3.2.3 Molekularbiologische Methoden

3.2.3.1 Methoden zum Nachweis von Proteinen

IL-8-ELISA

Der Interleukin 8 (IL-8) Enzyme-linked Immunosorbent Assay diente der Quantifizierung von IL-8 im Zellkulturüberstand.

Gewinnung und Aufarbeitung der Zellkulturüberstände

Die Zellüberstände wurden nach ca. 15 h Inkubationszeit in 1,5 ml Eppendorfgläser überführt und bei 4 °C und 25000 x g für 10 min zentrifugiert, um Zellreste zu entfernen. Anschließend wurden die Proben auf Eis gestellt und 1:500 in Blockpuffer (1x PBS, 10% FCS) verdünnt.

Versuchsdurchführung

Bevor die IL-8-haltigen Proben aufgetragen und für zwei Stunden auf der Mikrotiterplatte belassen wurden, erfolgte bei Raumtemperatur eine einstündige Inkubation mit Blockpuffer (1x PBS, 11% FCS), um unspezifischen Bindungen vorzubeugen.

Zur Quantifizierung von IL-8 wurde ein „Human IL-8 ELISA Set (BD Biosciences)“ verwendet, der einem Sandwich ELISA entspricht. Dabei reagierte das in den Zellkulturüberständen enthaltene Interleukin 8 in einer Antigen-Antikörper-Reaktion zunächst als Antigen mit einem monoklonalen Primärantikörper (capture antibody), der über Nacht im Kühlschrank bei 4 °C an eine Mikrotiterplatte (Nunc-Immuno Plate, Nunc) angehaftet wurde. Der Antikörper wurde

im Verhältnis 1:250 in 0,1 M Carbonatpuffer (4,2 g NaHCO₃, 1,78 g Na₂CO₃, Aqua bidest. ad 500 ml, pH 9,5) verdünnt.

Dem Antigen-Antikörper-Komplex wurde nun ein enzymgekoppelter Sekundärantikörper (detection antibody, 1:250 verdünnt) hinzugegeben, der ebenfalls an IL-8 band und gleichzeitig eine Farbreaktion katalysierte. Diese Farbreaktion wurde nach ca. 20 min mit einer ELISA-Stoplösung (27,47 ml H₂SO₄ 97%, A. bidest. ad 500 ml) beendet, wobei sich eine Farbänderung von blau nach gelb zeigte.

Die Intensität der Farbreaktion war proportional zu der IL-8-Konzentration und konnte photometrisch bei einer Wellenlänge von 450 nm bestimmt werden. Anhand einer Standardkurve (200-, 100-, 50-, 25-, 12,5-, 6,3- und 3,1 pg/ml) mit rekombinantem IL-8 wurde die absolute Konzentration ermittelt.

Bio-Plex Cytokine Assay

Der Bio-Plex Cytokine Assay ermöglicht es, innerhalb nur eines Lochs einer 96-Mikrotiter-Lochplatte über 100 Zytokine quantitativ zu detektieren. Er verfügt über farbgekoppelte monoklonale Antikörper, die spezifisch für Zytokine sind. Diese Antikörper sind an Kügelchen gekoppelt und reagieren mit Zytokinen aus Zellkulturüberständen. Der Antigen-Antikörper-Komplex wird von einem biotinyliertem sekundären Antikörper in Mikrotiterplatten detektiert und nach Zugabe von Streptavidin-Phykoerythrin, welches an den sekundären Antikörper bindet, erkannt. Mittels des Bio-Plex Suspensions Array Systems, welches spezifische Reaktionen basierend auf Kügelchen-Farbe und -Fluoreszenz erkennt, wurden die verschiedenen detektierten Zytokine identifiziert und anhand Zytokin-spezifischer Standardreihen quantifiziert.

Präparation der Standardkurve

Alle gesuchten Zytokine waren laut Herstellerangaben im Zytokin-Standard-Stock enthalten und wurden so verdünnt, dass der Standard einen Messbereich von 1,95 – 32000 pg/ml aufwies.

Versuchsablauf

Der Versuch wurde nach Angaben des Herstellers (Bio-Plex Cytokine Assay, BIO-RAD) durchgeführt. Die Zellkulturüberstände wurden unverdünnt mit Antikörper-gekoppelten Kügelchen inkubiert, anschließend gewaschen, dann mit einem biotinyliertem Detektions-Antikörper inkubiert, wiederum gewaschen und abschließend mit Streptavidin-

Phykoerythrozin inkubiert. Die Messung der verschiedenen Zytokine erfolgte mittels einer speziellen Bio-Plex Software, die in der Lage war, die Kügelchen individuell zu betrachten und so die Zytokine separat zu messen. Die Bio-Plex Software kalkulierte die Zytokin-Konzentrationen automatisch anhand der Standardkurven.

Western Blot

Die SDS-Gelelektrophorese dient dazu, das Gesamtprotein einer Zelle oder einzelne Fraktionen von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht aufzutrennen. Die einzelnen Proteine werden dann auf eine Nitrozellulosemembran transferiert und mittels spezifischer Antikörper immundetektiert.

Extraktion des löslichen Gesamtproteins

Die Zellen wurden zunächst zweimal mit eiskaltem Phospho-Proteinwaschpuffer (NaF 100 mM, Na_3VO_4 2 mM, $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ 15 mM) vorsichtig gewaschen. Anschließend wurde der Puffer sorgfältig abgesaugt und die Zellen pro Loch einer 6-Loch-Platte in 30 μl eiskaltem Lysepuffer (10 mM Tris-HCl pH 7,4, 0,25 mM EDTA, 1 mM PMSF, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Antipain, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Leupeptin, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Pepstatin, 1% NP-40, Phospho-Proteinwaschpuffer) abgekratzt und in 1,5 ml Eppendorfgefäße überführt. Die Zellen wurden für ca. 10 min auf Eis lysiert und verbleibende Zellreste anschließend für 5 min bei 4 °C und 25000 x g abzentrifugiert.

Das Pellet wurde verworfen und der Überstand in ein neues 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt.

Proteinbestimmung nach Bradford

Die Proteine wurden mit dem BioRad Protein-Assay (BioRad) nach Bradford quantifiziert, um gleiche Mengen Protein einer jeden Probe aufzutragen. Bei diesem Verfahren wird der Vorteil genutzt, dass der Farbstoff Coomassie Brilliant Blue® sein Absorptionsmaximum von 465 nm zu 595 nm verlagert, wenn er basische und aromatische Aminosäuren bindet.

Bradford-Reagenz wurde im Verhältnis 1:5 mit Wasser versehen und pro Probe 1 ml in 1,5 ml Eppendorfgefäße vorgelegt. Nach Zugabe von 5 μl der jeweiligen Proteinlösung wechselte die Farbe von grünblau zu blau. Zur Messung der Proteinkonzentration wurden die Proben in Küvetten (Cuvettes, Sarstedt) überführt und die Absorption bei 595 nm mittels eines Spektralphotometers gemessen.

Da im Falle einer Histonextraktion keine Proteinbestimmung nach Bradford möglich ist, wurden gleiche Mengen, d.h. 20 µl pro Wert, separat in jeweils eine Geltasche aufgetragen. Zur Größenbestimmung der Proteine wurde ebenso ein Marker (Amersham Rainbow high) aufgetragen.

Poly-Akrylamid-Gel-Elektrophorese

Die Poly-Akrylamid-Gel-Elektrophorese dient der Trennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht. Dabei bindet das anionische Detergenz SDS an das Polypeptidgerüst der Proteine, welche dadurch gemäß ihrer Länge eine negative Ladung bekommen und nach ihrem Molekulargewicht im Gel aufgetrennt werden. Für die Auftrennung der p-38-MAPK, ERK und JNK wurde ein 10%iges Acrylamidgel gegossen, für die Auftrennung der Histone, die ein wesentlich geringeres Molekulargewicht haben, wurde ein Gel mit einem 16%igen Acrylamidgehalt hergestellt.

Protein Blot

Der Protein Blot dient dazu, die aufgetrennten Proteine auf eine Membran zu übertragen, auf der anschließend die Detektion der Antikörper erfolgt.

Das Trenngel wurde nach erfolgreicher Elektrophorese aus der Elektrophoresekammer entnommen und auf eine in Blotpuffer getränkte Hybond-Nitrozellulosemembran (Amersham) aufgelegt. Das Trenngel und die Membran wurden sandwichartig von je zwei puffergetränkten 3 M-Whatman-Filterpapieren (Whatman) und der Blotvorrichtung (Transblot, München) gemäß Herstellerangaben umschlossen. Zum Proteintransfer wurde das Sandwich in eine mit eiskaltem Blotpuffer gefüllte Blotkammer überführt und bei 100 V, 4 °C und maximaler Stromstärke für 1 h geblottet. Dieser Transfer war möglich, weil negativ geladene Proteine zur Anode wandern.

Um den Transfererfolg zu beurteilen, wurde die Membran reversibel mit Ponceau-S gefärbt, anschließend mit Aqua bidest. gewaschen bis das Ponceau-S vollständig entfernt war.

Antikörperexposition

Die Membran wurde zunächst zur Absättigung unspezifischer Bindungen für 1 h bei Raumtemperatur mit Odyssey Licor Biosciences Block-Puffer® (Licor Biosciences, Lincoln, NE, USA) 1:1 mit PBS verdünnt inkubiert. Danach erfolgte die Inkubation mit dem primären Antikörper für 1 h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4 °C.

Der primäre Antikörper war gegen das Zielprotein gerichtet und in Blockpuffer mit 0,1% Tween entsprechend den Herstellerangaben verdünnt. Nach dreimaligem Waschen mit PBS und 0,1% Tween für 5-10 min wurde dann bei Raumtemperatur für 1 h ein dem Detektionsverfahren angepasster sekundärer Antikörper hinzugegeben. Je nach Tierspezies wurde für die Odyssey Licor Biosciences® Detektion ein sekundärer Antikörper verwendet, der entweder an IRDye 800 oder an Cy 5.5 gekoppelt war. Die sekundären Antikörper wurden in der Regel 1:2000 verdünnt eingesetzt.

Detektion

Der an den primären Antikörper gebundene sekundäre Antikörper wurde mit Odyssey Infrared Imaging System® detektiert.

Odyssey Infrared Imaging System

Mit einem speziellen lasergestützten Detektionssystem wurden die am primären Antikörper gebundenen und mit IRDye 800 oder Cy 5.5 markierten sekundären Antikörper detektiert und mit einer entsprechenden Software nach Herstellerangaben bearbeitet. Durch dieses Verfahren konnte sowohl die Proteinbande als auch ihre Intensität bestimmt werden.

3.2.3.2 Methode zum Nachweis von Histonen auf Proteinebene

Western Blot Protein Extraktion für säurelösliche Proteine

Diese spezifische Methode dient insbesondere der Extraktion säurelöslicher Proteine, wie z. B. von Histonen.

Hydrolyse der Zellen

Die Zellen wurden zunächst zweimal mit eiskaltem Phospho-Proteinwaschpuffer (NaF 100 mM, Na₃VO₄ 2 mM, Na₄P₂O₇ 15 mM) vorsichtig gewaschen. Anschließend wurde der Puffer sorgfältig abgesaugt und die Zellen in 400 µl (6-Loch-Platte) bzw. 800 µl (10 cm Schale) eiskaltem Lysepuffer (10 mM HEPES, pH 7,9; 1,5 mM MgCl₂, 10 mM KCl, 1,5 mM PMSF, 0,5 mM DTT) abgekratzt und in 1,5 ml Eppendorfgefäße überführt.

Hydrolyse der Zellkerne

Zur Hydrolyse der Zellkerne wurde H₂SO₄ bis zu einer Endkonzentration von 0,2 M zum Zelllysat hinzugefügt und dieses für 60 min auf Eis stehen gelassen. Anschließend wurde das LySAT für 10 min bei 4 °C und 25000 g abzentrifugiert, der Überstand in ein neues 1,5 ml

Eppendorfgesäß überführt.

Extraktion der Histone

Zur Extraktion der Histone wurde dem Lysat 50%ige Trichloressigsäure bis zu einer Endkonzentration von 20% hinzugefügt und das Lysat für 45 min auf Eis stehen gelassen. Anschließend wurde das Lysat für 10 min bei 4 °C und 25000 g zentrifugiert und der Überstand verworfen.

Lösen des Proteinpellets

Die am Gefäßrand verbleibenden säurelöslichen Proteine wurden durch zweimaliges Waschen in 1 ml Azeton als Pellet sichtbar, wobei die Proteine zweimal für 1 min bei 4 °C und 25000 g zentrifugiert und erneut in Azeton aufgenommen wurden. Schließlich wurde das Pellet in 200 µl Phospho-Proteinwaschpuffer gelöst und mit 50 µl des 4-fach Lämmli-Ladepuffer versetzt. Anschließend erfolgte die Denaturierung der Proteine für 5 min bei 95 °C in einem Heizschüttler (Thermomixer comfort, Eppendorf).

Die Poly-Akrylamid-Gel-Elektrophorese erfolgte entsprechend dem Western Blot Verfahren, siehe Abschnitt „Poly-Akrylamid-Gel-Elektrophorese“. Verwendet wurde ein 16%iges Akrylamidgel.

Der Proteinblot, die Antikörperexposition, die Detektion der Antikörper und das Odyssey Infrared Imaging System erfolgten entsprechend dem Western Blot Verfahren, siehe Abschnitte „Proteinblot, Antikörperexposition, Detektion und Odyssey Infrared Imaging System“.

3.2.3.3 Methode zum Nachweis Antikörper-gebundener DNA

Chromatin-Immunpräzipitation (ChIP)

Die Chromatin-Immunpräzipitation ist eine in situ Technik, die es ermöglicht chromosomale DNA zu untersuchen. Darüber hinaus kann durch diese Methode die Bindung von Transkriptionsfaktoren und nicht-chromosomalen Proteinen an die DNA untersucht werden.

Formaldehyd Vernetzung

Das Zellmedium wurde zunächst abgesaugt und die Zellen für 1 min mit 37%igem Formaldehyd inkubiert. Dieses Verfahren diente dazu, Proteine, die an spezifische Sequenzen der DNA gebunden waren, zu fixieren. Anschließend wurden die Zellen einmal mit eiskaltem 0,125 M Glyzin in PBS gewaschen, dann in PBS abgekratzt und

MATERIAL UND METHODEN

zweimal für 5 min bei 4 °C und 252 x g zentrifugiert und gewaschen. Die Zellen wurden in 2 ml ChIP-Ripa-Puffer (10 mM Tris pH 7,5, 150 mM NaCl, 1% Nonidet P-40, 1% Desoxycholat, 0,1% SDS, 1 mM EDTA, 1% Aprotinin) lysiert.

Aufarbeitung des Zelllysates für die Immunpräzipitation

Das Lysat wurde viermal für 1 min bei 50% Power mit einer Sonde des Sonifikators (Bandelin Sonoplus) auf Eis sonifiziert, um das Chromatin in Fragmente zu schneiden. Anschließend wurden verbleibende Zelltrümmer durch 20-minütiges Zentrifugieren bei 4 °C und 21530 x g als Pellet entfernt und der Überstand zu 250 µl aliquotiert und bei -80 °C aufbewahrt.

Immunpräzipitation des Zielproteins

Je nach Zielprotein wurden verschiedene Antikörper (Polymerase (N-20) und NFκB p65 (C-20) sowie Anti-azetyl-Histon H4 und Anti-phospho(S10)-azetyl(K14)-Histon H3) eingesetzt und entsprechend den Empfehlungen des Herstellers im Lysat verdünnt. Die Antikörper-Inkubation konnte dabei variieren zwischen 1 h und über Nacht bei 4 °C im Drehinkubator (Heidolph REAX2). Anschließend wurde der Antikörper-Proteinkomplex mittels Protein A und G Agarose in 1 h bei 4 °C im Drehinkubator extrahiert. Im Anschluss wurden die Immunkomplexe zweimal mit ChIP-Ripa-Puffer, einmal mit High-Salt-Puffer (2 M NaCl, 10 mM Tris pH 7,5, 1 mM EDTA), erneut einmal mit ChIP-Ripa-Puffer und abschließend einmal mit TE-Puffer (10 mM Tris pH 7,5, 1 mM EDTA) gewaschen. Die Immunkomplexe wurden dann im Heizschüttler (Thermomixer comfort, Eppendorf) bei 30 °C und 1200 rpm in 15 min mit EB-Puffer (TE-Puffer mit 1% SDS) von der Agarose getrennt.

Isolierung der DNA, die mit immunpräzipitierten Proteinen assoziiert ist

Zur Isolierung der DNA, die mit immunpräzipitierten Proteinen assoziiert war, wurden die Immunkomplexe zunächst für 30 min bei 37 °C mit RNase (1 µg/ 20 µl) im Brutschrank und anschließend unter Zugabe von Proteinase K (1 µg/ 8 µl) für mindestens 6 h bei 37 °C und für 6 h bei 65 °C im Thermocycler (Gradient Cyclyer, Biozym) verdaut.

Analyse der isolierten DNA mittels PCR

Die DNA wurde mittels eines PCR Purifikation Kits (Qiagen) extrahiert. Zur Amplifizierung von IL-8- und IFNγ-Promotor-DNA wurde eine Hotstart Taq Polymerase (Qiagen) verwendet. Die PCR Bedingungen waren 95 °C für 15 min (Vordenaturierung), 34-37 Zyklen (je nach Antikörper) bei 94 °C für 20 s (Denaturierung), 60 °C für 20 s (Hybridisierung der Primer),

72 °C für 20 s (Elongation) und 72 °C für 7 min (finale Elongation). Abschließend wurden die PCR Produkte auf 4 °C herabgekühlt.

DNA-Gel-Elektrophorese

Bei einer Gel-Elektrophorese werden Moleküle (Nukleinsäuren oder Proteine) gemäß ihrer Wanderungsgeschwindigkeit in einem elektrischen Feld aufgetrennt, das an eine Gelmatrix angelegt wird.

Die PCR Produkte wurden in einem 2%igem Agarosegel aufgetrennt, welches in horizontale Gelträger gegossen und in spezielle Elektrophoresekammern gegeben wurde. Diese Kammern enthielten 1x TAE als Laufpuffer. Die PCR Produkte wurden mit 5 µl 1x Orange G als Ladepuffer versehen und 15 µl dieses Gemisches pro Probe in die Gelkammern pipettiert. Die Elektrophorese fand bei 100 V und ca. 30 min statt. Zur Visualisierung der DNA-Banden wurde das Gel mit Ethidiumbromid (1:25000 verdünnt) versehen, welches in die DNA-Doppelstränge interkalierte. Durch Anregung mit UV-Licht wurden diese Banden sichtbar und mit dem Fotodokumentationsprogramm Argus X1 V.3 dokumentiert.

Gleiche Mengen von DNA Input wurden ebenfalls über die DNA-Gel-Elektrophorese kontrolliert.

Die folgenden promotorspezifischen Primer wurden verwendet: IL-8 sense 5`-AAG AAA ACT TTC GTC ATA CTC CG-3`, antisense 5`-TGG CTT TTT ATA TCA TCA CCC TAC-3`; IFN γ sense 5`-TGC CTC AAA GAA TCC CAC C-3`, antisense 5`-CAG TAA CAG CCA AGA GAA CC-3`.

Fotographie der DNA-Gel-Elektrophorese

Die Aufnahme der DNA-Gel-Elektrophorese erfolgte mittels Olympus Digital Kamera (Camedia) und dem Fotodokumentationsprogramm Argus X1 V.3.

3.2.4 Mikroskopie

Konfokale Laser Scanning Mikroskopie

Im Gegensatz zur konventionellen Fluoreszenzmikroskopie wird mit Hilfe eines Konfokalen Laser Scanning Mikroskops das Objekt Punkt für Punkt und in einer dünnen Fokusebene, die man schrittweise verschieben kann, aufgenommen. Damit ist eine exakte räumliche

Verteilung und semiquantitative Analyse von Fluoreszenzfarbstoffen bzw. fluorochrommarkierten Antigenen in biologischen Objekten möglich.

Fixierung und Vernetzung der Zellen

Die Fixierung und Vernetzung der HUVEC erfolgte nach zweimaligem waschen mit PBS in 3%igem Paraformaldehyd (PFA) für 20 min.

Färbung der Zellen

Um das Aktin-Zytoskelett der Zellen anzufärben, wurde Phalloidin A488 (Molecular Probes) verwendet. Phalloidin, das Gift des Knollenblätterpilzes, bindet spezifisch an F-Aktin. Der an das Phalloidin gekoppelte Fluoreszenzfarbstoff Alexa-488 wird bei 488 nm angeregt und fluoresziert grün. Die Zellkerne wurden mittels 4'-6'-diamidino-2-phenylindole (DAPI) angefärbt, welches an die DNA bindet. Dieser Farbstoff fluoresziert blau.

Mikroskopie

Die Fluoreszenzbilder wurden mit einem motorisierten Axioskop (Axioskop 2 mot, Objektiv, PlanNeoFluar X 100; NA 1.4), welches mit einer AxioCam MRm Kamera (Zeiss) ausgestattet ist, aufgenommen. Die Kamera verfügt über eine gekühlte Graustufenskalierung. Die digitale Bildausarbeitung erfolgte über die ImageProPlus 5.0 Software (Media Cybernetics). Um höhere Kontraste zwischen der bakteriellen DNA und der F-Aktin-Hülle in Bildüberlagerungen hervorzuheben, wurde für die DAPI-Färbung der rote Kanal gewählt.

3.2.5 Statistische Auswertung

Die gezeigten Daten sind als Mittelwerte +/- der Standardabweichung von mindestens drei unabhängigen Experimenten dargestellt. Für die Abbildungen, die sich infolge eines ELISA bzw. Bio-Plex Cytokine Assays ergaben, wurde ein „One-way ANOVA Test“ verwendet, die Haupteffekte wurden dann untereinander mittels eines „Newman-Keuls`Post Test“ verglichen. Dabei galt ein Wert mit $p < 0,05$ als signifikant.

Im Falle der entstandenen Abbildungen infolge eines Western Blots, einer Histoneextraktion, eines ChIPs oder einer Konfokalen Mikroskopie wurde eine repräsentative Abbildung aus mindestens drei unabhängigen Experimenten gewählt.