

Zelluläre Interaktion: Untersuchungen zur inter- und intraspezies Kommunikation durch Extrazelluläre Vesikel

Medizinische Klinik 1

Der Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Alexander-Universität
Erlangen-Nürnberg

Direktor: Prof. Dr. med. Markus F. Neurath

zur Erlangung des Doktorgrades
Dr. med.

vorgelegt von
Patrick Reichert

**Als Dissertation genehmigt
von der Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Alexander-Universität
Erlangen-Nürnberg**

Tag der mündlichen Prüfung: 10.12.2024

Gutachter/in: Prof. Dr. Claudia Günther
Prof. Dr. Elisabeth Naschberger

Inhaltsverzeichnis

Abstract.....	1
Zusammenfassung.....	3
1. Einleitung.....	5
1.1 Extrazelluläre Vesikel	6
1.1.1 Outer membrane vesicles: Extrazelluläre Vesikel Gram-negativer Bakterien	10
1.2 Intestinale Permeabilität	12
1.3 Darm-Leber-Achse.....	15
1.4 Darm-Hirn-Achse	17
1.5 Zielsetzung	20
2. Material und Methoden	21
2.1 Material	21
2.1.1 Verbrauchs- und Hilfsmaterial	21
2.1.2 Geräte und Maschinen	22
2.1.3 Software.....	24
2.1.4 Chemikalien.....	24
2.1.5 Puffer	26
2.1.6 Primer und PCR-Programme	27
2.1.7 Stimulantien und Medikamente	28
2.1.8 Antikörper und Färbungen	28
2.1.9 Kits	30
2.1.10 Mauslinien	30
2.1.11 Bakterien	31
2.2 Methoden	32
2.2.1 Tierprotokolle.....	32
2.2.2 Färbungen der Kryostat-Schnitte.....	34
2.2.3 Bakterienkultur.....	36
2.2.4 OMV-Isolation.....	37
2.2.5 Genotypisierung.....	39
2.2.6 Proteinanalyse	41
2.2.7 Zellkulturen.....	43
2.2.8 Statistische Analysen	46
3. Ergebnisse.....	47

3.1 Distribution extrazellulärer Vesikel	47
3.1.1 LPS-induzierte Inflammation verändert EV-Aufnahme <i>in-vivo</i>	47
3.1.2 Verschiedene Zelltypen sind an der EV-Kommunikation beteiligt.....	49
3.1.3 Mukosale Entzündung fördert die Vesikeldistribution	50
3.1.4 T-Zellen zeigen in-vitro keine Hinweise auf Aufnahme von epithelialen extrazellulären Vesikeln	53
3.2 Mikroben-Wirt-Interaktionen über Outer membrane vesicles	56
3.2.1 <i>Escherichia coli</i> übertragen mRNA über Outer membrane vesicles.....	56
3.2.2 Verschiedene Darmzellen nehmen OMV auf.....	58
3.2.3 Dynamin I-Inhibitor Dynasore reduziert die OMV-Aufnahme <i>in-vitro</i>	61
3.3 Etablierung einer Isolationsmethode für Outer membrane vesicles von <i>Escherichia coli</i> Bakterien	64
3.3.1 Isolierung der Outer Membrane Vesicles	64
3.3.2 Qualitätskontrolle der isolierten OMV.....	66
4. Diskussion	69
Klinische Relevanz und Aussicht	69
Methodenfindung zur Isolierung Outer Membrane Vesicles	77
Literaturverzeichnis	80
Verzeichnis der bisherigen Veröffentlichungen	90
Abkürzungsverzeichnis.....	91
Abbildungsverzeichnis.....	93
Tabellenverzeichnis	94

Abstract

Background and objectives

The communication among all cells, tissues, and organs is of central importance for homeostasis and life for every organism. Various information transmission pathways have developed over the course of evolution, such as hormones and electrical impulses. Extracellular vesicles, tiny membrane particles, are increasingly recognized as a main part of communication. They are secreted and absorbed by all known life form, unicellular or multicellular, while also transporting substances that occur ubiquitously. These vesicles convey molecules and information in the form of bioactive substances, proteins and enzymes. These can be transmitted within an organism or infect foreign cells, altering them if necessary. The present doctoral thesis deals with the characterisation of host-microbe communication as well as interorgan crosstalk by extracellular vesicles. Moreover, the establishment of a protocol for the isolation of gram-negative bacterial vesicles - outer membrane vesicles - was developed.

Methods

Rosa26.tdTomato mice were used to understand and visualize vesicle translocation. The red fluorescent protein tdTomato is only expressed in the presence of the Cre recombinase protein. This Cre protein is conveyed by extracellular vesicles. With the additional help of antibody-stainings, it can be assessed which cells take up EV and OMV. LPS was used to induce an inflammatory response in the intestine and evaluate the consequences for EV distribution. Organoids, 3D-cultured intestinal epithelial cells that represent the small intestine in vitro, were used to assess how different triggering factors impact the uptake and release of vesicles. A suitable protocol for separating OMV from bacteria was developed. PCR, western blot, and LB agar served as quality control.

Results and observations

Under physiological conditions, communication via extracellular vesicles released by intestinal epithelial cells along the gut-liver and gut-brain axis could be detected. Moreover, interactions of bacterial extracellular vesicles with the gut could be observed. This phenomenon is enhanced upon LPS administration. Organoids showed

tdT positive stem cells when treated with Cre-containing OMVs. Mechanistic studies demonstrate that uptake of OMVs in intestinal epithelial cells occurred via endocytosis. Vesicles obtained by the OMV isolation protocol contained both Cre-mRNA and Cre recombinase in absence of living cells.

Conclusion

There is a continuous communication between intestinal epithelial cells and the liver through extracellular vesicles. Under inflammatory conditions, this interaction is intensified through increased and extended dissemination into peripheral organs. The primary uptake is carried out by immune cells. Microbes are able to introduce genetic information and proteins, protected by OMV, into host cells and thereby affect host cell homeostasis. Stem cells of the intestine are particularly targeted. In this context, new approaches emerge in understanding the role of the microbiome in human health and disease, as well as potential therapy options for chronic inflammatory bowel diseases and autoimmune diseases of the central nervous system. The protocol for isolating OMV established in this doctoral thesis opens up new avenues for therapeutic and diagnostic approaches.

Zusammenfassung

Hintergrund und Ziele

Die Kommunikation aller Zellen, Gewebe und Organe untereinander ist für die Homöostase und Lebenserhaltung eines jeden Organismus von zentraler Bedeutung. So haben sich viele Wege von Informationsübermittlung im Laufe der Evolution entwickelt, wie beispielsweise Hormone oder elektrische Impulse. Extrazelluläre Vesikel, winzige Membranpartikel, nehmen dabei eine ganz besondere Rolle ein. Sie werden von allen uns bisher bekannten Lebensformen, Einzellern wie Mehrzellern, sezerniert und aufgenommen. Dabei übermitteln sie Moleküle und Informationen in Form von bioaktiven Stoffen, Proteinen und Enzymen. Diese können innerhalb eines Organismus transportiert werden, oder speziesfremde Zellen befallen und diese verändern. Die vorliegende Promotionsarbeit beschäftigt sich mit der Charakterisierung der Interaktion zwischen Mikrobe und Wirt, sowie der interorganischen Kommunikation durch extrazelluläre Vesikel. Weiterhin wird die Etablierung eines Protokolls zur Isolierung gram-negativer bakterieller Vesikel, den outer membrane vesicles, beschrieben.

Methode

Um die Vesikeltranslokation nachzuvollziehen und zu visualisieren wurden Rosa26.tdTomato Mäuse eingesetzt. Nur unter der Anwesenheit des Cre-Rekombinase Proteins kommt es zu einer Expression des rot fluoreszierenden Proteins tdTomato. Das Cre-Protein wird dabei über die extrazellulären Vesikel vermittelt. Mit Hilfe weiterer Färbungen über Antikörper, kann dann evaluiert werden, welche Zellen die EV und OMV aufnehmen. LPS wurde verwendet, um eine Entzündungsreaktion im Darm zu provozieren und die Folgen für die EV-Distribution herauszufinden. Dreidimensionale Zellstrukturen, welche das Dünndarmepithel in-vitro nachbilden, wurden genutzt, um festzustellen inwieweit verschiedene Triggerfaktoren die Aufnahme und Abgabe der Vesikel beeinflussen. Entsprechende Isolationsprotokolle wurden etabliert. Die Qualitätskontrolle folgte darauf mit PCR, WesternBlot und LB-Agar zum Beweis der Abwesenheit lebendiger Zellen.

Ergebnisse und Beobachtungen

Unter physiologischen Bedingungen konnte die Kommunikation durch extrazelluläre Vesikel des Dünndarmepithels entlang der Darm-Leber und Darm-Hirn-Achse beobachtet werden. Außerdem zeigten sich Interaktionen zwischen bakteriellen extrazellulären Vesikeln und dem Darm. Dieses Phänomen verstärkt sich unter der Gabe von LPS. Organoide zeigten bei Behandlung mit Cre-haltigen OMV tdT-positive Stammzellen. Mechanistische Experimente zeigen, dass die Aufnahme von OMV in Darmepithelzellen durch Endozytose erfolgt. Die über das während der Forschungsarbeit entwickelte OMV-Isolationsprotokoll gewonnenen Vesikel beinhalten sowohl Cre-mRNA als auch Cre-Rekombinase bei gleichzeitiger Abwesenheit lebender Zellen.

Schlussfolgerung

Es besteht eine kontinuierliche Kommunikation zwischen Darmepithelzellen und der Leber über extrazelluläre Vesikel. Unter entzündlichen Bedingungen wird diese Interaktion sowohl über eine erhöhte als auch eine erweiterte Streuung in periphere Organe verstärkt. Primär erfolgt die Aufnahme durch Immunzellen. Mikroorganismen können genetische Informationen und Proteine, geschützt durch OMV, in Wirtszellen einführen und dadurch die Homöostase dieser Zellen beeinflussen. Dabei sind besonders die Stammzellen des Darms das Ziel. In diesem Zusammenhang ergeben sich neue Ansätze im Verständnis der Rolle des Mikrobioms für die Gesundheit und Krankheit des Menschen, sowie möglicherweise Therapieoptionen für chronisch entzündliche Darmerkrankungen und Autoimmunerkrankungen des zentralen Nervensystems. Die Etablierung des Protokolls zur Isolation der OMV im Rahmen dieser Doktorarbeit eröffnet neue Möglichkeiten für therapeutische und diagnostische Ansätze.

1. Einleitung

In hochentwickelten biologischen Organismen ist für die Aufrechterhaltung des Lebens eine ständige Interaktion zwischen Zellen, Geweben und Organen notwendig. Nur durch eine abgestimmte Zusammenarbeit ist eine das Überleben sichernde Reaktion auf äußere Umwelteinflüsse möglich. Dies umfasst nicht nur ein adäquates Verhalten gegenüber anderen Organismen, wie potenziellen Partnern oder Feinden, sondern auch eine geeignete Immunantwort auf pathogene Keime. Im Laufe der Evolution haben sich daraus viele Möglichkeiten entwickelt, welche die Kommunikation zwischen allen Systemen des immer größer und komplexer werdenden Lebewesens sicherte. So können besonders kleine Strecken über Zell-zu-Zell Kontakte überwunden werden, große Distanzen wiederum über das endokrine System mit Hilfe des Blutkreislaufes und Hormonen sowie Zytokinen. Auch das Nervensystem, welches mit elektrischen Impulsen Informationen blitzschnell an alle Stellen des Körpers übermitteln kann, bildet die Basis der Physiologie des Menschen und anderer Tiere (Faber & Pereda 2018). In den letzten Jahren etablierte sich ein weiterer Prozess, welcher eine zentrale Rolle in der Informationsübermittlung spielt. Neben der Freisetzung einzelner Faktoren, wie den Zytokinen, sind Zellen in der Lage kleine Partikel freizusetzen, die mehrere biologisch aktive Stoffe beinhalten (Maci et. al. 2019). Diese Partikel, extrazelluläre Vesikel (EV), können von jeder Zelle freigesetzt und aufgenommen werden. Dies gilt sowohl für Pro- als auch Eukaryoten (Tsatsaronis et. al. 2018). Durch diese Universalität bieten EV ein mögliches Erklärungsmodell für systemische Auswirkungen bei lokalen entzündlichen, autoimmunen und anderen pathologischen Prozessen, durch körpereigene oder über Keime vermittelte Erkrankungen (Maci et. al. 2019).

1.1 Extrazelluläre Vesikel

Extrazelluläre Vesikel sind kleine mit einer Phospholipid-Doppelmembran umschlossene Kugeln, welche von verschiedensten Zelltypen freigesetzt werden können. Dabei werden sie von einer Zelle in die Extrazellularumgebung abgegeben (Doyle & Wang 2019). Ihre Größe umfasst eine Spannbreite von 20 bis 1000 nm. Prinzipiell sind drei Mechanismen bekannt, wie extrazelluläre Vesikel entstehen.

Die kleinsten extrazellulären Vesikel entstehen mit Hilfe der sogenannten MVB, multivesikuläre Körper. Die MVB entstehen bei der Aufnahme von extrazellulären Stoffen in die Zelle, der Endozytose. Dabei wird die zelleigene Membran eingestülpt (Abb.1 - 1), bis eine abgeschlossene Kugel (Abb. 1 - 2) sich im Lumen der Zelle befindet. Die daraus entstehenden MVB können wiederum mit gleichzeitiger Aufnahme von verschiedensten Stoffen der Intrazellulärmatrix durch Einstülpung weitere, kleinere Vesikel im Lumen der MVB formen (Abb. 1 - 3). Die daraus entstehenden Vesikel werden Exosomen genannt und sind 20 bis 150 nm groß (Chitti et. al. 2018). Der Inhalt dieser Exosomen ist jedoch nicht zufällig. Multiproteinkomplexe, die ESCRT-Proteine (Endosomal Sorting Complex Required for Transport), sorgen für den Ein- und Ausschluss von biologisch aktiven Molekülen. Über diesen Sortiermechanismus können dabei auch Proteine und Fette innerhalb der Exosomenmembran beeinflusst werden (Zhang et. al. 2019). Auf diesem Weg können die Exosomen so manipuliert werden, dass sie mit spezifischen Rezeptoren der jeweiligen Empfängerzellen reagieren. Verschiedene Zelltypen nehmen daher die Exosomen häufiger, oder weniger häufig auf. Um schließlich die Exosomen in die Extrazellulärmatrix abzugeben, vereinigt sich die Membran der MVB mit der äußeren Membran der Zelle und das Lumen wird freigesetzt (Abb. 1 - 5) (Cocucci et. al. 2009).

Größere extrazelluläre Vesikel wie Ektosomen werden über ein anderes System freigesetzt. Hierbei werden die Vesikel direkt an der äußeren Zellmembran gebildet. Der Inhalt stülpt sich nach außen gegen die Phospholipid-Doppelmembran und sorgt für die Bildung pilzförmiger Auswüchse. Schließlich wächst die Zellmembran hinter dem Vesikel wieder zusammen und das entstehende EV wird an die Extrazellulärmatrix abgegeben (Chitti et. al. 2018). In prokaryotischen Zellen ist dies der Einzige Weg, durch den EV gebildet werden können. Die Bildung über den Endozytose-Weg ist eukaryotischen Zellen vorbehalten (Tsatsaronis et. al. 2018).

Schließlich können extrazelluläre Vesikel auch während des Sterbeprozesses einer Zelle gebildet werden, wie beim programmierten Zelltod, der Apoptose. Dies ist ein natürlicher Vorgang, um die Lebensfähigkeit des gesamten Organismus zu gewährleisten. Die Gründe dafür sind vielfältig. So ist die Apoptose beispielsweise bei der Embryonalentwicklung unumgänglich, schützt vor genetisch veränderten Zellen und Autoimmunerkrankungen, oder um alte Zellen durch jüngere zu ersetzen (Elmore 2007). Um den unkontrollierten Austritt einer sterbenden Zelle in die Umgebung zu verhindern, bricht die Zelle in viele Einzelteile zusammen. Diese kleinen Teile können dann von umgebenden Zellen phagozytiert und abgebaut werden (D'Arcy 2019). Während dieses Prozesses können besonders kleine Vesikel entstehen. Eine genaue Klassifikation der entstehenden Teilchen ist nach derzeitigem Forschungsstand umstritten. Eine mögliche Klassifizierung der Partikel stellt ihre Größenordnung dar. Partikel mit einem Durchmesser von 1000 bis 5000 nm werden als Apoptosekörper identifiziert. Kleiner dimensionierte Vesikel werden als Mikrovesikel oder exosomenähnliche extrazelluläre Vesikel bezeichnet. Durch die fehlende Klassifikation ist jedoch unklar, welche Funktionen die unterschiedlichen Vesikel einnehmen und ob Exosomen-ähnliche EV ihrem Aufbau, Ladung und Funktion klassischen EV tatsächlich ähnlich sind (Li et. al. 2020).

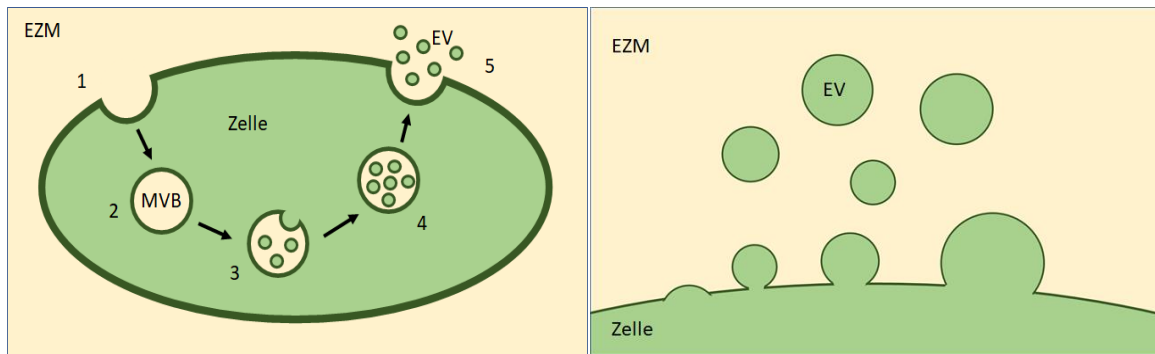


Abbildung 1: Entstehung extrazellulärer Vesikel

Extrazelluläre Vesikel können auf verschiedene Arten von Zellen abgegeben werden. Links erkennbar, können sich bei Einstülpung der Zellmembran (1) sogenannte Multivesicular bodies formen (2). Über erneute Einstülpung der Membran entstehen Vesikel innerhalb des MVB (3). Der Inhalt wird dabei über ESCRT-Proteine bestimmt. Bei Exozytose der fertigen EV (4), verschmelzen die äußeren Membranen und die Vesikel werden an die Extrazellulärmatrix abgegeben (5). Der Weg rechts zeigt, wie sich Vesikel über die Ausstülpung von Zellmatrix formen.

Die Ladung der EV ist dabei ebenso individuell wie die Zellen, die sie produzieren. Grundsätzlich beinhalten sie biologische Stoffe wie Lipide, Proteine, mRNA, miRNA, DNA, Signalmoleküle, aber auch Nährstoffe und Metabolite (Tsatsaronis et. al. 2018). Studien konnten zeigen, dass die Ladung der EV nicht zwangsläufig mit der Molekülzusammensetzung der Mutterzelle übereinstimmt. Dies weist darauf hin, dass es aktive Sortiermechanismen geben muss, welche die Inhalte der EV beeinflussen. Dazu gehören die oben genannten ESCRT-Proteine (Anand et. al. 2019). Unter anderem ist dabei der Zustand der Zelle ein Einflussfaktor auf die resultierenden EV. Die veränderte Zusammensetzung wiederum kann andere Wirkungen in der Zielzelle hervorrufen. So zeigte eine Studie, dass EV von Zellen der Lunge nach Exposition auf Toxine eine proinflammatorische Wirkung auf die Empfängerzellen hatten (Andres et. al. 2020).

Die Aufnahme von extrazellulären Vesikeln in eukaryotischen Zellen erfolgt über zwei Wege. Diese ähneln zu großen Teilen den Prinzipien für die EV-Abgabe. Zum einen kann die Zelle die EV aus der Extrazellulärmatrix über den Endozytoseweg aufnehmen. Wenn die EV sich der Zelle nähern, interagieren verschiedene Proteine und Lipide auf der Oberfläche der Zellmembran mit denen der EV. Damit wird die Endozytose eingeleitet. Die äußere Membran der Zelle stülpt sich nach innen, um ein Lumen für die Partikel zu bilden. Hierfür ist vor allem das Protein Clathrin

verantwortlich. In der frühen Invaginationsphase sammelt sich das Clathrin um die innere Zellmembran und sorgt so für eine Formung zu einer Kugel in der späten Invaginationsphase (Ferguson & Camilli 2012). Schließlich sammelt sich Dynamin an der Bindungsstelle und löst den Vesikel von der Zellmembran ab. Dieser ist nun im Inneren der Zelle frei beweglich (Preta et. al. 2015). Durch die Verschmelzung mit den Endosomen können die Inhalte der EV in das Zellinnere abgegeben werden. Wie genau die EV dabei den Abbauweg über Lysosome entkommen und ihr Inhalt unbeschadet abgeben, ist noch nicht abschließend geklärt (Verdera et. al. 2017). Ein weiterer Weg der EV-Aufnahme ist die direkte Verschmelzung der EV-Membran mit der Zellmembran. Auf diesem Weg wird der Inhalt gleich in das Zellinnere abgegeben. Wenn sich dann die Proteine, Signalmoleküle, Kohlenhydrate oder das genetische Material wie mRNA und DNA in der Zelle befinden, können sie hier ihre Wirkung entfalten (Tsatsaronis et. al. 2018).

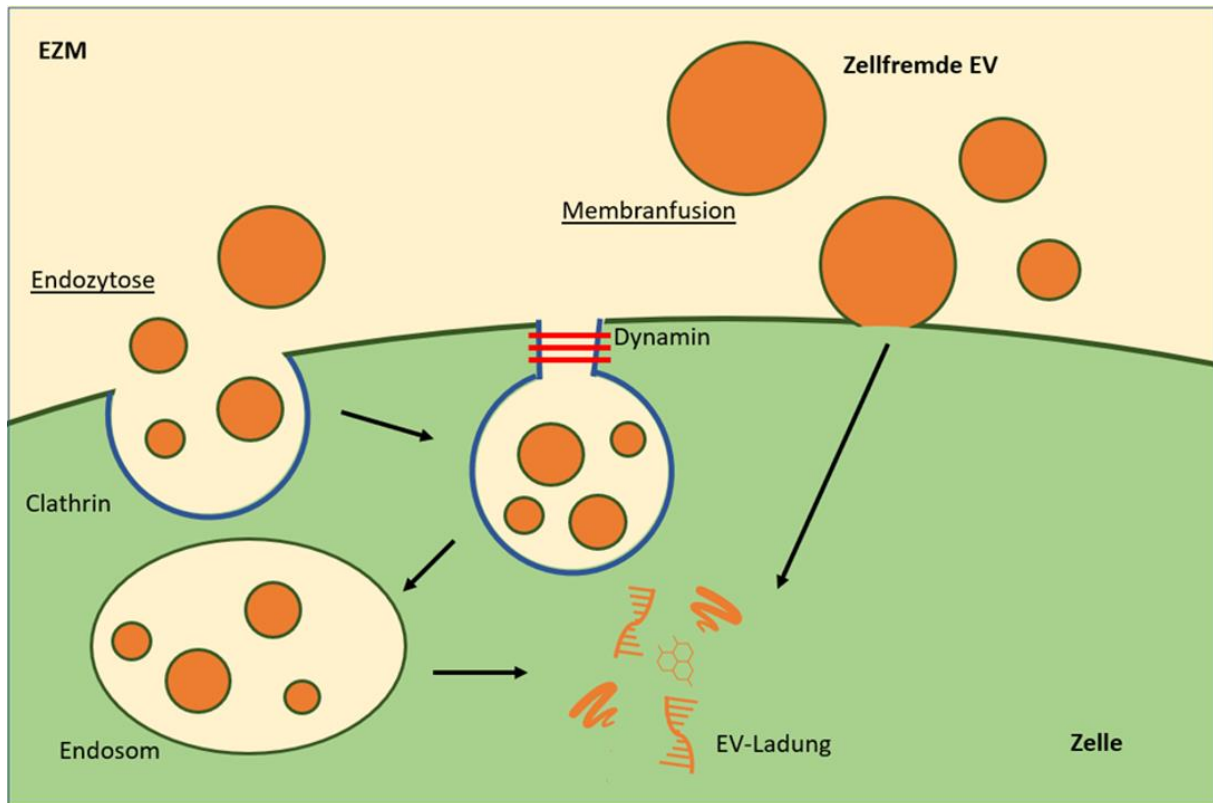


Abbildung 2: Aufnahme von zellfremden extrazellulären Vesikeln

Generell existieren zwei Möglichkeiten der Vesikelaufnahme. Zum einen kann die Membran der Vesikel mit der Membran von Zellen verschmelzen und so den Inhalt direkt in die Zelle abgegeben (rechts). Dieser Prozess nutzt die sogenannte Membranfusion. Zum anderen kann die Aufnahme auch über die Endozytose stattfinden. Hierfür bilden sich nach der Kopplung von Proteinen an der Außenseite der Vesikelmembran mit Rezeptoren der Zelle eine Clathrin-Schicht, welche zur Einstülpung der Zellmembran führt. Über Dynamin wird dieser Vorgang abgeschlossen, sodass ein Endosom entsteht. Dieses Endosom kann über eine weitere Verschmelzung mit den EV die Ladung an die Zellmatrix abgeben.

1.1.1 Outer membrane vesicles: Extrazelluläre Vesikel Gram-negativer Bakterien

Wie die Zellen eines einzelnen Organismus untereinander Informationen und Stoffe austauschen, können auch Einzeller über diese Form der Kommunikation agieren. Es ist schon länger bekannt, dass antibiotikaresistente Keime Resistenzgene über EV an Artgenossen weitergeben (Yaron et. al. 2000). Wie Eukaryoten setzen Bakterien extrazelluläre Vesikel an ihre Umgebung frei, um fremde Zellen zu beeinflussen. Die EV werden wiederum von Einzellern und Mehrzellern aufgenommen. Beim Menschen befinden sich die meisten Bakterien und somit deren EV im Verdauungstrakt. Hier leben Milliarden von Einzellern, dem sogenannten Mikrobiom, wo sie Nährstoffe

bereitstellen, Vitamine synthetisieren und bei den Verdauungsprozessen unterstützen (Zhang et. al. 2015). Diese Symbiose nimmt einen großen Stellenwert in der Gesundheit des Individuums ein. Innerhalb dieses Zusammenlebens beeinflussen sich Wirt und Bakterien gegenseitig. (Aidy et. al. 2013). Häufig findet das auf Ebene des direkten Kontaktes statt, wie beispielsweise durch Sekretionssysteme (Green & Mecsas 2016). Durch die Freisetzung von Metaboliten, Toxinen und bakteriellen extrazellulären Vesikeln können Bakterien die Wirtszellen ohne direkten Kontakt modulieren (Ellis & Kuehn 2010). Von besonderem Interesse für diese Arbeit waren dabei die extrazellulären Vesikel Gram-negativer Bakterien, die Outer membrane vesicles. Sie dienen dabei als Transportsysteme um bioaktive Stoffe vor Abbauprozessen zu schützen und gleichzeitig über lange Strecken zu befördern. Die OMV werden dabei von pathogenen und kommensalen Bakterien als physiologischer Prozess ihres Wachstums hergestellt. Äußere Faktoren, wie beispielsweise Stress durch antibakterielle Stoffe, Nährstoffmangel, oder die Reaktion auf das Immunsystem des Wirtes können diese Produktion beeinflussen. (Mozaheb & Mingeot-Leclercq 2020). Die Vesikel sind ähnlich wie die der Eukaryoten kleine, runde Strukturen mit einer Größe von 20 bis 250 nm. Obwohl ihr Aufbau und Inhalt abhängig von der Mutterzelle sowie den Umständen ihrer Herstellung sehr unterschiedlich sein kann, bestehen sie zum Großteil aus Proteinen der äußeren Zellmembran wie Lipopolysacchariden (LPS) und Phospholipiden. Diese können wiederum periplasmatische Proteine und Peptidoglykane sowie teilweise geringe Mengen an zytoplasmatischen Proteinen, DNA und RNA beinhalten (Libardo et al. 2023). Wegen ebendieser Vielfältigkeit nehmen die Vesikel unterschiedliche Funktionen ein. Sie beeinflussen damit maßgeblich die Aufrechterhaltung der Gewebemöostase und Immunregulation. Es wurden bereits verschiedene Vesikel identifiziert, die einen positiven oder negativen Einfluss auf den Wirt und die Epithelintegrität des Darms nehmen (Tiwari et al. 2017). Pathogene Keime sind so beispielsweise in der Lage die Entstehung lokaler Syndrome wie Morbus Crohn oder Colitis Ulcerosa zu fördern (Caruso et. al. 2020). Ist das Darmepithel vorgeschädigt können die OMV aus dem Darm in die Blutbahn gelangen und dadurch in periphere Organe streuen (Muraca et. al. 2015). Die Klassifikation der Verteilung sowie das Verständnis dafür, wie und wann OMV in der Lage sind die Darmschleimhaut zu überwinden ist daher von großem Interesse um deren Einfluss auf Krankheit und Gesundheit besser zuordnen und gegebenenfalls modulieren zu können.

1.2 Intestinale Permeabilität

Ähnlich wie die Haut von außen, steht das Lumen des Verdauungstraktes von innen in direkter Verbindung mit der Außenwelt. Dies ist zum einen notwendig, um Energie und Nährstoffe in Form von Nahrung und Wasser dem Körper zuzuführen. Jedoch birgt es auch viele Risiken aufgrund von Toxinen, Viren und Bakterien, welche den Organismus potenziell schädigen können. Physiologischerweise muss der Verdauungstrakt daher in der Lage sein, als selektiver Filter zu agieren (Schoultz & Keita 2020). Die Darmwand zu durchbrechen ist dabei auf zwei verschiedenen Arten möglich. Entweder über den parazellulären oder dem transzellulären Transport. Der parazelluläre Transport beschreibt einen Vorgang, bei dem die Stoffe zwischen den Epithelzellen hindurch gehen. Beim transzellulären Transport werden die Stoffe von der apikalen Seite der Epithelzelle aufgenommen und auf der basalen Seite wieder abgegeben. Dieser Vorgang wird auch Transzytose genannt (Turner 2009).

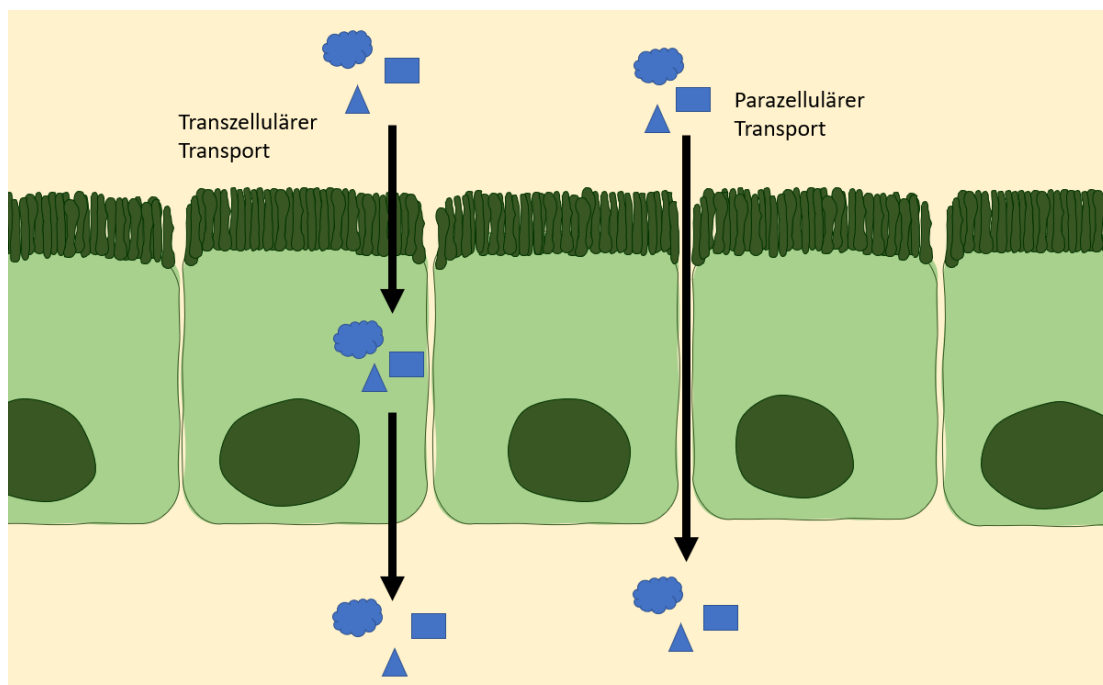


Abbildung 3: Transzellulärer und Parazellulärer Transport

Damit verschiedene Stoffe (blau) ein Epithelgewebe, bestehend aus mehreren Epithelzellen (grün) passieren können, stehen zwei Wege zur Verfügung. Der Transzelluläre Transport beschreibt die Aufnahme von Stoffen in eine Zelle (Endozytose) von einer Seite, beispielsweise wie in der Abbildung luminal, mit einer anschließenden Abgabe des Stoffes (Exozytose) auf der anderen Seite (Transzytose, links). Beim Parazellulären Transport diffundieren die Stoffe neben zwei Zellen hindurch (rechts).

Um ein Eindringen von unerwünschten Stoffen und Pathogenen zu verhindern, sind vielzählige anatomische Strukturen notwendig, um beide Wege zu schützen. Die erste Schutzschicht des Epithels bilden die sogenannten Muzine. Muzine sind Biopolymere, welche von spezialisierten Zellen gebildet werden und zusammen mit Wasser eine gelartige Masse bilden. Im Darm sind vor allem Becherzellen an der Sekretion der Muzin-Polysaccharide beteiligt. Die daraus entstehende Schleimschicht, welche die gesamte Mukosa des Darms abdeckt, verhindert ein Durchdringen von großen Stoffen und den meisten Bakterien (Turner 2009). Weiterhin werden antimikrobielle Proteine, die Defensine, von den Paneth-Zellen sekretiert (Salzman et al. 2007). Darunter folgt die Epithelschicht. Nur die wenigsten Stoffe können diese dichte Zellschicht durchdringen. Daher tragen die Zellen Transporter im apikalen Bereich, um die Aufnahme und Transzytose von gewünschten Stoffen zu ermöglichen. Zur Absicherung vor einem ungewollten parazellulären Transport haften benachbarte Zellen mit einer Vielzahl an Proteinen und Proteinkomplexen aneinander. Die tight-junctions verhindern den Großteil ungewollter Diffusion. Weiter basal sorgen Cadherine und Desmosomen zu einem stärkeren Verbund und tragen zur Strukturstabilität bei. Für die Haftung der Epithelzellen an der Basalmembran sorgen die Hemidesmosomen (Tripathi et. al. 2018). Um die Integrität der Darmbarriere zu bewahren, müssen alle Komponenten intakt sein. Chronisch entzündliche Darmerkrankungen wie Morbus Crohn und Colitis Ulcerosa bedingen eine Störung der Komponenten und damit eine schlechtere Barrierefunktion (Forbes et. al. 2016). Als Resultat können Mikroorganismen und andere schädliche Stoffe leichter in das subepitheliale Gewebe vordringen. Die daraus folgende Immunreaktion führt zu einer stärkeren Entzündungsreaktion, die die Barriere weiter schädigt. Die Erreger sind dann in der Lage, in den Blutkreislauf zu translozieren. Die Folge sind systemische Entzündungen und schwere Organschäden (Tripathi et. al. 2018).

Neben dieser mechanischen Barriere dient das intestinale Immunsystem als weiterer Schutz vor Eindringen fremder Lebensformen, wie Bakterien und Pilzen, aber auch Viren und Nahrungsantigenen. Dieses darmassoziierte lymphatische Gewebe, oder GALT, befindet sich im gesamten Verdauungstrakt der Lamina propria. Insbesondere Lymphozyten, vereinzelte Lymphfollikel oder Follikelaggregate, die Peyer-Plaques, bilden das Abwehrsystem des Darms. Die erste Kontaktstelle mit Fremdkörpern des Darmlumens bilden hingegen die Darmzotten. Die feinen Ausläufer vergrößern die

Darmlumen, um Nahrungsbestandteile effizienter aufzunehmen. Gleichzeitig entsteht so ein größeres Potenzial für Schadstoffe das Organ zu penetrieren. Daher ist es mit einer Vielzahl an Immunzellen ausgestattet, unter anderem dendritische Zellen, T-Lymphozyten, B-Lymphozyten, Granulozyten und Makrophagen (Mowat & Agace 2014; Hou et al. 2021).

Neben den bereits erwähnten chronischen Entzündungen im Darm, können auch eine westliche Ernährung, also besonders fett- und zuckerreich (Agus et. al. 2016), oder Alkoholmissbrauch die Darmpermeabilität verringern (Wang et. al. 2014). Weiterhin haben verschiedene Mikroben unterschiedlichen Einfluss auf die Integrität der Darmbarriere. In Studien wurde das Darmlumen mit *Akkermansia muciniphila* angereichert. Das Ergebnis war eine verstärkte Darmbarriere (Everard et. al. 2013). Bei einer zu langen Einnahme von oralen Antibiotika, kann eine Infektion mit *Clostridium difficile* provoziert werden (Mullish, Williams 2018). Die Toxine der *C. difficile* Spezies können das Darmepithel angreifen. Dies resultiert in einer herabgesetzten Barrierefunktion (Fletcher et. al. 2021). Weiterführend ist nicht abschließend geklärt, in welchem Ausmaß die Bakterien selbst, oder ihre Vesikel Einfluss auf den Wirt nehmen. Eine Studie konnte zeigen, dass ein *Escherichia coli* Stamm über dessen OMV unterstützend auf die Hochregulation von Tight junction, sowie antimikrobiell aktiven Proteinen wirkte. Damit war der Darm besser vor dem Eindringen verschiedenster Pathogene geschützt (Alvarez et al. 2019).

Um die Einflüsse verschiedener Zustände der Darmbarriere in einem experimentellen Modell an der Maus zu testen, ist es möglich, die Permeabilität künstlich zu beeinflussen. Hierfür hat sich die Verabreichung von LPS etabliert. LPS, also Lipopolysaccharide, sind Membranbestandteile von Gram-negativen Bakterien. Das Immunsystem ist in der Lage, diese Moleküle über den toll-like-receptor 4 zu erkennen und über eine Zytokinkaskade Entzündungsreaktionen zu aktivieren (Rhee 2014). Obwohl LPS physiologischerweise im Darmlumen vorkommt, führt eine pathologische Konzentration zur akuten Entzündungsreaktion im Darm. Das LPS wird dafür intraperitoneal in die Maus injiziert. Dies resultiert in Apoptose, vermehrten Zellshedding, starken Entzündungsreaktionen und schließlich zu einem Verlust der physiologischen Darmbarriere (Günther et al. 2015).

1.3 Darm-Leber-Achse

Um die physiologische Homöostase eines Organismus aufrechtzuerhalten, ist eine kontinuierliche Energiezufuhr von essenzieller Bedeutung. Im Tierreich erfolgt diese Energieaufnahme primär durch den Konsum von Pflanzen oder anderen Tieren. Der Verdauungstrakt fungiert dabei als entscheidendes Organ, das den aufgenommenen Nahrungsbrei verarbeitet. Die in der Nahrung enthaltenen Nährstoffe werden extrahiert und für die Aufnahme über den Darm vorbereitet. Diese werden dann vom Darmlumen über die Epithelzellen mit dem Blut in den systemischen Kreislauf gebracht. Die Mesenterialvenen, welche vom Darm in die Peripherie ziehen, treffen dabei in der Pfortader zusammen und führen direkt zur Leber. Die Leber ist damit das erste Organ, welches auf die aus dem Darm resorbierten Stoffe trifft. Damit nimmt sie eine zentrale Rolle in der Kommunikation des Darms mit dem gesamten Organismus ein und übernimmt vielfältige Funktionen (Juza & Pauli 2014). Neben der Verstoffwechslung der aufgenommenen Nahrungsbestandteile, dient die Leber als Speicher von Vitaminen und Glykogen. Weiterhin werden lebensnotwendige Stoffe in die Peripherie gegeben, unnötige und giftige Stoffe wiederum entfernt. Insbesondere ist hierbei der enterohepatische Kreislauf für die Aufrechterhaltung der Homöostase von Bedeutung. Die über die Pfortader ankommenden Stoffe werden über eine Vielzahl an verschiedenen Enzymen gespalten, verändert und abgebaut. Dabei können im Rahmen der Biotransformation aus lipophilen und apolaren Fremdstoffen hydrophile und polare Abfallprodukte entstehen, die dann vereinfacht über den Harn oder die Galle ausgeschieden werden. Die entstehende Galle wird über Gallengänge in die Gallenblase transportiert, dort gespeichert und bei Bedarf in das Duodenum wieder abgegeben (Cai & Chen 2014). Einige Bestandteile der Galle helfen bei der Aufnahme von Nährstoffen, sodass diese erneut in das Blut aufgenommen und in die Leber transportiert werden. Dieses enge Zusammenspiel zwischen Darm und Leber resultiert in einer großen Abhängigkeit voneinander. Der Darm beeinflusst durch die Kost, dem Mikrobiota und der Integrität der Darmschleimhaut die Zusammensetzung des Blutes, welches in der Leber ankommt. Gleichzeitig kann aber auch eine pathologische Zusammensetzung der Gallenflüssigkeit die sensible Homöostase im Darmlumen stören (Stärkel & Schnabel 2016). Studien konnten zeigen, dass eine gestörte Darmpermeabilität oder bakterielle Dünndarmfehlbesiedlung zu vermehrten Erkrankungen der Leber, wie beispielsweise Zirrhose führen (Ghosh & Jesudian

2018). Weiterhin ist bekannt, dass OMV in der Lage sind, Toxine und Virulenzfaktoren zu tragen und in den Wirt einzuschleusen (Jones et al. 2020). Damit ist nicht auszuschließen, dass nicht nur die Mikroben selbst Leberschäden hervorrufen können, sondern vielmehr die von ihnen stammenden extrazellulären Vesikel. Daher müssen weitere Untersuchungen zur Kommunikation über OMV angestellt werden. Fokus sollte dabei sein, unter welchen Umständen OMV in die Leber eindringen, welche Zellen sie präferiert penetrieren und ob biologisch aktive Stoffe übertragen werden können. Diese Forschung wurde in der vorliegenden Doktorarbeit unternommen.

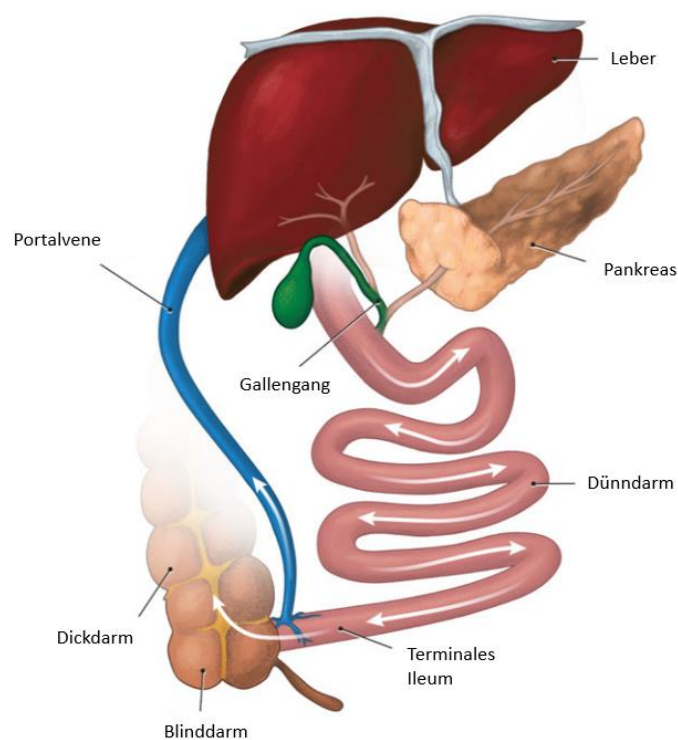


Abbildung 4: Der Enterohepatische Kreislauf (Ahmed, M. 2022)

Die aus dem Darm aufgenommenen Nährstoffe werden über das portalvenöse System mit dem Blut in die Hepatozyten der Leber transportiert und über eine Vielzahl an Enzymen gespalten, verändert und abgebaut. Dabei anfallende Abfallprodukte können über die Galle ausgeschieden werden. Diese wird über die Gallengänge in die Gallenblase geleitet und bei Bedarf über den Hauptgallengang in das Duodenum abgegeben. Hier unterstützt sie bei der Nahrungsresorption, sodass ein Teil der Galle im terminalen Ileum wieder aufgenommen und erneut zur Leber transportiert wird. (Ahmed, M. 2022)

1.4 Darm-Hirn-Achse

Um die Komplexität der Arbeitsabläufe des Verdauungstraktes besser steuern zu können, hat der Verdauungstrakt im menschlichen Körper das enterische Nervensystem entwickelt, welches unabhängig vom zentralen Nervensystem arbeitet. Der Darm ist so in der Lage, Bewegungsimpulse für den Transport der Nahrungsbestandteile völlig unabhängig von Gehirn und Rückenmark zu koordinieren (Spencer & Hu 2020). Hierfür benötigt er den Plexus myentericus, auch Auerbach-Plexus genannt. Die Ganglien liegen dabei eng mit Nervenfasern verbunden zwischen den beiden Muskelschichten, bestehend aus dem inneren Stratum circulare und dem äußeren Stratum longitudinale. Diese beiden Muskelschichten, die in ihrer Gesamtheit für die Motilität des Verdauungstraktes verantwortlich sind, werden zur sogenannten Tunica muscularis zusammengefasst. Bei Scher- und Dehnungsreizen im Darmlumen, verursacht durch den Nahrungsbrei, werden reflektorisch oral liegende Darmabschnitte kontrahiert, aboral erschlafft (Furness 2012). Dies ist vor allem deshalb möglich, weil die glatten Muskelzellen nicht wie Skelettmuskelzellen ausschließlich von exzitatorischen (Allard 2018), sondern auch von inhibitorischen Motorneuronen innerviert werden (Wood 2000). Neben dem Plexus myentericus arbeitet auch der Plexus submucosus, oder Meissner-Plexus, autonom an der Innervation des Darms. Diese Ganglien liegen in der Tela submucosa, also zwischen der Schleimhaut und der Muscularis. Das Aufgabengebiet des Plexus submucosus umfasst dabei die Regulation von Sekretion aus Drüsen, Durchblutung und Absorption (Furness 2012).

Als Darm-Hirn-Achse wird die Kommunikation benannt, die zwischen dem enterischen und dem zentralen Nervensystem stattfindet. Dieser Austausch an Informationen findet dabei bidirektional statt. Über eine Vielzahl an Wegen, Nerven, Signal- und Botenmoleküle wie Hormone, zellulär und immunologisch, beeinflusst der Darm die Hirnfunktion und emotionale wie kognitive Hirnzentren beeinflussen die Darmfunktion (Carabotti et al. 2015). Weiterhin weisen aktuelle Studien darauf hin, dass ebendieses Zusammenspiel eine bedeutende Rolle in der Pathogenese von chronisch entzündlichen Darm- und Hirnerkrankungen, sowie degenerativen Hirnerkrankungen einnimmt (Günther et al. 2021).

Innerhalb dieser Kommunikationsebene nimmt als Teil der Symbiose das Mikrobiom des Darms eine zentrale Rolle ein. Das Mikrobiom ist die Gesamtheit der Mikroorganismen im tierischen und menschlichen Verdauungstrakt. Überwiegend besteht es aus Bakterien, Pilzen, Parasiten und Viren, sowie ihren Genen und Stoffwechselprodukten (Al Bander et al. 2020). Über endokrine, nervale, aber auch immunmodulierende Wege können beide Parteien, Gehirn und Mikroben, Einfluss aufeinander nehmen. Dies nennt man Mikrobiom-Hirn-Achse. (Carabotti et al. 2015). Die Darmbakterien sind im Rahmen der angebotenen Nährstoffe vollständig abhängig von ihrem Wirt. Dieser kann basierend auf dem Appetit und der daraus folgenden Aufnahme von Nahrungsmitteln direkten Einfluss auf die Lebensumstände der Mikroben nehmen. So finden sich bei unterschiedlichen Ernährungsformen auch eine unterschiedliche Zusammensetzung an der Artenvielfalt des Mikrobioms (Hills Jr. et al. 2019). Andererseits können auch die Bakterien in Abhängigkeit von ihrem Wachstumszyklus Einfluss auf das Sättigungsgefühl und das Appetitzentrum im Hypothalamus nehmen (Fetissov 2017). Diese Verhaltensmodulation kann in andere Lebensaspekte fortgeführt werden. Mehrere Studien zeigen, dass das Mikrobiom des Darms einen Einfluss auf die Entwicklung des Gehirns bei der Myelinisierung, synaptischen Plastizität, Neurogenese, Wachstum dendritischer Zellen, Blut-Hirn-Schranke und der Gehirn-eigenen Makrophagen, der Mikroglia nimmt. Es ist bekannt, dass kleine Moleküle und aktive Stoffe von Mikroben im Kreislauf von Menschen und Tieren auftreten, welche diese Entwicklung verursachen könnten. Dennoch ist nicht abschließend geklärt, inwieweit welche Fremdstoffe welchen Einfluss auf das zentrale Nervensystem nehmen (Schächtle & Rosshart 2021).

Neben den bereits genannten physiologischen Veränderungen, die von dem Mikrobiom des Darms ausgehen, können Mikroben auch Erkrankungen des zentralen Nervensystems verursachen. Die Multiple Sklerose ist eine der häufigsten chronischen Erkrankungen des Gehirns bei jungen Erwachsenen (Dobson & Giovannoni 2019). Autoreaktive periphere Immunzellen, insbesondere T-Zellen, sorgen für herdförmige Läsionen mit Demyelinisierung von Nervenfasern und Axonen. Die Ursachen sind vielzählig und nicht abschließend geklärt. In der Forschung zeigen sich jedoch vermehrt Hinweise, dass das Mikrobiom des Darms eine wichtige Rolle in der Pathogenese einnimmt (Schepici et al. 2019). Hierfür wurden verschiedene Experimente an Mäusen durchgeführt. Die EAE, die experimentelle autoimmune

Enzephalitis, ist ein experimentelles Modell, welches die Erkrankung der MS in Mäusen möglichst genau abbildet. Die Hauptsymptome sind daher ebenfalls Entzündungsreaktionen, Demyelinisierung, Verlust von Axonen und Gliose (Constantinescu et al. 2019). Bei Veränderungen des Mikrobioms der Mäuse, konnten unterschiedliche Ergebnisse bei der Entwicklung der EAE erzielt werden. So entwickelten mit Breitbandantibiotika behandelte Mäuse eine weniger starke EAE (Ochoa-Repáraz et al. 2009). Andererseits konnten SFB, segmentiert filamentöse Bakterien, in zuvor gesunden, keimfreien Mäusen die EAE induzieren (Lee et al., 2011). Weitere Studien untersuchten die Zusammensetzung des Mikrobioms von MS Erkrankten und verglichen diese mit Stuhlproben gesunder Menschen. Dabei wurde deutlich, dass zwar immer eine Dysbiose bei den MS Patientinnen und Patienten erkennbar war, manche Bakterien jedoch häufiger vorkamen und andere Spezies vermindert. Bakterien der Gattungen *Clostridia* und *Bacteroidia* waren signifikant weniger häufig vertreten (Miyake et al., 2015). *Methanobrevibacter* und *Akkermansia* hingegen sind verglichen mit gesunden Gruppen vermehrt im Stuhl vorhanden. Grundsätzlich lässt sich sagen, dass proinflammatorisch wirkende Bakterien verhältnismäßig häufiger in MS Patienten zu finden sind (Jangi et al., 2016). Bakterien, die die Differenzierung regulatorische T-Zellen unterstützen, welche wiederum Entzündungen im ZNS vermindern (Kimura 2020), treten hingegen reduziert auf. Obwohl klar ist, dass so die Entwicklung von Myelin-reaktiven T-Zellen gefördert wird und diese in das zentrale Nervensystem translozieren, ist weiterhin unklar, welche mikrobiologischen Stoffe die Autoimmunität fördern (Kadowaki & Quintana 2020). Extrazelluläre Vesikel und OMV könnten daher durchaus eine wichtige Rolle in der Pathogenese der MS spielen. Die Aufnahme von OMV von darmständigen T-Zellen könnten diese These unterstützen. Die Translokation von OMV bis in das Gehirn könnte zu einer Förderung von autoreaktiven Abwehrzellen im Gehirn führen. Diese Bewegungsmöglichkeiten der Vesikel wird in der hier vorliegenden Forschungsarbeit untersucht.

1.5 Zielsetzung

Die Promotionsarbeit befasst sich im Kernpunkt mit der Charakterisierung der Kommunikation durch extrazelluläre Vesikel. Dabei geht es vor allem um die Verteilung körpereigener Vesikel, sowie von den Gram-negativen *Escherichia coli* Bakterien entstandenen Outer membrane vesicles in das Gehirn, Leber und die Darmschleimhaut.

Von Besonderem Interesse war hierbei, ob und wie diese Vernetzung beeinflusst werden kann, welche Zellen im Gewebe die Vesikel präferiert aufnehmen und eine passende Visualisierung der Ergebnisse zu finden. Weiterhin sollte noch eine zuverlässige Isolationsmethode der OMV Gram-negativer Bakterien etabliert werden, um zukünftige Experimente zu ermöglichen.

Die zentrale Hypothese ist, dass lokale Entzündungsreaktionen im Darm die Kommunikation mit peripheren Organen anregt und so körpereigene Vesikel vermehrt abgegeben werden. Weiterhin wird postuliert, dass die Darmschädigung mit der einhergehenden Minderung der Darmbarriere ein Übertreten bakterieller OMV in den Blutkreislauf verstärkt, sodass diese leichter in periphere Organe übertreten können.

Unterschiede wie auch Gemeinsamkeiten sollen zwischen der intraspezies Kommunikation durch extrazelluläre Vesikel und der interspezies Kommunikation durch outer membrane vesicles gefunden und klassifiziert werden.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Verbrauchs- und Hilfsmaterial

Material	Firma
Aluminiumfolie	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Cell Culture Plate 12/48/96-Well	Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich
Chamber-Slides 2/8-well	ibidi GmbH, Gräfelfing, Deutschland
CryoMold 4557/4566	Sakura Finetek Europe B.V., Alphen aan den Rijn, Niederlande
CryoPure Gefäß 1,8ml	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland
Deckgläser (50x60mm)	VWR International, Radnor, Pennsylvania
Dewar-Transportgefäß	KGW Isotherm, Karlsruhe, Deutschland
Einmal-Küvetten 1,5ml	BRAND GmbH + Co KG, Wertheim, Deutschland
Entsorgungsbeutel	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Erlenmeyerkolben 500ml	Schott AG, Jena, Deutschland
Falcon; 15ml, 50ml	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland
Färbekammer	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Färbeküvette	VWR International, Radnor, Pennsylvania
Filterpapier	Medite MEDICAL GmbH, Burgdorf, Deutschland
Glaskapillaren	World Precision Instruments Germany GmbH, Friedberg, Deutschland
Injektionskanülen	Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, USA
Insulin-Spritzen 0,3 ml	Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, USA
Kapillarspitzen	VWR International, Radnor, Pennsylvania
Krankenunterlage MoliCare Premium	Paul Hartmann AG, Heidenheim an der Brenz, Deutschland
Membranfilter (0,45µm 0,22µm)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Messzylinder, Messkolben, Bechergläser	VITLAB GmbH, Großostheim, Deutschland
Mini-Protean Tetra System	Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA
Mini-Protean TGX Stain-Free Precast Gel 10-well comb, 30µl/well	Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA
Neubauerzählkammer	Hecht Glaswarenfabrik GmbH & Co KG, Sondheim vor der Rhön, Bayern
Nitrocellulose Blotting Membran	GE Healthcare, Chalfont St Giles, Großbritannien
Nylon Cell Strainer (70µm 40µm)	Corning, Inc., New York, USA
Objektträger Superfrost Plus	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
Papiertücher	Essity, Stockholm, Schweden

PAP-Pen	Science Services GmbH, München, Deutschland
Parafilm "M"	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
PCR-Tubes 0,2ml 8-strip	ZEFA Group, Harthausen, Deutschland
Peha-soft® nitrile Handschuhe	Paul Hartmann AG, Heidenheim an der Brenz, Deutschland
Petrischalen 100x15mm	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland
Petrischalen 35x10mm	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
Pipetgirl	Integra GmbH, Zizers, Schweiz
Pipetten (1000µl 100µl 10µl 2,5µl)	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland
Reagiergefäße (0,5ml 1ml 2ml)	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland
Serologische Pipetten (50ml 25ml 10ml 5ml)	Greiner Bio-One, Kremismünster, Österreich
Sezierbesteck (Pinzette, Schere, Kugelschere)	Fine Science Tools GmbH, Heidelberg, Deutschland
Spritze (1ml)	B. Braun SE, Melsungen, Deutschland
Spritzen (20ml 10ml 5ml)	Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, USA
Sterican Kanüle Luer-Lok 0,90x4	B. Braun SE, Melsungen, Deutschland
sterile Pipettenspitzen	Greiner Bio-One, Kremismünster, Österreich
TipOne Pipettenspitzen (1000µl 100µl 10µl)	STARLAB International GmbH, Hamburg, Deutschland
TissueTek	Sakura Finetek Europe B.V., Alphen aan den Rijn, Niederlande
TransBlot Turbo Midi-size PVDF Membran	Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA
TransbLot Turbo Mini-size Transfer Stacks	Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA
Ultrazentrifuge Tubes 355618	Beckman Coulter, Brea, USA
Vakuumfiltrationseinheit 0,2µm/0,45µm	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland
Zentrifuge Tubes 500ml	Heraeus, Hanau, Deutschland

Tabelle 1: Auflistung der verwendeten Verbrauchs- und Hilfsmaterialien

2.1.2 Geräte und Maschinen

Gerät	Firma
Amersham ImageQuant 800	Cytiva, Marlborough, USA
Analysewaage	Sartorius AG, Göttingen, Deutschland
Autoklav VX-150	Systec GmbH, Linden, Deutschland
BioPhotometer	Eppendorf SE, Hamburg, Deutschland
CO2-Inkubator Heracell VIOS 160i	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
Confokales Fluoreszenzmikroskop LEICA TCS SP5 II	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland
Elektrophoresekammer	VWR International, Radnor, Pennsylvania
ELISA-Reader Infinite M200	Tecan Deutschland GmbH, Crailsheim, Deutschland

Excella E24 Incubator	New Brunswick Scientific GmbH, Nürtingen, Deutschland
Fluoreszenzmikroskop DMI 4000B	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland
Functionline BB 16 CO2-Inkubator	Heraeus, Hanau, Deutschland
Heiz- und Magnetrührer MH15	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Hybridization Oven	Stratagene California, San Diego, USA
Kamera DFC360 FX	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland
Kipp-/Rollenmischer RS-TR05	Phoenix Instrument GmbH, Garbsen, Deutschland
Kryostat CM3050S	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland
Kühlschrank	Liebherr-International AG, Bulle, Schweiz
Mikroinjektor PV 820	World Precision Instruments Germany GmbH, Friedberg, Deutschland
Mikroskop DMi1	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland
Mikrowelle	Severin Elektrogeräte GmbH, Sundern, Deutschland
MyFuge Minizentrifuge	Benchmark Scientific Inc, Sayreville, USA
NanoDrop Spektrophotometer	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
Netzteil PowerPac Basic	Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA
pH-Meter 50+ DHS	Dostmann Electronic GmbH, Wertheim am Main, Deutschland
Präzisionswaage EMB 1200-1	KERN & SOHN GmbH, Balingen, Deutschland
Reagenzglasschüttler Mini-Vortex	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Schwingmühle MM 400	Retsch GmbH, Haan, Deutschland
Sicherheitswerkbank Herasafe KS	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
Sonifier 102C	Branson Ultraschall GmbH, Fürth, Deutschland
Synergy Wasseraufbereitungssystem mit UV-Lampe	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Thermocycler	VWR International, Radnor, Pennsylvania
Tiefkühler	Liebherr-International AG, Bulle, Schweiz
Trans-Blot Turbo	Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA
Transiluminator Quantum-ST4	Vilber Lourmat Deutschland GmbH, Eberhardzell, Deutschland
Typ 70 Ti Festwinkelrotor	Beckman Coulter, Brea, USA
Ultratiefkühlgerät TSX Standardgerät	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
Ultrazentrifuge Optima XPN-80	Beckman Coulter, Brea, USA
Wasserbad	Memmert GmbH + Co. KG, Schwabach, Deutschland
Zentrifuge 521-3600	VWR International, Radnor, USA
Zentrifuge 5804 R	Eppendorf SE, Hamburg, Deutschland
Zentrifuge Megafuge 2.0 R	Heraeus, Hanau, Deutschland

Tabelle 2: Auflistung der verwendeten Geräte und Maschinen

2.1.3 Software

Programm	Firma
Amersham ImageQuant™ TL analysis software	Cytiva, Marlborough, USA
Ammonium Sulfate Calculator	EnCor Biotechnology Inc., Gainesville, USA
Elisa Reader Infinite Reader i-Control	Tecan Deutschland GmbH, Crailsheim, Deutschland
Gimp	The Gimp Development Team, Kalifornien, USA
GraphPad Prism 9	GraphPad Software Inc., San Diego, USA
Leica Advanced Fluorescence	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland
Leica Application Suite X	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland
Microsoft Excel	Microsoft Corporation, Redmond, USA
Microsoft PowerPoint	Microsoft Corporation, Redmond, USA
Microsoft Word	Microsoft Corporation, Redmond, USA
NanoDrop-1000	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
peqSTAR Manager	VWR International, Radnor, Pennsylvania
Quantum Capt ST 4	Vilber Lourmat Deutschland GmbH, Eberhardzell, Deutschland

Tabelle 3: Auflistung der verwendeten Software-Programme

2.1.4 Chemikalien

Chemikalie	Firma
50x B27	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
Advanced DMEM	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
Agarose	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Albumin Fraktion V	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Ammoniumchlorid	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Ammoniumsulfat	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Aqua ad iniectabilia	Berlin-Chemie AG, Berlin, Deutschland
BSA	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Clarity Western ECL Substrate	Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA
D(+)-Saccharose	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
DMEM	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
DMSO	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
DTT (Dithiotreitol)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
EDTA	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
EGF (Epithelial Growth Factor)	ImmunoTools GmbH, Friesoythe, Deutschland
Entellan	VWR International, Radnor, Pennsylvania
Eosin	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Essigsäure	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Ethanol (vergällt/unvergällt)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
FCS (Fetal Calve Serum)	PAN-Biotech GmbH, Aidenbach, Deutschland
Fluorescence Mounting Medium	Dako North America, Inc., Carpinteria, USA

flüssiger Stickstoff	Linde plc, Dublin, Irland
Formamid	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
GlutaMax	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
Glycin	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
HCl	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
HEPES 1M	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
KCl	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
KH ₂ PO ₄	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
KHCO ₃	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
LB-Agar	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
LB-Medium	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Matrigel	Corning, Inc., New York, USA
Mayers Hämalaun Lösung	VWR International, Radnor, Pennsylvania
Milchpulver	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Na ₂ HPO ₄	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
NAC (N-Acetylcystein)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
NaOH	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Natriumchlorid	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Noggin	AG Günther
PeqGreen	VWR International, Radnor, Pennsylvania
PFA	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
PMSF	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Polyethylenglykol 8000	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Protein Marker IV	VWR International, Radnor, Pennsylvania
Proteinase K	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Proteinkinase K	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Ringer Spüllösung	Fresenius Kabi AG, Bad Homburg vor der Höhe, Deutschland
ROTI Histofix 4,5%	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
ROTI Histol	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Roti ImmunoBlock	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
R-Spondin	AG Günther
SDS Pellets	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Trans-Blot Turbo 5x Transfer Buffer	Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA
TRIS PUFFERAN	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
TRIS-hydrochlorid PUFFERAN	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Trypanblau	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Tween 20	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
γ-Inhibitor	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA

Tabelle 4: Auflistung der verwendeten Chemikalien

2.1.5 Puffer

Puffer	Reagenzien	Menge
10% SDS	SDS dH2O	10g 100ml
10x ACK-Lyse-Puffer	Ammoniumchlorid KHCO3 0,5M EDTA dH2O NaOH/HCl	43g 5g 1ml auf 500ml auffüllen auf pH=7,2
10x PBS	NaCl KCl KH2PO4 Na2HPO4 NaOH/HCL dH2O	80g 2g 2,4g 11,5g auf pH=7,4 auf 1 Liter auffüllen
1x PBS	10x PBS dH2O	100ml 900ml
1x TAE-Puffer	50x TAE-Puffer dH2O	40ml auf 2 Liter auffüllen
50x TAE-Puffer	Tris-Base Essigsäure 0,5M EDTA dH2O	242g 57,1ml 100ml auf 1 Liter auffüllen
Basales Kulturmedium (BCM)	Advanced DMEM/F12 GlutaMax Hepes Penicillin/Streptomycin	 2mM 1mM 100U/ml
Blottingpuffer	dH2O 100% EtOH Trans-Blot Turbo 5x Transfer Buffer	30ml 10ml 10ml
FISH Hybri-Puffer 40% Formamid	1M TRIS 5M NaCl 10% SDS dH2O Formamid	8ml 72ml 400µl 160ml 40%
FISH Waschpuffer 10x	1M TRIS-HCl pH 8,0 5M NaCl 10% SDS dH2O	100ml 225ml 5ml auf 500ml auffüllen
Histopuffer	PBS BSA FCS	89% 1% 10%

Krypten Kulturmedium (CCM)	BCM	75%
	R-Spondin	20%
	Noggin	5%
	B27	20µl
	NAC	2µl
	EGF	0,2µl
	Primocin	1µl
	Y-Inhibitor	1µl
	Amphotericin B	1µl
Stripping Puffer	NaOH/HCL	auf pH=2,5
	Tween	250µl
	Glycin	7,5g
	dH2O	auf 500ml auffüllen
TBS 10x	TRIS-HCl	80g
	TRIS	5,6g
	NaCl	88g
	NaOH/HCl	auf pH=7,4
TBS 1x	TBS 10x	100ml
	VE-Wasser	900ml
TBS-T	10x TBS	100ml
	dH2O	899ml
	Tween	1ml
Waschpuffer	DMEM	1 Flasche
	7,5% BSA	2,7ml
	Penicillin/Streptomycin	5ml
	10000U/ml	
Zellisolationspuffer (CIB)	EDTA	125µl
	PBS	31,2ml
Zelllyse-Puffer	50mM Tris-HCL	pH 7,5
	NaCl	auf 80mM
	DTT	auf 5mM
	PMSF (direkt vor Nutzung)	auf 1mM
	dH2O	auffüllen

Tabelle 5: Auflistung der verwendeten Puffer

2.1.6 Primer und PCR-Programme

Primer	Sequenzen 5'-3'
16s rRNA	fwd: 5'-ACTCCTACGGGAGGCAGCAGT-3'
	rev: 5'-ATTACCGCGGCTGCTGGC-3'
Cre	fwd: 5'-GCCTGCATTACCGGTCGATGCAACGA-3'
	rev: 5'-GTGGCAGATGGCGCGGCAACACCATT-3'
tdTomato	fwd: 5'-AGCAAGGGCGAGGAGGTCATC-3'
	rev: 5'-CCTTGGAGCCGTACATGAACTGG-3'

Tabelle 6: Auflistung der verwendeten Primer

PCR	Ablauf	Temperatur in °C	Zeit	Wiederholung
16s-rRNA	Denaturierung	94°C	2'	} 40x
	Denaturierung	94°C	30"	
	Annealing	68°C	60"	
	Amplifikation	72°C	30"	
	Extension	72°C	5'	
	Lagerung	4°C	∞	
Cre	Denaturierung	94°C	2'	} 35x
	Denaturierung	94°C	30"	
	Annealing	63°C	72"	
	Amplifikation	72°C	60"	
	Extension	72°C	5'	
	Lagerung	4°C	∞	
tdTomato	Denaturierung	94°C	5'	} 40x
	Denaturierung	94°C	15"	
	Annealing	60°C	30"	
	Amplifikation	72°C	40"	
	Extension	72°C	5'	
	Lagerung	4°C	∞	

Tabelle 7: Auflistung der verwendeten PCR-Programme

2.1.7 Stimulantien und Medikamente

Substanz	Firma
Amphotericin B	Ratiopharm, Ulm, Deutschland
Ampicillin	Ratiopharm, Ulm, Deutschland
Dynamine Inhibitor I, Dynasore	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Heparin	Ratiopharm, Ulm, Deutschland
Infγ + TNFα	InvivoGen, San Diego, USA
Ketamin (50mg/ml)	Inresa Arzneimittel GmbH, Freiburg im Breisgau, Deutschland
LPS-EB Ultrapure	InvivoGen, San Diego, USA
Metronidazol	B. Braun SE, Melsungen, Deutschland
Neomycin	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Penicillin/Streptomycin	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
PolyIC	InvivoGen, San Diego, USA
Primocin	InvivoGen, San Diego, USA
Rompun (Xylazin)	Bayer AG, Leverkusen, Deutschland
Süßstoff	Splenda Heartland Food Products Group, Indianapolis, USA
Vancomycin	Ratiopharm, Ulm, Deutschland

Tabelle 8: Auflistung der verwendeten Stimulantien und Medikamente

2.1.8 Antikörper und Färbungen

Name	Firma	Lot	Verdünnung	Host
α-SMA	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA	53-9760-82	1:250 TBS	mouse
Actb_2	Qiagen, Hilden, Deutschland	QT01136772		mouse

anti-hamster-Antikörper	BioLegend, San Diego, USA	405501	1:1000 TBS	goat
anti-rabbit-Antikörper	Dianova, Hamburg, Deutschland	111-065-146	1:500 TBS	goat
anti-rabbit-Antikörper	Cell Signaling Technology, Danvers, USA	4414S	1:500 TBS	goat
anti-rat-Antikörper	Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, USA	554014	1:500 TBS	goat
CD11C-Antikörper	Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, USA	550283	1:200 TBS	hamster
CD11C-Antikörper	BioLegend, San Diego, USA	117309	1:50 TBS	hamster
CD28-AK	Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, USA	553294	1µg/ml Medium	hamster
CD31-Antikörper	BioLegend, San Diego, USA	102516	1:200 TBS	rat
CD31-Antikörper	Dianova, Hamburg, Deutschland	DIA-310-5231	1:1000 TBS	rat
CD3-Antikörper	BioLegend, San Diego, USA	100212	1:100 TBS	rat
CD4-Antikörper	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA	14-2444-82	1:200 TBS	mouse
CD4-Antikörper	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA	4342629	1:200 TBS	rat
CD4-Antikörper	Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, USA	553043	1:200 TBS	rat
Collagen I-Antikörper	Abcam, Cambridge, Vereinigtes Königreich	34710	1:500 TBS	rabbit
Cre Recombinasis	Cell Signaling Technology, Danvers, USA	15036S	1:1000 5% BSA TBS-T	rabbit
Dylight 488	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA	46402	1:400 TBS	
Entero-bakterien-sonde	biomers.net GmbH, Ulm, Deutschland	5'-TGCTCTC GCGAGGTC GCTTCTCTT -3'	1:10 Hybri-puffer	
Eubakterien-sonde	biomers.net GmbH, Ulm, Deutschland	5'-GCTGCC TCCCGTAG GAGT-3'	1:10 Hybri-puffer	
F4/80-Antikörper	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA	14-4801-82	1:1000 TBS	rat
GFP	Abcam, Cambridge, Vereinigtes Königreich	ab290	1:1000 5% BSA TBS-T	rabbit
Hoechst	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA	33342	1:5000 TBS	
MPO-Antikörper	Abcam, Cambridge, Vereinigtes Königreich	ab9535	1:200 TBS	rabbit

OmpA-Antikörper	Biorbyt Ltd, Cambridge, Vereinigtes Königreich	orb422682	1:500 TBS (5% BSA WesternBlot)	rabbit
OmpC-Antikörper	Biorbyt Ltd, Cambridge, Vereinigtes Königreich	orb6940	1:500 TBS (5% BSA WesternBlot)	rabbit
Phalloidin 647	Cell Signaling Technology, Danvers, USA	8940S	1:200 TBS	
VEGFR2-Antikörper	Cell Signaling Technology, Danvers, USA	2479S	1:200 TBS	rabbit
Vimentin-Antikörper	Cell Signaling Technology, Danvers, USA	9854S	1:400 TBS	rabbit

Tabelle 9: Auflistung der verwendeten Antikörper und Färbungen

2.1.9 Kits

Kit	Firma
Avidin/Biotin Blocking-Kit	Vector Laboratories, Newark, USA
CFSE Cell Proliferation Kit	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
FoxP3 Permkrit	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
MicoSpin Total RNA Kit	VWR International, Radnor, Pennsylvania
peqGOLD Total RNA Kit (C-Line)	VWR International, Radnor, Pennsylvania
Script cDNA Synthesis Kit	Jena BioScience, Jena, Deutschland
TSA Fluoresin/Cyanin Kit	PerkinElmer, Waltham, USA
Zombie NIR Fixable Viability Kit	BioLegend, San Diego, USA

Tabelle 10: Auflistung der verwendeten Kits

2.1.10 Mauslinien

Um die Translokation speziesspezifischer EV und bakterieller OMV nachvollziehen zu können, wurden für verschiedene Untersuchungen spezialisierte Mauslinien eingesetzt. Dafür wurden C57/BL/6J Wildtyp-Mäuse (Bestandsnummer 000664), und Rosa26.tdTomato Reporter Mäuse (Bestandsnummer 007905) von Jackson Laboratory erworben. Die Rosa26.tdTomato Mäuse exprimieren über ein Cre/loxP System nach Rekombination durch die Cre-Rekombinase das rot-fluoreszierende Protein tdTomato. Über die Kontrolle des Villin Promotors ist ein weiterer Stamm in der Lage, diese Cre-Rekombinase in intestinalen Epithelzellen zu exprimieren. Schließlich wurde ein vierter Stamm eingesetzt, welcher zusätzlich zu den beiden genannten Modifikationen, Caspase 8 defizient war. Die Tiere wurden im Kussmaul-Forschungscampus des Universitätsklinikums Erlangen gehalten und gezüchtet. Die Haltung und regelmäßige Kontrolle nach Pathogenen und Erkrankungen der Tiere

erfolgte strikt nach Vorgaben der FELASA Leitlinien. Die Tierexperimente wurden von der Regierung Unterfranken genehmigt.

Genotyp	Funktion
C57Bl6/J	Kontrolle
Casp8 ^{fl/fl} VilCre	Cre-Rekombinase Expression in intestinalen Epithelzellen unter Caspase-8 Defizienz
Rosa26.tdTomato	Cre-Reporterlinie
VilCrexRosa26.tdTomato	Cre-Reporterlinie Cre-Rekombinase Expression in intestinalen Epithelzellen

Tabelle 11: Mauslinien

2.1.11 Bakterien

Für die Untersuchungen zur Kommunikation Gram-negativer *Escherichia coli* wurden verschiedene Stämme mit unterschiedlichen genetischen Eigenschaften eingesetzt. Der Stamm, welcher in der folgenden Arbeit als *E. coli* GFP bezeichnet wird, ist in der Lage das grün-fluoreszierende Protein (GFP) zu exprimieren. Außerdem beinhaltet es ein Plasmid, welches die Bakterien resistent gegenüber dem Antibiotikum Ampicillin macht. Erworben wurde der Stamm bei ATCC, Produktnummer 25922GFP. Weiterhin wurde von der AG Günther ein Stamm zur Verfügung gestellt, welcher neben einer Ampicillin-Resistenz das Cre-Rekombinase Protein exprimiert. Dieser Stamm wird in der vorliegenden Arbeit mit *E. coli* Cre bezeichnet. In einigen Experimenten werden kommensale Bakterien als Kontrollgruppe herangezogen. Diese wurden von AG Günther zur Verfügung gestellt, welche aus früheren Mausexperimenten aus dem Stuhl von Wildtypmäusen gewonnen wurde. Daher ist hierbei von einer Bakteriengruppe auszugehen, wie sie typischerweise als Mikrobiom einer gesunden Maus erscheint.

2.2 Methoden

2.2.1 Tierprotokolle

2.2.1.1 Protokoll zur Untersuchung der Distribution körpereigener Vesikel

Die Mäuse mit dem Genotyp VillinCrextdTomato wurden gewogen und schließlich zufällig in zwei Gruppen eingeteilt. Die Gruppeneinteilung erfolgte so, dass das Durchschnittsgewicht einer Gruppe ca. 20g betrug. Wenn eine Maus mehr als 20% vom Ursprungsgewicht verloren hätte, wäre das Experiment für diese Maus abgebrochen worden. Hierfür wurden alle Mäuse täglich gewogen. Die Mäuse der Gruppe 1 erhielten jeweils am ersten Tag 3,1mg LPS/kg Körpergewicht. Das berechnete Volumen an LPS wurde jeweils auf insgesamt 100µl Gesamtinjektionsvolumen mit sterilem PBS aufgefüllt. Die Gruppe 2 erhielt 100µl an sterilem PBS. In allen Fällen wurde die Injektionslösung intraperitoneal injiziert. Danach erhielten Mäuse der ersten Gruppe 3,0mg LPS/kg KG auf 100µl Gesamtinjektionsvolumen mit sterilem PBS, die zweite Gruppe erhielt erneut 100µl steriles PBS. Aufgrund der unterschiedlich starken Reaktion der Mäuse auf das LPS, wurde diese Gruppe unterteilt. LPS stark zeigte eine geringere Nahrungsaufnahme, eine schlechtere Temperaturregulation und früher erste Anzeichen von Schmerzen als LPS mild. Am dritten Tag wurden die Organe entnommen. Gehirn, Leber und Darm wurden in Falcons mit Roti HistoFix gegeben. Nach 24 Stunden Lagerung bei Raumtemperatur wurden die Organe aus der Lösung genommen und in neue Falcons mit 30%-iger Saccharose Lösung gegeben. Diese wurden bei 4°C gelagert, bis alle Organe zum Boden des Falcons abgesunken waren. Daraufhin wurden die Organe entnommen und in Cryomolds gelegt. Es war darauf zu achten, die Darmabschnitte längs auszurichten und die Leber mit dem dorsalen Anteil zum Boden der Mold. Das Gehirn wurde sagittal in der Mittellinie geteilt und dann die Sagittalebene zum Boden der Cryomold ausgerichtet. Alle Organe wurden mit TissueTek bedeckt und mit Hilfe eines Kryostats eingefroren. Die so aufbereiteten Organe wurden bei -80°C gelagert.

2.2.1.2 Protokoll zur Untersuchung der Distribution bakterieller OMV

13 Rosa26 Tomato Mäuse wurden in vier Gruppen eingeteilt und anschließend gewogen. Die Gruppeneinteilung erfolgte so, dass das Durchschnittsgewicht einer Gruppe ca. 20g betrug. Wenn eine Maus mehr als 20% vom Ursprungsgewicht verloren hätte, wäre das Experiment für diese Maus abgebrochen worden. Hierfür wurden alle Mäuse täglich gewogen. Danach wurden sie in individuell belüftete und autoklavierte Quarantäne-Käfige aufgeteilt. Weiterhin waren Trinkwasser und Futter autoklaviert und keimfrei. Um die Anzahl der lebenden Bakterien im Mikrobiom des Darms der Mäuse größtmöglich zu reduzieren, erhielten alle Tiere über das Trinkwasser eine antimikrobielle Breitbandtherapie mit Ampicillin (1mg/ml), Vancomycin (0,5mg/ml), Neomycin (1mg/ml) und Metronidazol (1mg/ml). Außerdem wurden in 50ml des Antibiotikum-Cocktails noch 0,5g Süßstoff hinzugegeben, damit die Mäuse regelmäßig trinken. Das Gewicht der Mäuse wurde täglich kontrolliert und das Trinkwasser gewechselt. An Tag 7 wurden die Mäuse in frisch autoklavierte Quarantäne-Käfige umgesetzt und erhielten mit dem Trinkwasser nur noch Ampicillin (1mg/ml). An den Tagen 8-11 wurde 2 von 4 Gruppen täglich 200µl einer *E. coli* Cre-Lösung mit einer Schlundsonde verabreicht. Diese enthielt in etwa 6×10^9 Ampicillin-resistente Bakterien (Siehe 2.2.3.1). Die anderen beiden Gruppen erhielten 200µl steriles PBS. Am 10. und 11. Tag erhielten 2 Mausgruppen LPS über eine intraperitoneale Injektion unter sterilen Bedingungen 2,7mg LPS/kg KG. Für die Gruppeneinteilung ergibt sich folgendes Bild:

Gruppe 1: Gabe von *E. coli* Cre über eine Magensonde und LPS intraperitoneal.

Gruppe 2: Gabe von *E. coli* Cre über eine Magensonde und PBS intraperitoneal.

Gruppe 3: Gabe von PBS über eine Magensonde und LPS intraperitoneal.

Gruppe 4: Gabe von PBS über eine Magensonde und PBS intraperitoneal.

An Tag 12 wurden Stuhlproben von allen Mäusen genommen, um sie auf ihre mikrobielle Zusammensetzung zu untersuchen (siehe Kapitel 2.2.3.2).

Für die Organentnahme wurden die Mäuse an Tag 12 mit 1,5%-2% Isofluran narkotisiert. Danach erhielten sie 100µl Heparin (5000 IE/ml) und 80µl/10g KG eines Ketamin/Xylozalin Mix intraperitoneal injiziert. Der Ketamin/Xylozalin Mix besteht aus

1,2ml Ketamin (50mg/ml), 9,4ml Xylazin (Rompur 2%) sowie 3,4ml sterilem PBS. Durch Reflextestung an der Hinterpfote wurde überprüft, wann die Maus narkotisiert und schmerzfrei ist. Danach wurde sie am Bauch längs geöffnet und das Herz mit kaltem 5mM EDTA/PBS perfundiert, bis die Leber aufhellte. Dies entsprach pro Maus einer Spülflüssigkeit von etwa 15ml. Die weitere Organisolierung und Aufbereitung erfolgten wie beschrieben in 2.2.1.1. Zusätzlich wurden noch die Nieren, die Pfote, das Herz, Caecum, Colon, Lunge und Milz entnommen und analog behandelt.

2.2.2 Färbungen der Kryostat-Schnitte

Die in TissueTek fixierten Organe wurden mit Hilfe eines Kryostats 12µm breit geschnitten und jeweils mindestens 3 Schnitte auf einen Objektträger platziert. Nach 20 Minuten Trocknen wurden sie je nach Färbung weiter behandelt.

2.2.2.1 Immunhistologie

Die vorbereiteten Objektträger wurden jeweils 3x 3 Minuten mit TBS gewaschen. Die Organe wurden möglichst eng mit einem PAP Liquid Blocker Stift umkreist und danach das Gebiet mit PFA bedeckt. In einer Färbekammer wurden sie so unter einem Abzug für 20 Minuten belassen. Danach wurden sie erneut 3x 3 Minuten mit TBS gewaschen. Danach folgte der Blocking-Schritt. Zunächst wurden auf alle Organschnitte Avidin gegeben, welches 15 Minuten in einer Färbekammer einwirkte. Wieder wurden die Objektträger für 5 Minuten mit TBS gewaschen. Als nächstes wurde für 15 Minuten Biotin auf die Schnitte gegeben, mit einem 5-minütigen Waschgang mit TBS. 2% BSA in TBS-T 1:10 Roti-Immunoblock wurde für 15 Minuten aufgebracht und danach 5 Minuten in TBS gewaschen. Danach wurden die Primärantikörper auf die Schnitte gegeben. Ein Schnitt erhielt als Kontrolle keine Antikörper, sondern reines 2% BSA+TBS-T. Eine Liste der verwendeten Primärantikörper mit der jeweiligen Verdünnung und benötigten Sekundärantikörpern findet sich in Kapitel 2.1.8. Die Verdünnung selbst erfolgte mit 2% BSA+TBS-T. Die Schnitte wurden mit den verdünnten Antikörperlösungen großzügig benetzt. In einer Färbekammer wurden die Objektträger für mindestens 12 Stunden bei 4°C gelagert. Anschließend wurden die Objektträger 3x 5 Minuten mit TBS gewaschen. Als nächstes wurden je nach Host des Primärantikörpers der passende Sekundärantikörper aufgetragen. Eine Liste der verwendeten Sekundärantikörper mit der jeweiligen Verdünnung findet sich in Kapitel

2.1.8. Die Verdünnung erfolgte mit 2% BSA+TBS-T. Der Sekundärantikörper wurde auf alle Schnitte aufgetragen, auch auf jenen, welcher nicht mit einem Primärantikörper versehen wurde. So konnte stets die Spezifität des Primärantikörpers verifiziert werden. Nach einer Stunde in der Färbekammer bei 4°C wurden die Objektträger 3x 5 Minuten mit TBS gewaschen. Als nächster Schritt wurden die Antikörper mit Hilfe des TSA-Kits angefärbt. Hierfür wurde Streptavidin mit TBS 1:200 verdünnt, aufgetragen und 30 Minuten in der Färbekammer belassen. Danach wurden die Objektträger 3x 3 Minuten lang gewaschen. Es folgte Fluorescein 1:50 in der Pufferlösung des Kits für 5 Minuten in der Färbekammer, gefolgt von einem Waschgang 3x 3 Minuten in TBS. Schließlich wurde zur Anfärbung der Zellkerne Hoechst 1:5000 in TBS verdünnt und aufgetragen. Nach 10 Minuten in der Färbekammer wurden die Schnitte 2x 3 Minuten in TBS gewaschen und schließlich mit Mounting Medium ein Deckglas auf dem Träger fixiert. Die fertigen Präparate wurden bei 4°C gelagert und unter einem Fluoreszenzmikroskop, oder einem konfokalen Lasermikroskop ausgewertet.

2.2.2.2 HE-Färbung

Die vorbereiteten Objektträger wurden in einen Färbeständer gestellt und die Schnitte 20 Minuten lang in Histofix fixiert. Danach wurden sie in eine Hämatoxylin Lösung für 7 Minuten gestellt und schließlich 10 Minuten unter fließendem Leitungswasser gebläut. Es folgten 5 Minuten in Eosin, kurzes Abspülen mit destilliertem Wasser und dann jeweils 5 Minuten erst in 70%igem EtOH, dann 96%igem EtOH, 100%igem EtOH und schließlich 2x 5 Minuten in Roti-Histol. Ein Deckglas wurde danach mit Entellan beschichtet und auf den Objektträger gelegt. Unter einem Abzug konnte das Präparat trocknen und anschließend bei Raumtemperatur gelagert werden.

2.2.2.3 FISH-Färbung

Als Vorbereitung wurde FISH Hybri-Puffer 1 Stunde vor Start der Färbung auf einen Magnetrührer mit 100°C gestellt. Der Puffer besteht aus 8ml 1M Tris, 72ml 5M NaCl, 400µl 10% SDS und 160ml ddH₂O für eine 40%-Lösung.

Die vorbereiteten Schnitte wurden 20 Minuten lang in Histofix fixiert und danach 3x 3 Minuten in TBS gewaschen. Die Schnitte wurden eng mit einem PAP Liquid Blocker Stift umkreist und danach 20 Minuten lang ein Hybri-Puffer, bestehend aus 60% FISH-Hybri Puffer und 40% Formamid, in einer Färbekammer bei Raumtemperatur

aufgetragen. Es folgte die Hybridisierung. Hierfür wurden je ein 50 ml Falcon für jeden Objektträger vorbereitet. Wartmannpapier wurde mit 2ml Hybri-Puffer benetzt und in das Falcon gelegt. Der Sondenmix wurde durch die Sonde in einer 1:10 Verdünnung mit dem Hybri-Puffer angefertigt und auf die Schnitte gegeben. Eine Liste mit den verwendeten Sonden findet sich in Kapitel 2.1.8. Dann wurde ein Deckglas auf die Schnitte gelegt. Der Objektträger wurde in das Falcon gegeben und diese 90 Minuten bei 46°C im Hybridisierungssofen inkubiert. Danach wurden die Objektträger 15 Minuten bei 46°C mit FISH-Waschpuffer (siehe Kapitel 2.1.5) gewaschen, wobei sich die Deckgläser lösten. Daraufhin wurde nochmal 3x 3 Minuten in TBS gewaschen. Schließlich wurde zur Anfärbung der Zellkerne Hoechst 1:5000 in TBS verdünnt und aufgetragen. Nach 10 Minuten in der Färbekammer wurden die Schnitte 2x 3 Minuten in TBS gewaschen und schließlich mit Mounting Medium ein Deckglas auf den Träger fixiert. Die fertigen Präparate wurden bei 4°C gelagert.

2.2.3 Bakterienkultur

2.2.3.1 Inokulationslösung

In eine Flasche wurden 25g LB-Medium gegeben und auf einen Liter mit destilliertem Wasser aufgefüllt. Danach wurde das Medium autoklaviert. Unter sterilen Bedingungen wurden in ein 250ml Erlenmeyerkolben 100ml des Mediums gegeben und 100µl eines Ampicillinkonzentrats hinzugegeben (100mg/ml; Endkonzentration entspricht 100mg Ampicillin/Liter LB). Von dieser Lösung wurden 25ml in ein 50ml Falcon gegeben und dieser steril verdichtet. Im Kühlschrank aufbewahrt würde diese Lösung zur späteren Leerkontrolle bei der OD-Messung dienen. Weitere 10ml wurden in ein 50ml Falcon übertragen. Mit einer Pipettenspitze wurde vorsichtig eine kleine Menge der *E. coli* Cre Stammkonzentration entnommen und die Spitze in das LB-Medium gegeben. Das Röhrchen wurde verschlossen und schließlich über Nacht bei 37°C und 150rpm inkubiert. 50ml des LB-Mediums verblieben im Erlenmeyerkolben, welcher verschlossen und bei 4°C im Kühlschrank gelagert wurde.

Nach 8-10 Stunden wurde 1ml der Übernachtskultur in den Erlenmeyerkolben mit 50ml LB-Medium gegeben. Um die korrekte Menge an *E. coli* Cre Bakterien zu erhalten, wurde 1ml der zuvor gesicherten Lösung als Leerprobe an einem Messgerät für Optische Dichte eingestellt. Um die OD der Kultur zu messen, wurden jeweils 100µl dieser entnommen und mit 900µl der Leerprobe aufgefüllt. Die gemessene OD wurde

dann mit 10 multipliziert, bis zum Zeitpunkt, indem die Kultur eine OD600nm von $\sim 1,0$ zeigt. Von dieser Kultur wurden $(n+1) \cdot 6\text{ml}$ ($n = \text{Anzahl der Mäuse, welche inokuliert werden sollen}$) entnommen, in ein neues Falcon übertragen und schließlich 10 Minuten bei $4600 \cdot g$ und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in $(n+1) \cdot 200\mu\text{l}$ sterilem PBS gelöst. $200\mu\text{l}$ Lösung enthielten damit jeweils $6 \cdot 10^9$ Bakterien. Die Bakterienkonzentrate wurden zügig den Mäusen mit Hilfe der Fütterungssonde verabreicht.

2.2.3.2 Wachstum von Darmbakterien

Um die erfolgreiche Mikrobiota-Depletion kommensaler Bakterien im Darmlumen der Mäuse bei gleichzeitigem Wachstum der *E. coli* Cre Bakterien zu verifizieren (siehe Kapitel 2.2.1.2), wurden Stuhlproben auf bakterielles Wachstum untersucht. Hierfür wurde zunächst steriles LB-Agar hergestellt. 25mg LB-Medium und 15g Bacto Agar-Agar wurden auf einen Liter mit destilliertem Wasser aufgefüllt und danach autoklaviert. Nachdem sich die Flüssigkeit abgekühlt hatte, wurden unter sterilen Bedingungen 500ml abgefüllt und mit Ampicillin versetzt (Endkonzentration 100mg/Liter). Danach wurde das Volumen gleichmäßig auf Petrischalen verteilt. Nachdem das LB-Agar fest wurde, wurde es bei 4°C gelagert.

Die Stuhlproben der Mäuse wurden in zuvor abgewogene sterile 2ml Eppendorf-Reagenzgefäße gegeben. Je 1g Stuhl wurden mit 15ml sterilem PBS ergänzt. In einer Kugelmühle wurde der Stuhl 20 Minuten zerkleinert und gelöst. Anschließend wurden Verdünnungsreihen mit sterilem PBS bis $1:10^6$ angefertigt. Jeweils $50\mu\text{l}$ der Verdünnungsreihen $1:10^5$ und $1:10^6$ wurden auf jeweils eine Agar-Platte mit und eine Agar-Platte ohne Ampicillin Zusatz verteilt. Die Platten wurden steril verschlossen und 48 Stunden bei 37°C inkubiert. Danach konnte das Wachstum anhand der Anzahl der gewachsenen Kolonien abgelesen werden.

2.2.4 OMV-Isolation

Für die OMV-Isolation wurden zunächst alle benötigten Lösungen vorbereitet. Für das LB-Medium wurde 25g LB-Medium Pulver (Luria/Miller, Carl Roth) in eine Flasche gegeben und mit VE-Wasser auf 1 Liter aufgefüllt. Danach wurde die Flüssigkeit autoklaviert. Eine Ampicillin-Lösung wurde mit 1g Ampicillin (Ratiopharm) in 10ml Aqua injectabile gelöst, in $500\mu\text{l}$ Teile aufgeteilt und bei -20°C gelagert. Eine PEG8000

50% w/v wurde angesetzt, indem 200g PEG8000 in 200ml VE-Wasser gelöst wurde. Danach wurde die Lösung mit VE-Wasser auf 400ml verdünnt und schließlich autoklaviert. Für eine 3,75M NaCl Lösung wurde 9,86g NaCl in 45ml VE Wasser aufgelöst und schließlich sterilfiltriert.

Für die Erstkultur wurde 15ml LB-Medium in einem 50ml Falcon mit 15 μ l der Ampicillin-Lösung gegeben. Ein kleiner Teil der Bakterien einer Originalkultur wurde mit Hilfe einer Pipettenspitze in das Medium gebracht. Die Kultur wurde bei 37°C und 150rpm lang inkubiert. Ein Erlenmeyerkolben mit einem Fassungsvermögen von 500ml wurde mit 250ml LB-Medium befüllt und zusätzlich 250 μ l der Ampicillin-Lösung ergänzt. Die optische Dichte der Erstkultur wurde gemessen und wenn sie eine OD600 von 1,0 erreichte, wurden 100 μ l der Erstkultur in den 500ml Erlenmeyerkolben übertragen. Die Zweitkultur wurde 16 Stunden lang bei 37°C und 150rpm inkubiert. Danach wurde sie zunächst bei 4°C 20 Minuten lang bei 2.600*g zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Falcon übertragen und bei 4°C 20 Minuten lang bei 4.000*g zentrifugiert. Dieser Überstand wurde danach zunächst durch einen 0,45 μ m Filter, danach durch einen 0,22 μ m Filter sterilfiltriert. Für die Isolation mit PEG wurden sechs 50ml Falcons mit jeweils 10ml der 50%igen PEG-Lösung, 1ml 3,75M NaCl und 39ml des filtrierten Mediums gefüllt. Bei der Isolationsmethode mit Ammoniumsulfat wurde pulverisiertes, unter UV-Licht sterilisiertes Ammoniumsulfat zum filtrierten Medium gegeben, sodass eine Salzsättigung von 40% erreicht wurde. Die Falcons wurden vorsichtig invertiert und für mindestens 12 Stunden bei 4°C gelagert. Danach wurden die Falcons gut austariert und schließlich 30 Minuten lang bei 4°C und 7.100*g zentrifugiert. Ein Großteil des Überstandes wurde abgenommen, sodass nur noch etwa 800 μ l in den Falcons verblieben sind. Die Lösung wurde gewissenhaft resuspendiert und eventuell aufgetretene Pellets gelöst. Die Lösungen wurden gepoolt und auf zwei Ultrafiltrationsröhrchen (100kDa MWCO) mit jeweils 2,5ml aufgeteilt. Diese wurden zuvor unter UV-Licht sterilisiert. Die Membran wurde daraufgelegt und für 5 Minuten stehen gelassen. Bei 4°C wurden die Röhrchen 10 Minuten lang mit 2.500*g zentrifugiert. Der Schwimmer wurde mitsamt der gesammelten Flüssigkeit verworfen und die Pellets in den Tubes resuspendiert und in einem 2ml Eppendorf Reaktionsgefäß gepoolt. Dies wurde anschließend bei 4°C für 20 Minuten bei 18.000*g zentrifugiert. Der Überstand wurde danach vollständig entfernt und die OMV konnten in einem beliebigen Medium resuspendiert werden. Zur Qualitätskontrolle wurde ein

Teil der OMV-Lösung auf LB Agar ohne Antibiotika gegeben und überprüft, dass kein Wachstum bei einer Inkubation bei 37°C für mindestens 48 Stunden lang bestand.

2.2.5 Genotypisierung

2.2.5.1 RNA-Isolation und cDNA Synthese

Um das Vorhandensein von bestimmter mRNA in einem Organ oder in OMV zu überprüfen musste zunächst die mRNA aus der jeweiligen Probe isoliert, in cDNA umgewandelt und dann in einer PCR untersucht werden. Hierfür wurde das zu untersuchende Gewebe/die OMV in ein 2ml Eppendorf Reaktionsgefäß gegeben. Eine kleine Metallkugel wurde abgeflammt, um sie von organischen Materialien zu befreien und zusammen mit 350µl Lysepuffer in das Gefäß gefügt. In einer Kugelmühle wurde das Material für 2 Minuten bei 25 Hz zerkleinert. Die mRNA-Isolation erfolgte mit dem Protokoll des MicoSpin Total RNA Kit von VWR. Die Lösung wurde in eine Zentrifugationssäule (1) gegeben, auf ein Sammeltube gestellt und schließlich bei 12.000*g 1 Minute lang zentrifugiert. Zum Filtrat wurden 350µl 70% EtOH zugegeben, gemischt und anschließend in eine andere Zentrifugationssäule (2) übertragen. Auf eine Sammeltube gestellt und bei 10.000*g 1 Minute lang zentrifugiert. Die Säule wurde auf ein neues Tube gestellt, 500µl Waschpuffer 1 in die Säule gegeben und 1 Minute lang bei 10.000*g zentrifugiert. Dieser Schritt wurde mit 600µl Waschpuffer 2 wiederholt. Danach wurde die Säule auf einem neuen Sammeltube wieder bei 10.000*g für 2 Minuten zentrifugiert, um den restlichen Waschpuffer zu entfernen. Die Zentrifugationssäule wurde anschließend auf ein Eppendorf-Reaktionsgefäß gestellt. In die Säule wurde 100µl RNase freies Wasser gegeben, 3 Minuten lang inkubiert und die RNA schließlich mit 6.000*g in das Eppendorf Gefäß übertragen. Durch die Instabilität der RNA wurde sie sofort auf Eis gelagert. Die Qualität und Menge der RNA wurde an einem RNA/DNA Messgerät ausgewertet und kontrolliert.

Beim Umschreiben der RNA in cDNA wurde eine Endkonzentration von 2.000ng/11,5µl Lösungsvolumen angestrebt. Daher musste ein Teil der isolierten RNA im Regelfall mit Wasser verdünnt werden. Es gilt: $V(\text{Wasser}) = 11,5\mu\text{l} - V(\text{RNA})$, wobei $V(\text{RNA}) = 2.000\text{ng}/(\text{RNA-Konzentration}[\text{ng}/\mu\text{l}])$. Das Umschreiben erfolgte mit dem Protokoll des SCRIPT cDNA Synthesis Kit von Jena Bioscience. Hierfür wurde zunächst der Master-Mix des Kits vorbereitet, wobei n = Anzahl der Proben, welche in cDNA umgeschrieben werden sollen:

1. Primer (oligoDT): (n+1) * 0,5µl
2. Primer 2: (n+1) * 0,5µl
3. RT-Puffer: (n+1) * 4µl
4. dNTP Mix: (n+1) * 1µl
5. DTT (n+1) * 1µl
6. RNase Inhibitor: (n+1) * 1µl
7. Reverse Transkriptase: (n+1) * 0,5µl

11,5µl der RNA-Lösung wurden mit 8,5µl des Master-Mix und 180µl RNase freiem Wasser ergänzt und in ein Reaktionsgefäß überführt. In einem Thermal Cycler wurde schließlich das Umschreiben abgeschlossen. Die cDNA wurde bei -20°C gelagert.

2.2.5.2 PCR

Der Master-Mix wurde je nach Herstellerangabe entsprechend der vorhandenen Primer vorbereitet. Dabei galten folgende Mischverhältnisse:

$$m = (a \text{ (Anzahl der Proben)} + 2 \text{ (Positiv- und Negativkontrolle)} + 1) * 2$$

1. 2x GreenTaq: 6 * m µl
2. Pro Primer: 1 * m µl
3. Wasser: (6 - (Anzahl an Primer)) * m µl

Eine Liste mit den in dieser Forschungsarbeit verwendeten Primer findet sich in Kapitel 2.1.6. In Eppendorf-Streifen wurden jeweils 0,5µl der Probe und 24µl des Master-Mix gegeben. Zur Qualitätskontrolle wurden stets auch geeignete Negativkontrollen (wie im Ergebnisteil angegeben, häufig cDNA einer Wildtyp-Maus) und Positivkontrollen (wie im Ergebnisteil angegeben) hinzugefügt. Die Proben wurden gut durchmischt und anschließend kurz zentrifugiert. Im PCR Cycler wurde das entsprechende Programm eingestellt und die Eppendorf-Streifen in den Cycler gestellt. Die jeweiligen verwendeten Programme zu den Primern finden sich in Kapitel 2.1.6.

Für die Gelelektrophorese wurde 150ml TAE-Puffer mit 2,25g Agarosepulver in einem Messzylinder angerührt und in einer Mikrowelle aufgekocht, bis die Flüssigkeit klar war. 3µl PEQ-green wurde pro 100ml Agarose hinzugefügt und in den Gelschlitzen mit 24-Kämmen gegossen. Das Gel wurde nach 15 Minuten fest und in die Wanne für die Elektrophorese gelegt. Die Wanne wurde mit TAE-Puffer aufgefüllt, bis das Gel

bedeckt war und jeweils 20µl Probe in die Kammerlöcher gefüllt. Schließlich wurden 125V mit 200mA Strom angeschlossen und 20-25 Minuten laufen gelassen. In einem UV-Transilluminator wurden die Proben schließlich ausgewertet.

2.2.6 Proteinanalyse

2.2.6.1 Protein-Aufreinigung

Es wurden zwei 15ml Falcons beschriftet und gewogen. Analog zur Beschreibung in Kapitel 2.2.3.1 wurde in beide Falcons jeweils 10ml LB-Medium und Ampicillin (Endkonzentration 100mg/l) gegeben und von den Stammkulturen *E. coli* Cre und *E. coli* GFP ergänzt. Die Kultur wurde bei 37°C für 12-18 Stunden bei 150-250rpm inkubiert. Danach wurden die Falcons für 10 Minuten bei 4°C und 4.000*g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Bakterienpellet in ein wenig eiskaltem PBS resuspendiert und in ein 50ml Falcon übertragen. 40 ml eiskaltes PBS wurden addiert und anschließend 10 Minuten bei 4°C und 4000*g zentrifugiert. Das Pellet wurde erneut in 40ml PBS resuspendiert und der Zentrifugationsschritt wiederholt. Dieser Waschvorgang wurde insgesamt 3x ausgeführt. Das Falcon wurde erneut gewogen, um die Zellmasse zu bestimmen. Anschließend wurden die Bakterien in 1 ml Lysepuffer pro Gramm Zellmasse resuspendiert.

Für die Isolation der Proteine aus OMV wurden die OMV isoliert (siehe Kapitel 2.2.4) und anschließend ebenfalls der Lyse-Puffer addiert. Der Lysepuffer bestand aus 50mM Tris-HCL pH 7,5, 80mM NaCL, 5mM DTT und 1mM PMSF. Die Lösung wurde für 10 Minuten auf Eis gestellt. Um die Zellen mechanisch weiter zu lysieren wurde die Lösung 10x je 10 Sekunden mit Ultraschall (f=20 kHz, Amplitude = 50%) behandelt. Dazwischen erfolgten jeweils 30 Sekunden Abkühlung in Eis. Anschließend wurden 3µl 1M DTT je 1ml Zellysat hinzugegeben, in ein 2ml Eppendorf Reaktionsgefäß überführt und 20 Minuten auf Eis gestellt.

2.2.6.2 Bradford Assay

Die Lysate wurden 10 Minuten bei 4°C und 18.000*g zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein frisches Tube übertragen. Nun wurde Roti-Quant im Verhältnis 1:5 mit ddH₂O verdünnt. Eine BSA-Standardreihe wurde mit jeweils 0/1/2/4/8/16µl vorbereitet und auf 1ml mit dem verdünnten Roti-Quant aufgefüllt. Als nächstes wurden je 1µl der Proben in ein neues Tube gegeben und auf 1ml mit verdünntem Roti-Quant aufgefüllt.

In einer 96-Well Platte wurden jeweils 200µl der BSA-Reihe und der Proben aufgetragen. An einem ELISA-Reader wurden die Proben ausgewertet. Mit Hilfe des BSA-Standards wurden dann die Konzentrationen der Proteine in den jeweiligen Lösungen berechnet. Dies erfolgte durch ein Absorptionsspektrum bei 595nm, welche durch die Menge an vorhandenem Protein beeinflusst wurde. Das Volumen der Ausgangsprobe wurde so berechnet, dass 10ng Proteine in einen PCR-Streifen überführt werden. Dazu wurden 6,25µl 4x Ladepuffer gegeben und mit Zellysepuffer auf 25µl aufgefüllt. Die Lösung wurde im PCR-Streifen für 5 Minuten bei 95°C erhitzt.

2.2.6.3 Proteinauftrennung

Die Proteinauftrennung der vorhandenen Proben erfolgte durch eine SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese, kurz SDS-Page. Hierfür wurden die Proben in ein MiniProtean-TGX Gel geladen und schließlich die Laufkammer mit SDS-Page Puffer gefüllt. Am Rande des Gels wurde außerdem 10µl eines Protein-Größenstandards gegeben. Die Auftrennung wurde zunächst mit 150V für 5-10 Minuten gestartet und schließlich mit 200V fortgesetzt, bis die Lauffront das untere Ende des Gels erreicht hatte. Das Gel wurde aus der Halterung getrennt und im Chemidoc mit dem vom Hersteller gelieferten Programm "Protein Gel-stain free gel" 45 Sekunden lang aktiviert.

2.2.6.4 WesternBlot

Das Gel wurde zusammen mit zwei Lagen Whatman-Papier und einer in Methanol aktivierten PVDF-Membran in eine Blottingkammer gelegt. Nach erfolgreicher Transferierung über das Bio-Rad Turboblot-System, wurde die Membran mit TBS-T gewaschen. Als nächstes erfolgte die Blockade unspezifischer Bindungsstellen der Probe. Hierfür wurde 5% Milchpulver in TBS-T gelöst und schließlich eine Stunde lang bei Raumtemperatur aufgetragen. Die Membran wurde danach drei Mal 5 Minuten lang mit TBS-T gewaschen. Danach wurde der Primärantikörper in 5% Milch über Nacht bei 4°C auf die Membran gegeben. Die jeweiligen Verdünnungen für die Primärantikörper finden sich in Kapitel 2.1.8. Nach mindestens 8 Stunden wurde die Membran erneut drei Mal 5 Minuten lang mit TBS-T gewaschen. Anschließend wurde der Sekundärantikörper in 5% Milch eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde wieder drei Mal für 5 Minuten mit TBS-T gewaschen. Zur Darstellung

der Proteine wurde Amersham ECL Prime Substrat verwendet und mit dem Amersham ImageQuant abgebildet.

2.2.7 Zellkulturen

2.2.7.1 Dünndarm-Organoid

Der Dünndarm wurde der Maus entnommen und mit eiskalten PBS gespült. Der Darm wurde längs geöffnet und die Villi mit Hilfe eines Deckglases vorsichtig durch kratzende Bewegungen entfernt. Der Darm wurde in Stücke von 2-4mm Länge geschnitten und schließlich in ein 50ml Falcon mit 20ml PBS übertragen. Die Teile wurden mit Hilfe eines Vortexmischers mehrfach gewaschen. Anschließend wurde ein kalter Kryptenisolationspuffer (siehe Kapitel 2.1.5) hinzugefügt und bei 4°C unter ständiger Bewegung auf einem Rollenmischer 20-30 Minuten lang inkubiert. Der Überstand wurde entfernt und die Darmfragmente erneut mit kaltem PBS über einen Vortexmischer gewaschen. Der Überstand wurde als nächstes durch ein 70µm Zellsieb gegeben und das Filtrat in einem 50ml Falcon aufgefangen. Dieses Vorgehen wurde so lange wiederholt, bis die Krypten im Falcon gesammelt waren. Diese wurden nun bei 4°C bei 300*g für 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt und das Pellet in 10ml eiskaltem Waschpuffer (siehe Kapitel 2.1.5) resuspendiert. Die Lösung wurde in ein 15ml Falcon übertragen und anschließend bei 4°C und 300*g 5 Minuten lang zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet in 2ml BCM resuspendiert und bei 4°C und 200*g 3 Minuten lang zentrifugiert. Nach diesen Waschvorgängen wurden 100µl der Lösung mikroskopiert. Hierbei wurde die notwendige Korrektur des BCM-Volumens abgeschätzt, um eine optimale Dichte der Krypten zu gewährleisten. Schließlich wurde das benötigte Volumen bei 4°C und 200*g 2 Minuten lang zentrifugiert, der Überstand entfernt und das Pellet in 25µl Matrigel pro geplantem Well resuspendiert. Auf einer 48-well Platte wurden jeweils 25µl der Matrigel-Organoid Mischung pro well ausplattiert. Nachdem sich das Matrigel verfestigt hat, wurde 250µl Kulturmedium (siehe Kapitel 2.1.5) hinzugefügt. Die Organoiden wurden im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert.

Damit tote Zellen und Schadstoffe das Wachstum der Organoiden nicht verhindern, mussten die Kulturen regelmäßig gereinigt werden. Hierfür wurde zunächst das Nährmedium entfernt und die Organoiden anschließend mit Hilfe von Waschpuffer durch gewissenhaftes Auf- und Abpipettieren aus dem Matrigel gelöst. Die Lösungen

wurden in einem 15ml Falcon gepoolt und anschließend bei 4°C und 200*g 5 Minuten lang zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet für einen weiteren Waschschrift in 2ml frischem Waschpuffer resuspendiert. Danach wurde wieder bei 4°C und 200*g 5 Minuten lang zentrifugiert. Dies wurde so oft wiederholt, bis der Überstand klar war. Als letzter Schritt wurde das Pellet in 25µl Matrigel pro Well resuspendiert und auf eine neue Well-Platte aufgetragen. Nach Festwerden des Gels wurde Nährmedium hinzugefügt und die Organoide in den Brutschrank gelegt.

2.2.7.2 Immuzellisolation

Zunächst wurde die Milz und die Peyer-Plaques der Maus isoliert. Durch einen 40µm Zellfilter wurde das Gewebe mit Hilfe von Druck- und Scherbewegungen in je ein 50ml Falcon gedrückt. Dabei wurde regelmäßig mit DMEM gespült. Nachdem die Milz und Follikel vollständig zerkleinert waren, wurden die Zellen bei 4°C und 300*g 5 Minuten lang zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen in 5ml ACK-Lysepuffer (siehe Kapitel 2.1.5) resuspendiert. Nach 5 Minuten Abdunkelung bei Raumtemperatur wurde 15ml DMEM hinzugegeben und erneut bei 4°C und 300*g 5 Minuten lang zentrifugiert. Das Pellet aus Milzzellen wurde in 10ml DMEM aufgenommen, die der Peyer Plaques in 4ml DMEM. Um die Dichte abzuschätzen, wurde ein kleiner Teil der Zelllösung 1:10 mit DMEM verdünnt und 1:10 mit Trypanblau gefärbt. In einer Neubauerzählkammer wurden die Zellen mikroskopiert und so kalkuliert, dass 1 Million Zellen pro Cokultur verwendet werden können. Um die Zellen unter einem Fluoreszenzmikroskop zu erkennen, wurden sie angefärbt. Hierfür wurden die Zellen zunächst abzentrifugiert und in warmen PBS mit 5mM CFSE grün resuspendiert. Nach 15 Minuten bei 37°C Inkubation wurden sie wieder abzentrifugiert und anschließend in 5ml vorgewärmten DMEM gelöst. Die Zellen wurden für weitere 30 Minuten im DMEM inkubiert und dabei alle 10 Minuten mit Hilfe eines Vortex gemischt. Es folgte eine letzte Zentrifugation bei 4°C und 300*g für 5 Minuten. Das Pellet wurde in frischem Medium resuspendiert und konnte schließlich bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert werden.

2.2.7.3 Organoid und Immuzell Cokultur

Adulte Dünndarmorganoide (siehe Kapitel 2.2.7.1) aus VilCre-positiven Mäusen und einer Wildtyp-Maus zur Kontrolle wurden mit Hilfe von Waschpuffer aus dem Matrigel

gelöst, gepoolt und anschließend bei 4°C und 200*g 5 Minuten lang zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 2ml Waschpuffer gelöst. 100µl wurden unter dem Mikroskop ausgewertet und die Dichte an Organoiden bestimmt. Das zu entnehmende Volumen für die Cokultur wurde so berechnet, dass 50 Organoide/Well ausplattiert werden können. Dies wurde bei 4°C und 200*g 5 Minuten lang zentrifugiert. Die Organoide wurden in Medium gelöst und 1 Million Immunzellen aus der Milz (siehe Kapitel 2.2.7.2) einer Rosa26.tdTomato Maus pro geplantem Well hinzugegeben. Die Hälfte der Lösung, Gruppe 1, wurde in ein neues Falcon übertragen und abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 25µl Matrigel je Well resuspendiert, ausplattiert und nach dem Aushärten Nährmedium hinzugefügt. Die andere Hälfte, Gruppe 2, wurde erst eine Stunde bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert, bevor sie gemeinsam in Matrigel ausplattiert wurden. Die Cokulturen wurden danach mit verschiedenen Entzündungsmediatoren stimuliert. Jeweils 4 Wells der beiden Gruppen erhielten dabei dieselbe Stimulation. Dies waren PBS zur Kontrolle, LPS (300ng/ml), INFγ + TNFα (100ng/ml) oder PolyIC (300ng/ml).

Die Immunzellen aus den Peyer-Plaques einer Rosa26.tdTomato Maus wurden analog zu Gruppe 1 inkubiert. Die Stimulationsgruppen bestanden aus PBS und LPS (300ng/ml). Nach 6 Stunden, 18 Stunden und 42 Stunden wurden die Immunzellen mit Hilfe konfokaler Laser-Scanning-Fluoreszenzmikroskopie auf Rekombination untersucht.

2.2.7.4 Immunzellstimulation mit EV aus Organoidkulturen

Zunächst wurden Dünndarmorganoide aus einer Wildtyp-Maus, einer VilCre-positiven Maus und einer VilCre-positiven Maus mit Casp8 Mangel isoliert (siehe Kapitel 2.2.7.1). 7 Tage später wurden die adulten Organoide in zwei Gruppen aufgeteilt. Die erste Gruppe wurde als Kontrolle mit sterilem PBS stimuliert, die zweite Gruppe erhielt 250ng/ml TNFα. Nach 8 Stunden Inkubation wurde das Nährmedium abgenommen und bei -20°C gelagert.

Vier 8-Kammer Chamber Slides wurden mit anti-CD3 Antikörpern gecoatet und anschließend über Nacht mindestens acht Stunden bei 4°C gelagert. Am darauffolgenden Tag wurden aus der Milz einer Rosa26.tdTomato Maus Immunzellen isoliert, gefärbt (siehe Kapitel 2.2.7.2) und jeweils 250.000 Zellen je Kammer aufgetragen. Chamber Slide 1 erhielt keinen weiteren Zusatz. Chamber Slide 2 wurde

mit TNF α (250ng/ml), Chamber Slide 3 mit anti-CD28 Antikörpern und Chamber Slide 4 mit TNF α (250ng/ml) und anti-CD28 Antikörpern stimuliert. Alle Chamber wurden mit Zombie-labeling im infraroten Lichtbereich versetzt. Eine Kontrolle der Zellkulturen erfolgte über Konfokale Lasermikroskopie 6, 12 und 24 Stunden, sowie an den Tagen 2, 3, 4 und 5 nach Stimulation.

2.2.7.3 Injektion Dünndarmorganoide

Nach der Isolation wurden die Zellen zu adulten Organoiden herangezogen. Danach wurden sie mit Hilfe von Waschpuffer aus dem Matrigel gelöst und schließlich in 2-Kammer Chamber Slides mit 200 Organoiden/Kammer ausplattiert. Diese wurden mit je 1ml Nährmedium versorgt. Weiterhin wurde eine der Kammern 60 Minuten vor Mikroinjektion mit dem Dynamin-Inhibitor Dynasore (80 μ M) versetzt. Die andere Gruppe erhielt als Kontrolle dasselbe Volumen DMSO. Die Injektionslösung bestand aus den von *E. coli* Cre isolierten OMV, oder aus einer Mischung von *E. coli* Cre und *E. coli* GFP Bakterien. Für letztere wurde je 0,5ml der Bakterienkulturen bei einer OD600 von 1,0 entnommen, gepoolt, zentrifugiert und in 1ml sterilem PBS gelöst. Injiziert wurde das Material mit Hilfe der Pneumatic PicoPump von World Precision Instruments. Diese funktionierte mit Druckluft mit einer Fließgeschwindigkeit von 3l/h. Die dafür benötigten Kapillaren wurden mit Hilfe des Pul 1000 Kapillarenzieher von World Precision Instruments hergestellt. Nach 7 und 20 Stunden wurden Bilder mit Hilfe eines Konfokalmikroskops aufgenommen.

2.2.8 Statistische Analysen

Die Daten wurden, wenn nicht anders deklariert, in einem Dotplot mit Mittelwert und Standardabweichung dargestellt. Die statistische Analyse und Graphendarstellung erfolgte mit dem Statistikprogramm GraphPad Prism 9, USA. Der Vergleich zwischen zwei unabhängigen Gruppen wurde mit dem ungepaarten t-Test durchgeführt, bei drei Gruppen oder mehr eine einfaktorielle Varianzanalyse (ANOVA). Alle P-Werte von 0,05 oder weniger wurden als signifikant bewertet und als * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$ und **** $p \leq 0,0001$ dargestellt.

3. Ergebnisse

3.1 Distribution extrazellulärer Vesikel

3.1.1 LPS-induzierte Inflammation verändert EV-Aufnahme *in-vivo*

Um die Verteilung epithelialer extrazellulärer Vesikel und die enthaltenen Biomoleküle, wie mRNA, unter physiologischen und inflammatorischen Bedingungen zu untersuchen, wurden Vil1CrexRosa26.tdTomato Mäuse eingesetzt.

Diese Mäuse zeigten im Gt(ROSA)26Sor Locus eine durch zwei loxP Kassetten flankierte STOP-Kassette. Die verhinderte die Expression des rot-fluoreszierenden Proteins tdTomato, welche durch einen starken CAG-Promotor angetrieben wurde. Durch eine Cre-Rekombinase konnte die STOP-Kassette ausgeschnitten werden um die Transkription der tdTomato-mRNA zu ermöglichen. In diesem Fall wurde die Cre-Rekombinase mit dem Villin Promoter gekoppelt. Villin war ein gewebsspezifisches Protein, welches in den Epithelzellen des Darms vorkam (Rutlin et. al., 2020). Mit diesem System war es möglich, die Verteilung der extrazellulären Vesikel von Epithelzellen des Darms zu verfolgen. Die Epithelzellen des Darmes wurden aufgrund der direkten Kopplung des Villin Promoters mit der Cre-Rekombinase farblich markiert und leuchteten unter Fluoreszenzmikroskopie in diesem Mausmodell deutlich rot. Epithelzellen konnten wie alle anderen Zellen Vesikel herstellen und in die Extrazellulärmatrix abgeben. Die in die Vesikel geladene Cre konnte von distalen Organen und Zellen aufgenommen werden und ermöglichte so die Expression des tdTomato-Signals.

Zunächst wurden die Darmabschnitte der Mäuse unter physiologischen Bedingungen untersucht. Eine HE-Färbung wurde durchgeführt, um den Darm auf Entzündungskennzeichen und die Integrität des Epithels zu untersuchen. Unter homöostatischen Bedingungen zeigten sich in den HE-Färbungen ein physiologisches Bild des Darms (siehe Abb. 5A). Die Dünndarmzotten zeigten sich regelmäßig angeordnet, die Epithelzellen standen als einschichtiges Zylinderepithel. In der Fluoreszenzmikroskopie leuchteten die Epithelzellen kräftig rot. In der Lamina propria hingegen zeigten sich keine bis sehr wenige tdTomato positive Zellen (Abb. 5B). Diese Beobachtungen konnten sowohl im Jejunum wie auch im Ileum gemacht werden.

Um den Einfluss einer Entzündung auf die Kommunikation zwischen dem Darmepithel und dem darunterliegenden mukosalen Immunsystem genauer zu untersuchen, wurde eine weitere Gruppe von Mäusen an zwei aufeinander folgenden Tagen mit LPS behandelt. Auch bei diesen Mäusen wurde eine HE-Färbung durchgeführt. Hier war insbesondere im direkten Vergleich mit der Kontrollgruppe ein deutlicher Unterschied erkennbar. Das Darmepithel zeigte sich schwach und lückenhaft, die Zotten waren verkürzt, es kam zu einem pathologischen Shedding. Shedding selbst war ein physiologischer Vorgang, bei dem sterbende Epithelzellen zum Lumen hin abgeschilfert werden, um jüngeren Zellen Platz zu bieten. Bei einer Entzündung kam es jedoch zu überschießendem Shedding, bei dem nicht genügend gesunde Zellen nachwachsen, sodass es zu Lücken und Erosionen im Epithel kam (Williams et al., 2015). Dieses Phänomen war deutlich zu erkennen (Abb. 5A). In der Fluoreszenzmikroskopie waren in der Lamina propria viele Zellen tdTomato-positiv, sodass sie rot leuchtend erschienen (Abb. 5B).

Für eine Auswertung der Unterschiede von Abgabe bzw. Aufnahme der Vesikel im Darm, wurden tdTomato-positive Zellen innerhalb der Zotten, genauer in der Lamina propria, ausgezählt und notiert. Hierbei wurde auch auf Unterschiede innerhalb verschiedener Darmabschnitte, dem Jejunum und dem Ileum, geachtet. Bei der Auszählung tdTomato-positiver Zellen war ein deutlicher Unterschied zwischen den Mäusen mit und ohne LPS-Behandlung zu erkennen.

In der LPS-Gruppe zeigte sich außerdem ein weiterer Unterschied in der Verteilung der tdT-positiven Zellen zwischen Jejunum und Ileum (siehe Abb. 5C).

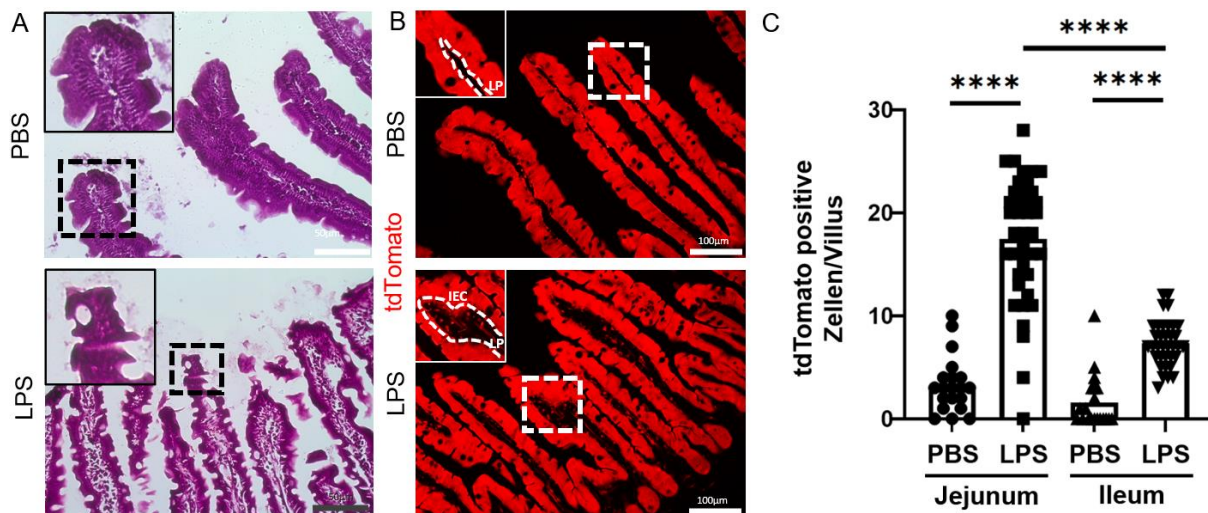


Abbildung 5: Einfluss von LPS auf das Dünndarmepithel

Vil1CrexRosa26.tdTomato Mäuse wurden intraperitoneal mit LPS (LPS) oder zur Kontrolle mit sterilem PBS (PBS) behandelt. Das Jejunum wurde in beiden Gruppen mit einer HE-Färbung gefärbt (A). Dabei zeigten sich deutliche Unterschiede in der Epithelintegrität und dem Ausmaß an Shedding. Die zweite Bildreihe (B) zeigt beispielhaft einen Ausschnitt aus dem Jejunum ungefärbt. Die rote Fluoreszenz entstand durch die Expression des tdTomato-Proteins, welches aufgrund der Cre-Rekombinase in Epithelzellen (IEC) gebildet werden konnte. Mäuse der LPS-Gruppe zeigten im Gegensatz zur Kontrollgruppe viele tdTomato-positive Zellen in der erweiterten Lamina propria (LP). Diese Zellen wurden an zufälligen Zotten im Jejunum und Ileum ausgezählt. Jeder Punkt stand für die Anzahl der tdT-positiven Zellen je Villus (C). Der Vergleich zeigte signifikante Unterschiede zwischen den beiden Gruppen, wie auch zwischen den Darmabschnitten in der LPS-Gruppe. Statistische Analyse: Einfaktorielle Varianzanalyse mit Tukey-Methode für Mehrfachvergleiche; **** $p \leq 0,0001$).

3.1.2 Verschiedene Zelltypen sind an der EV-Kommunikation beteiligt

Um genauer zu untersuchen, welche Zelltypen in der Lamina propria die von den Epithelzellen entsandten extrazellulären Vesikel aufnehmen und die darin enthaltene mRNA transkribieren, oder funktionsfähige Cre-Proteine aufnehmen, wurden verschiedene Färbungen via Immunhistochemie durchgeführt.

Um einheitliche Ergebnisse zu erzielen, musste zunächst die Art der Immunhistologie festgelegt werden. Hierfür wurde sowohl die Kryostat-Histologie wie auch die Paraffin-Histologie in Betracht gezogen. Da jedoch das tdTomato-Signal in der Paraffin-Histologie gänzlich verloren ging, was eine Beurteilung der Vesikel-Verteilung

verhinderte, wurde im Rahmen dieser Dissertation ausschließlich mit kryokonserviertem Gewebe weitergearbeitet.

Um die Rolle der in der Lamina propria residenten Immunzellen in der Vesikel-Kommunikation zu überprüfen, wurden die Darmschnitte auf typische Marker gefärbt. So konnten Kolokalisationen des tdTomato-Signals mit Zellen, welche F4/80 und MPO exprimierten, visualisiert werden. Typische Träger dieser Proteine waren Makrophagen, sowie Leukozyten. Der Marker für T-Zellen, CD3, zeigte jedoch nur sehr wenige Kolokalisationen mit tdTomato.

Durch ihre räumliche Nähe zum Dünndarmepithel wurden auch Fibroblasten mit dem Marker Col1 angefärbt (Roulis & Flavell 2016). Erneut sind deutliche Kolokalisationen mit dem tdTomato Protein in der Lamina Propria erkennbar.

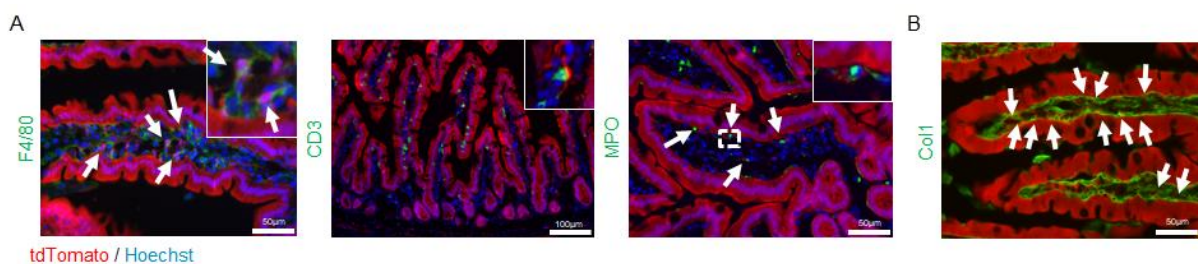


Abbildung 6: Immunhistologie zur Identifikation EV-aufnehmender Zellen

Vil1CrexRosa26.tdTomato Mäuse wurden intraperitoneal mit LPS behandelt. Daraufhin wurden Schnitte des Jejunums mit Hoechst (blau) gefärbt, um die Zellkerne sichtbar zu machen. Um den Zelltyp der tdT exprimierenden Zellen zu ermitteln, wurden verschiedene Antikörperfärbungen durchgeführt. A zeigt Färbungen auf Zellen des Immunsystems. Der Makrophagenmarker F4/80 und Marker für neutrophile Granulozyten MPO zeigten deutliche Kolokalisationen mit tdT (weiße Pfeile). Der Intraepitheliale Lymphozytenmarker CD3 zeigte nur wenige Überschneidungen (beispielhaft in der Vergrößerung). Der Fibroblastenmarker Col1 zeigte viele Kolokalisationen mit tdT-positiven Zellen (B, weiße Pfeile).

3.1.3 Mukosale Entzündung fördert die Vesikeldistribution

Nicht nur die lokale Verteilung extrazellulärer Vesikel aus Darmepithelzellen war für diese Arbeit von Interesse, sondern auch die systemische Zirkulation und damit mögliche Kommunikation mit peripheren Organen. Dafür wurden Schnitte der Leber und des Gehirns der beiden Gruppen untersucht.

Die Leber stellte als erstes hämatogen erreichtes Organ eine gute Anlaufstelle für extrazelluläre Vesikel des Darms dar. Um die Translokation der EV zu überprüfen, diente auch hier wieder die rote Fluoreszenz des tdTomato-Proteins. Dafür wurde 1 cm² der Leberschnitte unter dem Fluoreszenzmikroskop fotografiert und die tdT-positiven Zellen ausgezählt. Besonders auffällig war hierbei, dass kein direkter Unterschied zwischen der Kontrollgruppe (PBS) und der LPS-Gruppe (LPS mild) ausgemacht werden konnte. Stattdessen zeigte nur eine Gruppe (LPS stark) besonders viel Rekombination (Abb. 7A und 7D). Die Unterteilung in LPS mild und LPS stark erfolgte bereits bei Versuchsdurchführung. Obwohl die Mäuse verhältnismäßig zu ihrem Startgewicht dieselbe Menge LPS bekamen, zeigte sich ein großer Unterschied in der Reaktion darauf. LPS stark reagierte mit verringerter Nahrungsaufnahme, größerem Temperaturverlust, sowie früher mit ersten Anzeichen von Schmerzen im Vergleich zu LPS mild.

Um die Zelltypen der Leber zu bestimmen, die die meisten Vesikel aufnehmen, wurden erneut verschiedene Immunhistofärbungen durchgeführt. Kollokalisierungen waren hierbei beim Endothelzellmarker CD31 (Abb. 7B) und beim Makrophagenmarker F4/80 erkennbar. (Abb. 7C)

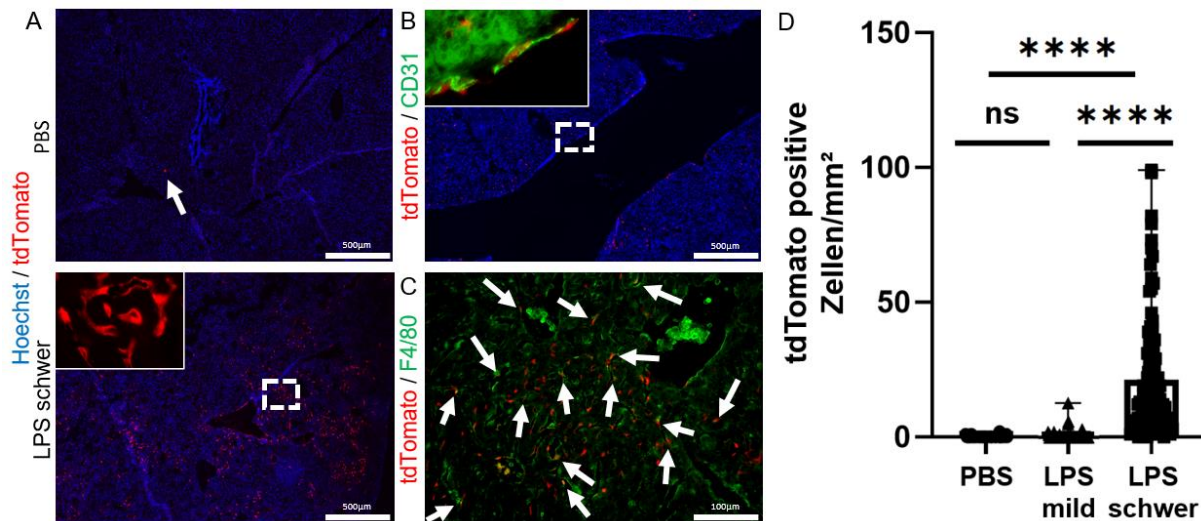


Abbildung 7: Aufnahme von EV aus dem Darm in der Leber

Vil1CrexRosa26.tdTomato Mäuse wurden intraperitoneal mit LPS (LPS mild & LPS schwer) oder zur Kontrolle mit sterilem PBS (PBS) behandelt. Obwohl sie unterschiedlich behandelt wurden, zeigten die Gruppen PBS und LPS mild ein ähnlich dichtes Aufkommen an tdT-positiven Zellen (Pfeil) in der Leber (A, Bild repräsentativ von LPS mild). Im Gegensatz dazu stand die Leber der Gruppe LPS stark (A, LPS schwer). Obwohl LPS mild und LPS schwer verhältnismäßig dieselbe Menge an LPS verabreicht wurde, zeigte die Leber von LPS schwer signifikant mehr tdT-positiv Zellen als die anderen beiden Gruppen (D). Hierfür wurden rot fluoreszierende Zellen von insgesamt 1cm² Leber ausgezählt. Ein Punkt steht für die Anzahl tdT-positiven Zellen in 1 mm². Ein signifikanter Unterschied zwischen PBS und LPS mild bestand nicht. Statistische Analyse: Einfaktorielle Varianzanalyse mit Tukey-Methode für Mehrfachvergleiche; ns p>0,05; **** p≤0,0001. Immunhistofärbungen in der Leber (LPS schwer) wurden durchgeführt, um die Art der Zellen zu identifizieren, die tdTomato exprimierten. Hierbei zeigten sich Kolokalisationen mit dem Endothelzellmarker CD31 (B) und beim Makrophagenmarker F4/80 (C).

Im Gehirn zeigte sich das gleiche Bild wie in der Leber. Bei der Gruppe LPS schwer wurden viele Zellen rekombiniert, insbesondere an den Gefäßen und im Hippocampus. Mäuse der Gruppen PBS und LPS mild zeigten keine Zeichen einer Rekombination.

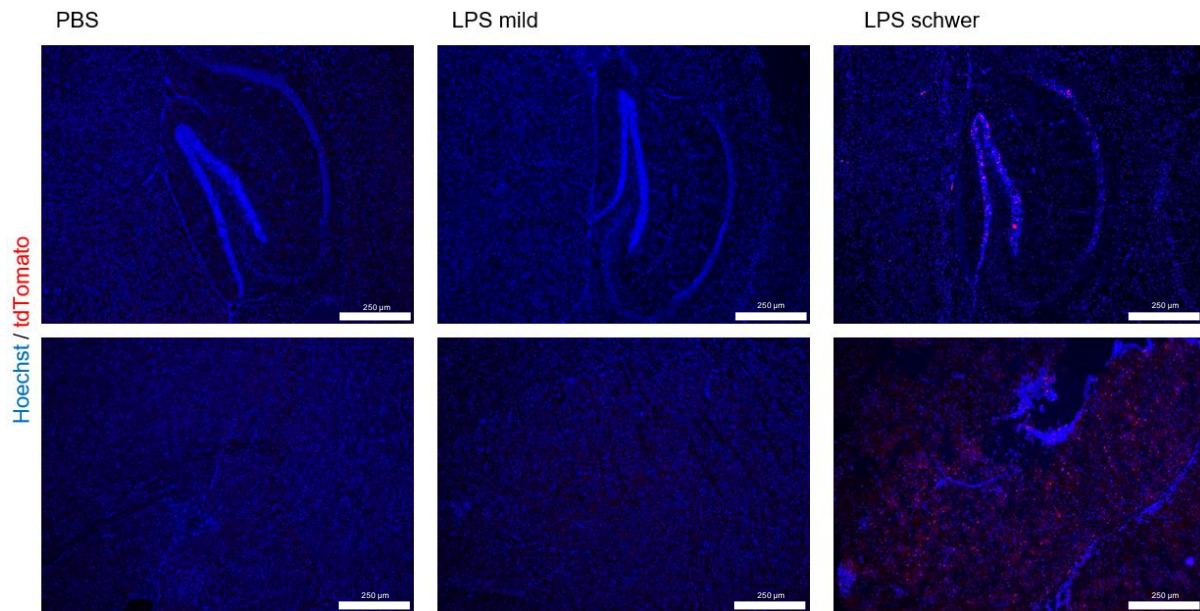


Abbildung 8: EV-Distribution im Gehirn

Vil1CrexRosa26.tdTomato Mäuse wurden intraperitoneal mit LPS (LPS mild & LPS schwer) oder zur Kontrolle mit sterilem PBS (PBS) behandelt. Die Bilder zeigen Schnitte des Gehirns, in der oberen Reihe der Hippocampus, in der unteren Reihe eine repräsentative Stelle des Großhirns. Bei LPS schwer waren deutliche und viele Rekombinationen durch das rot fluoreszierende Protein tdTomato zu erkennen. Die beiden anderen Mäuse zeigten keinerlei Anzeichen für die Anwesenheit von tdT.

3.1.4 T-Zellen zeigen in-vitro keine Hinweise auf Aufnahme von epithelialen extrazellulären Vesikeln

In Kapitel 3.1.2 konnte gezeigt werden, dass T-Zellen im Vergleich zu anderen Immunzellen und Fibroblasten trotz ähnlich häufigen Aufkommens und der relativen Nähe zum Epithel sehr wenig tdTomato exprimierten. Um diese Beobachtung auch in-vitro zu verifizieren, wurden zwei verschiedene Experimente mit Zellkulturen durchgeführt.

Im ersten Versuch wurden Organoide aus den Dünndarmkrypten von Mäusen isoliert, welche dem VillinCre fl/fl Genotyp angehörten. Durch die Kopplung der Cre-Rekombinase mit dem Villin-Promotor, sind sie in der Lage, extrazelluläre Vesikel mit der Cre-mRNA zu beladen und diese in die extrazelluläre Matrix abzugeben. Die Immunzellen wurden aus der Milz und den Peyer-Plaques des Darms isoliert. Diese stammten dabei von Tieren, welche dem Rosa26.tdTomato-Typ angehörten. Zellen

konnten so nach Rekombination durch die Cre-Rekombinase das tdTomato-Protein exprimieren und damit die Aufnahme extrazellulärer Vesikel anzeigen. Bevor die Immunzellen mit den Organoiden zusammengebracht wurden, erfolgte ein CFSE-labeling in grüner Fluoreszenz. In einer Neubauer Zählkammer wurden die lebenden Zellen gezählt und schließlich rund eine Million Immunzellen mit ungefähr 50 ausgewachsenen Organoiden in je einem Well zusammen inkubiert. Die Co-Kulturen mit Organoiden, welche aus Wildtyp-Mäusen gewonnen wurden, dienten hierbei als Kontrolle. Um eine ähnliche Entzündungsreaktion wie im in-vivo Projekt zu erzeugen, wurden die in den insgesamt 36 Wells vorliegenden Organoide entweder mit PBS zur Kontrolle, 300ng/ml LPS, 100ng/ml INF γ + TNF α , oder 300ng/ml PolyIC behandelt. Die Untersuchung auf rekombinierte Immunzellen mit Hilfe konfokaler Laser-Scanning-Fluoreszenzmikroskopie erfolgte nach 6 Stunden, 18 Stunden und 42 Stunden.

Trotz des dichten Aufkommens von Immunzellen, bestätigt durch das CFSE-labeling, konnte keine rote Fluoreszenz visualisiert werden. Viele der Organoide verstarben schon wenige Stunden nach Beginn der Stimulation.

In einem zweiten und ähnlichen Setup wurde erneut auf die Möglichkeit der Rekombination durch EV-Aufnahme der Immunzellen getestet. Hierbei wurden wieder Organoide aus Mäusen mit unterschiedlichen Genotypen isoliert. Wildtyp-Organoide dienten als Kontrolle. Um eine besonders starke Inflammation zu simulieren, wurden neben VillinCre positiven Organoiden auch VillinCrexCasp8 fl/fl Organoide isoliert. Diese Mäuse zeigten eine Caspase 8 Defizienz im Darmepithel was zu chronischen Darmentzündungen führte (Günther et. al. 2011). Dieser Zustand wurde dementsprechend auch auf die isolierten Organoide übertragen. Die Organoide wurden 7 Tage nach der Isolation entweder mit TNF α , oder mit PBS zur Kontrolle behandelt. Nach 8 Stunden Inkubationszeit wurde das Medium abgenommen und bei -20°C gelagert.

Für die Immunzellisolation wurden zunächst vier 8-Kammer-Chamber-Slides mit jeweils 100 μ l CD3-Antikörpern (5 μ g/ml) benetzt und diese bei 4°C über Nacht gelagert. Dies führte zu einer Anheftung der Antikörper an der Oberfläche der Kammern, an welche wiederum die T-Zellen binden können. Am darauffolgenden Tag wurden die Immunzellen erneut aus der Milz von R26.tdT-Mäusen isoliert und mit CFSE-labeling farblich markiert. Rund 250.000 Zellen/well wurden zu den vorbehandelten Chamber-

Slides gegeben. Statt frischem Medium erhielten die Zellkulturen das gesammelte Medium der vorbehandelten Organoide. Zur Hälfte der Kulturen wurden auch noch 1µg/ml CD28-Antikörper gegeben, um den Einfluss der Aktivierung (June et. al. 1990) auf eine eventuelle EV-Aufnahme zu überprüfen. Außerdem wurden die Zellen mit Zombie-labeling in infrarot behandelt. Dieser Farbstoff wurde ausschließlich von toten Zellen aufgenommen und ermöglicht eine leichte Differenzierung zwischen toten und lebendigen T-Zellen. Aufnahmen der Zellkulturen wurden in 5 aufeinanderfolgenden Tagen mit Laser-Scanning-Fluoreszenzmikroskopie durchgeführt, um eventuelle tdTomato-Signale zu visualisieren. Trotz der hohen Dichte an lebendigen T-Zellen, bestätigt durch das Zombie- und CFSE-labeling, konnte auch in diesem Setup keine Rekombination festgestellt werden.

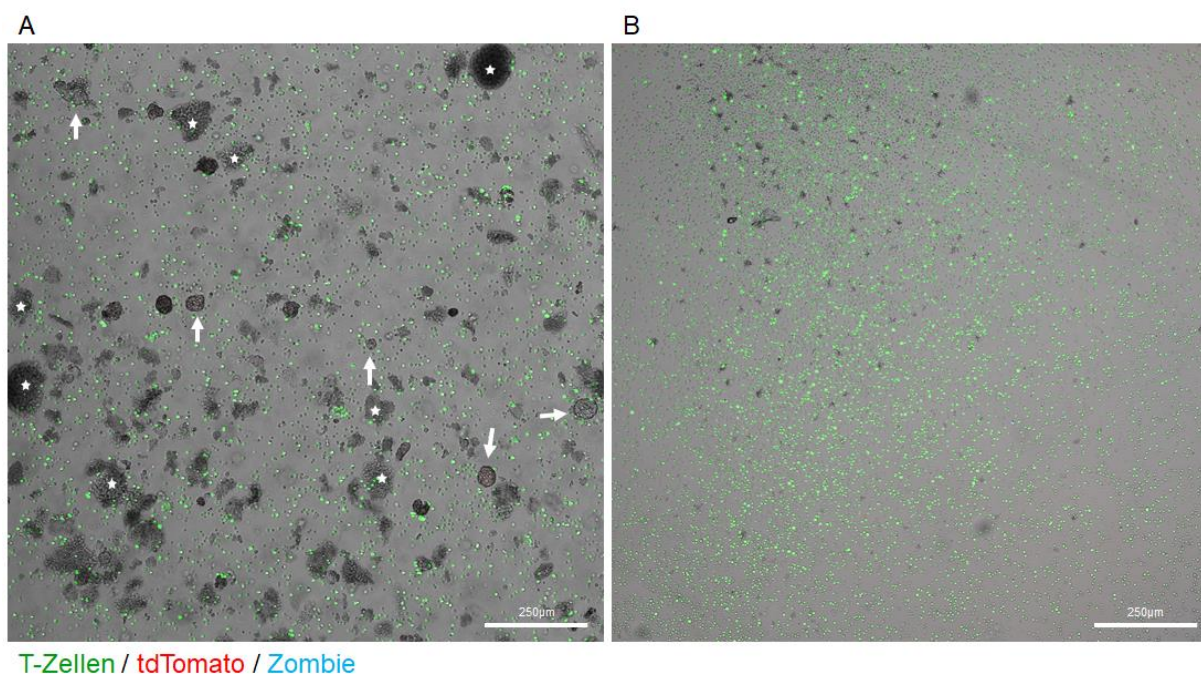


Abbildung 9: T-Zellen exprimieren kein tdTomato nach EV-Kontakt

Immunzellen aus Rosa26.tdTomato Zellen wurden aus der Milz isoliert und mit CFSE-Labeling grün markiert. Zur Unterscheidung wurde auch Zombie-labeling (türkis) hinzugefügt, um lebende von toten T-Zellen zu unterscheiden. Die Zellen hatten dabei direkten Kontakt mit lebenden (weiße Pfeile) und toten (Sterne) VilCre-positiven Organoiden (A). Außerdem wurde eine zweite Zellkultur (B) mit EV-angereichertem Medium von VilCre-positiven Organoiden angesetzt. Nach 5 Tagen Beobachtung unter konfokaler Laser-Scanning-Fluoreszenzmikroskopie war kein tdTomato-Signal (rot) erkennbar.

3.2 Mikroben-Wirt-Interaktionen über Outer membrane vesicles

3.2.1 *Escherichia coli* übertragen mRNA über Outer membrane vesicles

Um die Erkenntnisse der intraspezies Kommunikation durch extrazelluläre Vesikel zu erweitern, war ein Ziel dieser Arbeit Untersuchungen zu Mikroben-Host-Interaktionen über Outer Membrane Vesicles. Hierfür wurden 13 Mäuse, welche dem Rosa26.tdTomato Genotyp angehörten, in Quarantänekäfige versetzt und ab diesem Zeitpunkt steril gearbeitet. Die Mäuse wurden dabei in vier Gruppen eingeteilt: Gruppe 1 sollte einen *E. coli* Stamm per Magensonde erhalten, welcher eine Ampicillin-Resistenz und die Fähigkeit zur Transkription der Cre-Rekombinase hatte. Gruppe 2 erhielt per Fütterungssonde lediglich steriles PBS. Gruppe 3 erhielt sowohl den *E. coli* Cre Stamm wie auch eine intraperitoneale LPS-Gabe. Gruppe 4 erhielt als Kontrolle keine *E. coli* Bakterien, jedoch wurde auch ihnen LPS verabreicht. Die Gruppen wurden in verschiedenen Käfigen gehalten. An Tag 7 wurden alle Mäuse in frisch autoklavierte und saubere Käfige umgesetzt.

In den ersten 6 Tagen erhielten alle Mäuse, verabreicht über autoklaviertes Trinkwasser, Ampicillin, Vancomycin, Neomycin und Metronidazol, um eine Kolonisierung des *E. coli* Cre Stammes zu ermöglichen. Ab Tag 7 wurde dann das Leitungswasser nur noch mit Ampicillin versetzt. An den Tagen acht bis elf erhielten die Mäuse, je nach Gruppenzugehörigkeit, über die Fütterungssonde entweder *E. coli* Bakterien oder steriles PBS. Jeder Maus wurden dafür ungefähr 6×10^6 Bakterien zugeführt. Hierfür wurden die *E. coli* über Nacht angezüchtet und etwa 6 ml Kultur pro Maus bei einem OD-Wert von 1,0 für 10 Minuten bei 4°C und 4000*g abzentrifugiert (Bittel et. al 2021). Das daraus resultierende Pellet wurde in 200µl sterilem PBS/Maus gelöst. Die Kontrollgruppen erhielten je 200µl steriles PBS. Weiterführend erhielten die Gruppen 3 und 4 an Tag zehn und elf intraperitoneal 2,7 mg/kg KG LPS. Während der Durchführung des Experimentes wurde das Gewicht der Mäuse, sowie ihr Verhalten und Aussehen täglich überprüft. Vorher definierte Abbruchkriterien im Sinne des Tierschutzes wurden bei keiner Maus erreicht. An Tag zwölf wurden die Organe der Mäuse entnommen. Um das tdTomato-Signal in den histologischen Präparaten nicht zu verlieren, wurden die Organe für die Kryo-Histologie vorbereitet.

Von jeder Maus wurden Stuhlproben genommen und unter einer sterilen Arbeitsbank eine Verdünnungsreihe angefertigt. Die 5. und 6. Verdünnungsreihe wurden auf jeweils zwei LB-Agarplatten ausgestrichen. Dabei enthielt eine der Agarplatten Ampicillin, die andere war frei von Antibiotika. Nach etwa zwei Tagen Inkubation wurden die Agarplatten ausgewertet und die Anzahl der darauf wachsenden Kulturen gezählt. Der Stuhl von den Gruppen 1 und 3, welche zu den Mäusen gehörten, denen *E. coli* Cre Bakterien zugeführt worden sind, zeigte deutliches Wachstum auf beiden Agarplatten. Der Stuhl der Mausgruppen 2 und 4, welche keine Bakterien bekamen, zeigte weder auf der Ampicillin-Platte noch auf der Antibiotika-freien Platte Bakterienwachstum (siehe Abb. 10).

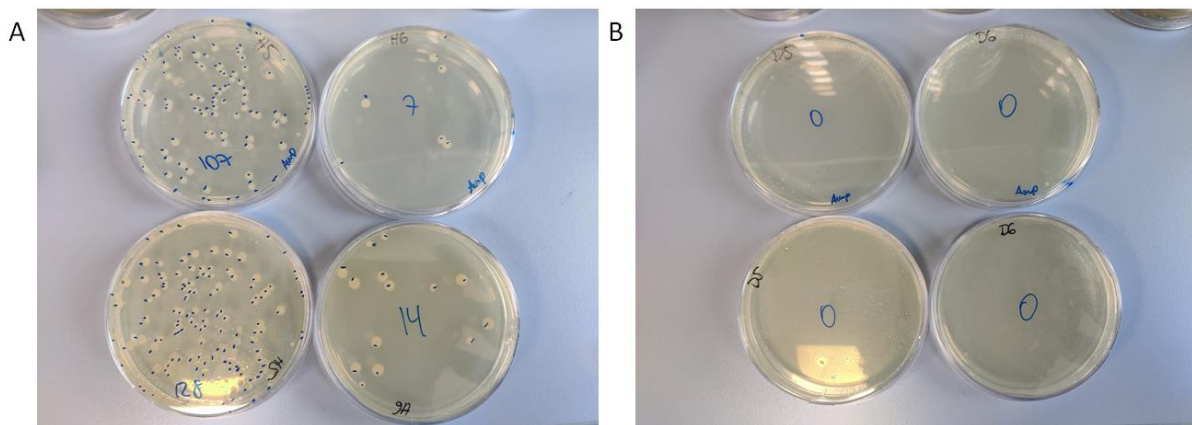


Abbildung 10: Bakterienwachstum nach Durchführung des Experimentes

Rosa26tdTomato-Mäuse erhielten 6 Tage lang Ampicillin, Vancomycin, Neomycin und Metronidazol, um die Darmbakterien abzutöten. Daraufhin wurden sie ab Tag 7 nur noch mit Ampicillin behandelt. Eine Gruppe wurde 4 Tage lang mit einem Ampicillin-resistenten *Escherichia coli* Stamm inokuliert. Am letzten Tag wurden Stuhlproben genommen, um die Darmbesiedlung mit Bakterien festzustellen. Hierfür wurde eine Verdünnungsreihe der Proben angefertigt. Diese wurden dann auf LB-Agar ausgestrichen, die entweder Ampicillin enthielt (obere Reihe), oder frei von Antibiotika war (untere Reihe). Stuhlproben von Mäusen der *E. coli* Gruppe (A) zeigten auf beiden Platten die gleiche Anzahl an Wachstumszonen. Die 6. Verdünnungsreihe enthielt ungefähr 10x weniger Bakterien. Stuhlproben von Mäusen, denen keine Bakterien inokuliert wurden, zeigten auf keiner Platte Wachstum (B). Beide Bilder stammten repräsentativ aus einer der beiden Gruppen. Einen Unterschied im Wachstum zwischen LPS-Gabe und keine LPS-Gabe existierte nicht.

Um nun die Vermittlung der Cre-mRNA über die OMV in die Mauszellen zu überprüfen, wurden Schnitte des terminalen Ileums und der Leber angefertigt. Dabei zeigten sich deutliche Unterschiede zwischen den Gruppen. Mäuse, die keine *E. coli* Cre Bakterien erhielten, zeigten keine Rekombinationen in Leber und Darm. Das galt für die Gruppe

mit und ohne LPS-Behandlung. Die anderen beiden Gruppen hingegen wiesen in beiden Organen deutliche tdTomato-Expression auf. Die Tiere, die zusätzlich zu den *E. coli* Bakterien mit LPS behandelt wurden, zeigten im Vergleich zur Kontrollgruppe ohne LPS eine stärkere und an mehr Stellen auftretende Fluoreszenz. Besonders auffällig ist weiterhin, dass in den meisten Fällen nicht nur die Epithelzellen der Villusspitzen und die Lamina propria rekombiniert wurden, sondern auch die Krypten, in welchen sich die Stammzellen des Dünndarms befinden.

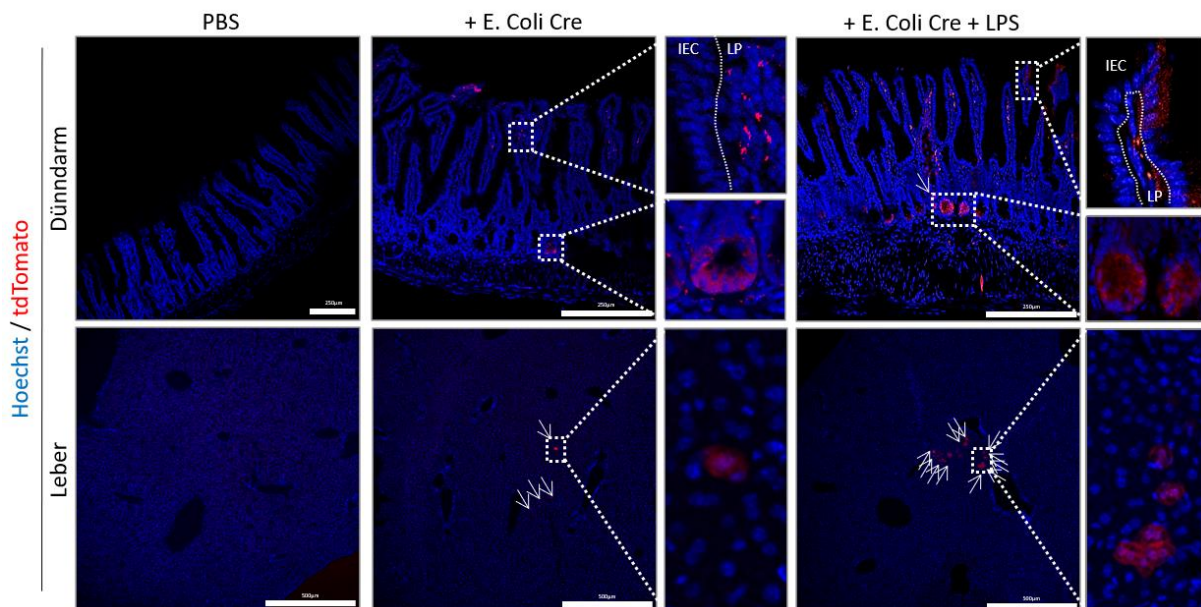


Abbildung 11: Vergleich der tdTomato-Expression in Leber und Darm

Rosa26tdTomato-Mäuse wurden entweder mit sterilem PBS (PBS), oder mit *E. coli Cre* Bakterien inokuliert (+ *E. coli Cre*). Weiterhin erhielt ein Teil der Gruppen intraperitoneal LPS (+ LPS). Im direkten Vergleich repräsentativer Aufnahmen des Dünndarms (oben) und der Leber (unten) zeigen sich bei *E. coli Cre* unbehandelten Mäusen in beiden Organen keine tdTomato-positive Zellen (rot). Mäuse, die mit den Bakterien behandelt wurden, zeigten Rekombination sowohl in der Lamina propria (LP), sowie im Epithel (IEC) und den Krypten (Vergrößerung unten). Auch in der Leber waren tdTomato-positive Zellen zu finden (Vergrößerung und Pfeile). Bei zusätzlicher LPS-Gabe wirkte dieser Effekt verstärkt. Die Zellkerne wurden mit Hoechst angefärbt (blau).

3.2.2 Verschiedene Darmzellen nehmen OMV auf

Um die Vermutung aus 3.1 zu bestätigen, dass auch bei der Mikroben-Host- Interaktion die Makrophagen eine zentrale Rolle bei der Aufnahme körperfremder extrazellulärer Vesikel spielen, wurde eine F4/80 Färbung durchgeführt. Die Schnitte stammten dabei von Mäusen, welche der *E. coli Cre* Gruppe zugehörig waren, sowohl mit als auch

ohne LPS. In der Fluoreszenzmikroskopie konnten dabei deutliche Kollokalisierungen mit dem Makrophagenmarker festgestellt werden.

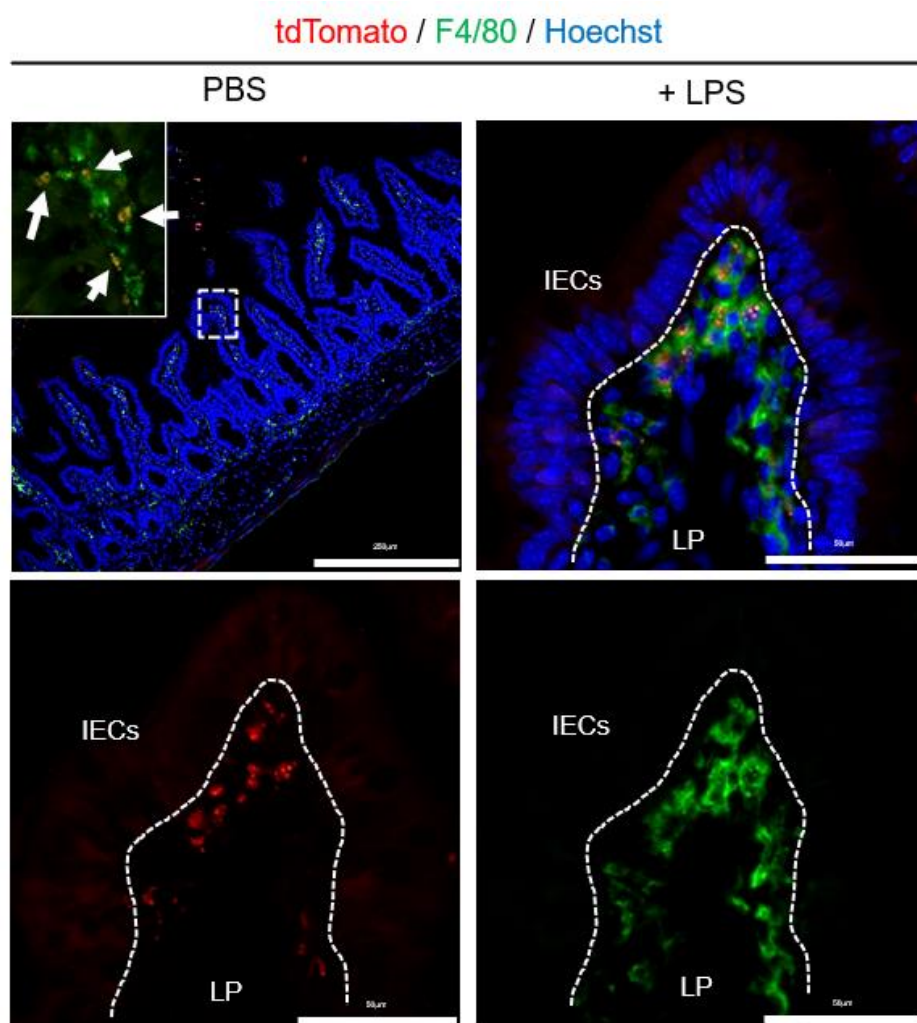


Abbildung 12: Makrophagen zeigen deutliche Zeichen der Rekombination im Dünndarm

Dünndarmschnitte von *E. coli Cre* behandelten Rosa26tdTomato-Mäusen, sowohl mit (+LPS) als auch ohne (PBS) LPS-Behandlung wurden mit F4/80 (grün) gefärbt, um die Makrophagen anzuzeigen. Die Zellkerne wurden mit Hoechst (blau) angefärbt. Das tdTomato-Signal fluoreszierte rot. In beiden Gruppen waren klare Kollokalisierungen erkennbar (weiße Pfeile). Dennoch wurden nicht alle Makrophagen rekombiniert (unten).

Mit Hilfe des tdTomato-Proteins konnte die Aufnahme *Escherichia coli Cre* stammender OMV dargestellt werden. Da dies nur eine indirekte Nachweismethode war, wurden die Dünndarmabschnitte mit Antikörpern, die gegen äußere Membranproteine bakterieller Vesikel gerichtet sind, gefärbt. Dabei waren insbesondere das Protein OmpC von großem Interesse, da dies in hohen Mengen in

der Membran von OMV zu finden ist (Hu et. al. 2020). Um die Spezifität des vorliegenden Antikörpers zu bestätigen, wurden neben den Dünndarmabschnitten der Mäuse zur Kontrolle auch Schnitte von keimfreien Mäusen hinzugezogen. Durch die Abwesenheit aller Bakterien im Verdauungstrakt dieser speziellen Mäuse, lagen hier keine Bakterien oder OMV vor. Der OmpC-Antikörper konnte dies bestätigen. Um die genaue Lokalisation der OMV innerhalb des Epithels zu untersuchen, wurde Phalloidin im Farbspektrum des Infrarot-Bereichs aufgebracht. Dies visualisierte spezifisch die Aktinfilamente und damit die Zellgrenzen des Dünndarms.

Die Signale des OmpC-Antikörpers sind besonders stark in den Villusspitzen vertreten, finden sich generell jedoch in allen Schichten wieder. Weiterhin zeigten sich besonders große Ansammlungen bei beschädigten Epithelzellen und Becherzellen. Insbesondere beim shedding zeigten sich Häufungen des grünen Signals. Bei der Untersuchung der Villi konnte ein OmpC-Signal sowohl in den Epithelzellen, dazwischen, sowie in der Lamina propria detektiert werden.

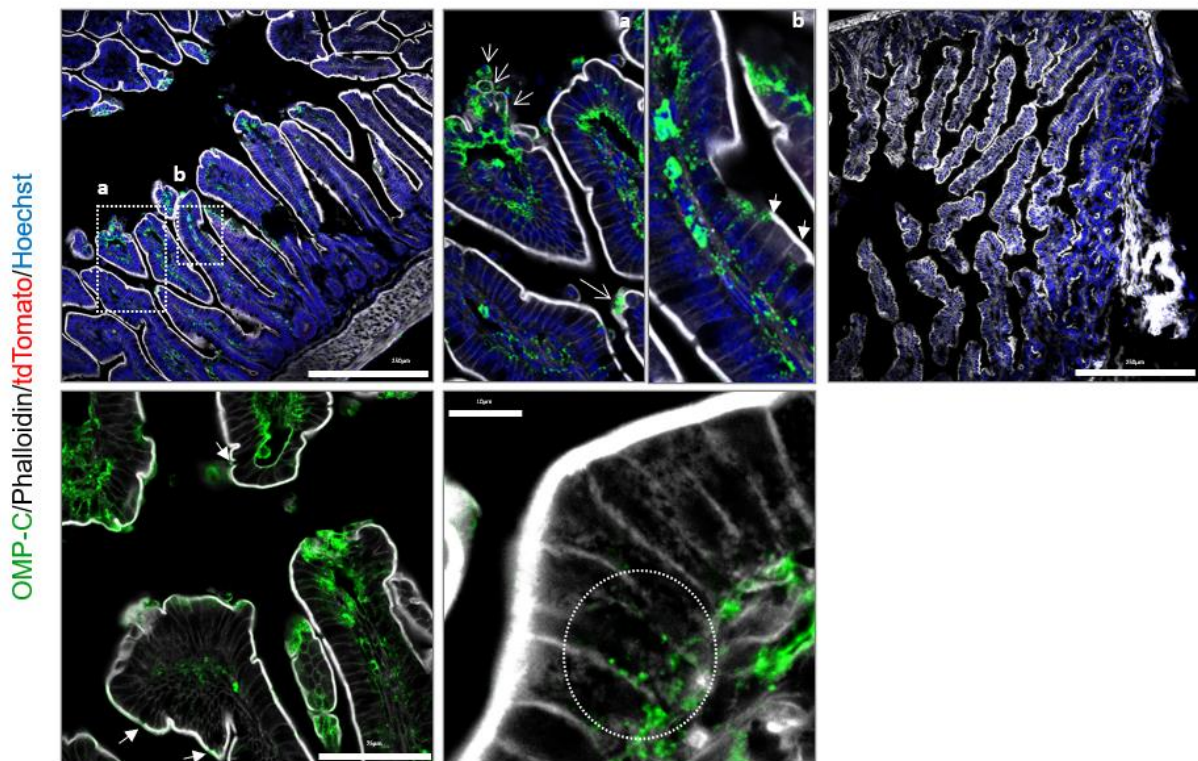


Abbildung 13: OMV zeigen sich in verschiedenen Kompartimenten der Villi

Dünndarmabschnitte von mit LPS und *E. coli* Cre behandelten Rosa26tdTomato-Mäusen. Zellkerne wurden mit Hoechst (blau) angefärbt. Rekombination durch die Cre Rekombinase wird durch das tdTomato Signal sichtbar (rot). OMV der Bakterien wurden mit einem OmpC-Antikörper (grün) visualisiert, Phalloidin in infrarot (weiß) zeigte zelluläre Aktin-Filamente. In den oberen Bildern wurde deutlich, dass sich OMV an den Villusspitzen, insbesondere bei Epithelschaden sammelten (Pfeile). Die unteren Bilder zeigten OMV-Ansammlungen an den Becherzellen (links, weiße Pfeile) und innerhalb der Villi (rechts, weißer Kreis). Weiterhin waren die OMV innerhalb der Lamina propria zu sehen. Der Darmabschnitt einer keimfreien Maus (germ-free) diente als Kontrolle der Spezifität des OmpC-Antikörpers, was durch die Abwesenheit eines grünen Signals bestätigt wurde.

3.2.3 Dynamin I-Inhibitor Dynasore reduziert die OMV-Aufnahme *in-vitro*

Von zentraler Bedeutung für die Aufnahme extrazellulärer Vesikel waren die Enzyme der Dynamine. Um zu untersuchen, ob die OMV über die Dynamin-abhängige Endozytose aufgenommen werden, wurde ein *in-vitro* Projekt durchgeführt. Hierfür wurden erneut Dünndarmorganoide aus Rosa26.tdTomato Mäusen isoliert. Eine Gruppe Organoide wurde dann mit dem Dynamin-Inhibitor Dynasore behandelt, die

andere mit sterilem DMSO zur Kontrolle. Daraufhin wurde in das Lumen der Organoide OMV, welche aus *E. coli* Cre Bakterien isoliert wurden, injiziert.

TdTomato-exprimierende Organoide leuchteten nach erfolgreicher OMV-Aufnahme rot, sodass diese manuell ausgezählt werden konnten. Gruppen mit Organoiden, welche vor der Injektion mit Dynasore behandelt wurden, zeigten sowohl qualitative als auch quantitative Unterschiede in der tdTomato-Expression. Obwohl beide Gruppen dieselbe Lösung an Cre-OMV erhielten und auch gleich viele Organoide injiziert wurden, zeigte die Kontrollgruppe stärkere und häufigere Expression des rot fluoreszierenden Proteins.

Außerdem fällt bei den Untersuchungen der Organoide auf, dass die stärksten tdTomato-Signale in den Bereichen der Stammzellen zu finden war. Die Ausläufer zeigten dagegen, wenn überhaupt, nur ein sehr schwaches Signal.

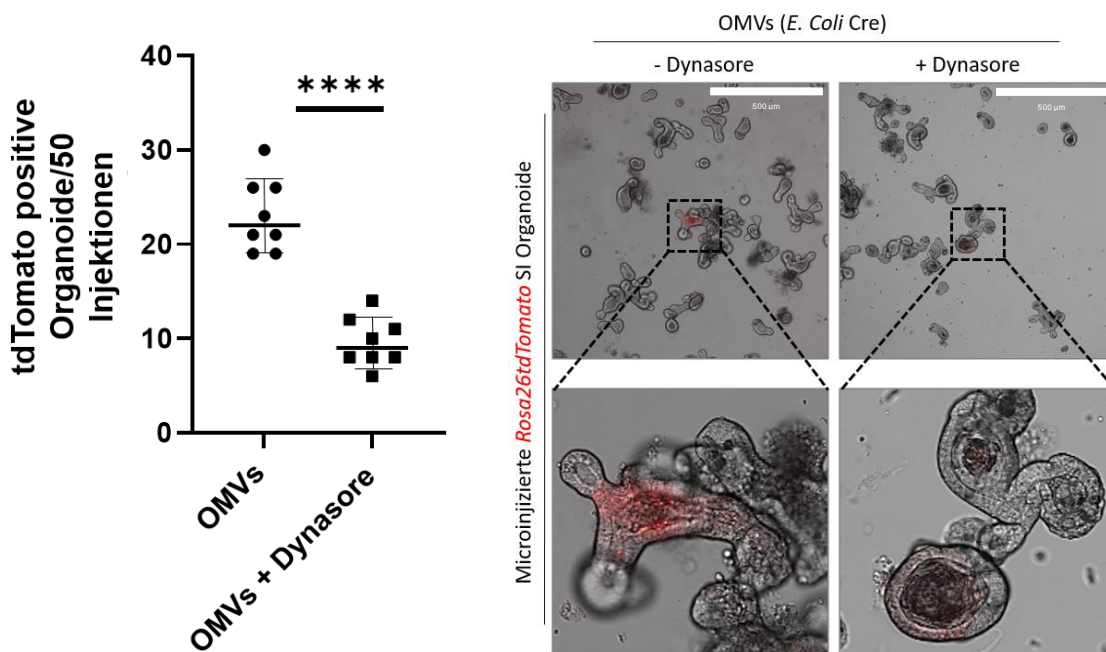


Abbildung 14: Manipulation der OMV-Aufnahme in Rosa26tdTomato Dünndarmorganoiden mit Dynasore

Organoiden von Rosa26tdTomato-Mäusen wurden aus Dünndarm-Stammzellen gewonnen. Nach vier Tagen Wachstumszeit wurde ein Teil der Organoide mit dem Dynamin-Inhibitor Dynasore behandelt (+ Dynasore). Die Kontrollgruppe erhielt dasselbe Volumen steriles DMSO (- Dynasore). Nach einer Stunde Inkubationszeit wurde in das Lumen der Organoide OMV von *Escherichia coli* Cre Bakterien injiziert. Nach 20 Stunden wurden Bilder aufgenommen und die tdTomato-positiven Organoide ausgezählt. Ein Punkt/Quadrat steht hierbei für die Anzahl der tdTomato-positiven Organoide in einer

Gruppe von 50 Injektionen. Links ohne Behandlung, rechts mit Behandlung durch Dynasore. Statistische Analyse: ungepaarter t-Test; **** $p \leq 0,0001$. Fehlerlinien zeigen die Standardabweichung. Die Bilder zeigen beispielhaft zusätzlich zum quantitativen auch einen qualitativen Unterschied. Links ist die Expression des tdTomato-Proteins deutlich stärker als rechts mit Dynasore vorbehandelten Organoiden. Auffällig ist weiterhin, dass die meiste Rekombination in den Stammzellbereichen der Organoide stattfindet.

In einem ähnlichen Aufbau sollte kontrolliert werden, wo die Rekombination in den Organoiden im Verhältnis zur Injektionslösung stattfand. Dafür wurde eine Mischlösung aus *Escherichia coli* Cre und *Escherichia coli* GFP-Bakterien vorbereitet. Die gleiche Anzahl an beiden Bakterienstämmen wurden dann in sterilem PBS gelöst. *Escherichia coli* GFP exprimierten dabei das grün fluoreszierende Protein GFP. Mit Hilfe von konfokaler Laser-Scanning-Fluoreszenzmikroskopie konnte daher exakt nachvollzogen werden, wo die Lösung injiziert wurde und wie sie sich in den Zellen verteilte. Um auch hier den Einfluss von Dynasore zu untersuchen, wurde eine Gruppe mit dem Dynamin I-Inhibitor behandelt, die andere Gruppe mit demselben Volumen DMSO. Wie in den vorangegangenen Experimenten waren die Rekombinationen schwächer, sowie weniger häufig anzutreffen als in der Kontrollgruppe. Es bestätigte sich die Beobachtung aus den OMV-Injektionsversuchen, dass die meiste Expression des tdTomato-Proteins in den Stammzellen der Organoide aufzufinden war, unabhängig vom Injektionsort.

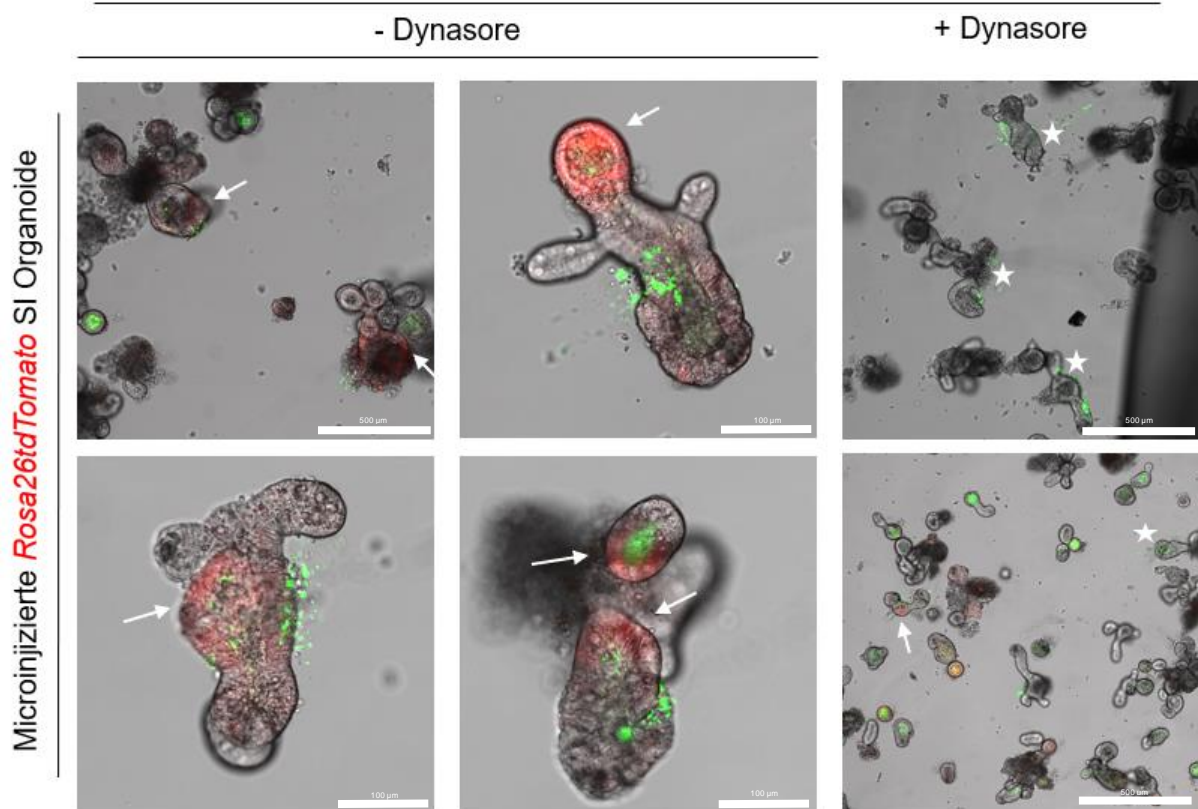


Abbildung 15: Dynasore vermindert Rekombination durch *E. coli* Cre

Die Rekombinationen der Dünndarmorganoide von Rosa26tdTomato-Mäusen durch *E. coli* Cre Bakterien wurde durch die Expression des tdTomato-Proteins (rot) deutlich. Die Injektionsstelle konnte durch die *E. coli* GFP Bakterien (grün) bestimmt werden. Die meiste Rekombination fand dabei in allen Organoiden im Bereich der Stammzellen statt (weiße Pfeile). Viele der Organoide, die zuvor mit Dynasore behandelt wurden, zeigten kein tdTomato-Signal (weißer Stern).

3.3 Etablierung einer Isolationsmethode für Outer membrane vesicles von *Escherichia coli* Bakterien

3.3.1 Isolierung der Outer Membrane Vesicles

Die extrazellulären Vesikel, sowohl von eukaryotischen als auch prokaryotischen Organismen stammend, waren für die in dieser Arbeit vorgestellten Untersuchungen von höchster Bedeutung. Daher wurde im Rahmen dieser Doktorarbeit ein Protokoll etabliert, um die OMV zuverlässig zu isolieren. Grundsätzlich wurde für die Methodenetablierung ein *E. coli* Cre Stamm verwendet, da die OMV der *E. coli* Stämme von besonderer Bedeutung waren. Die Cre-Rekombinase in Form von mRNA diente als Erfolgskontrolle für die OMV durch PCR der zugehörigen cDNA.

Die Dauer der Wachstumsphase und Inkubationszeit war der erste kritische Punkt in der OMV-Isolation. Eine kürzere Inkubationszeit verminderte den Anteil der toten Bakterien und damit einhergehende Verunreinigungen. Dafür wurden bei längeren Wachstumsphasen mehr OMV von den *E. coli* produziert und an das Medium abgegeben. Da die Quantität der OMV für die vorliegenden Untersuchungen eine besonders große Rolle spielte, hat sich der Vorteil einer längeren Inkubationszeit erwiesen. Die Bakterien wurden abzentrifugiert, um ein bakterienarmes, aber mit OMV angereichertes Medium zu generieren. Um alle restlichen Bakterien zu entfernen, wurde das Medium filtriert.

Um die OMV besser isolieren zu können, folgte eine Fällung. Diese konnte entweder mit PEG und NaCl oder mit Ammoniumsulfat durchgeführt werden. Der Vorteil der Ammoniumsulfat-Fällung war dabei, dass keine zusätzliche Lösung zum Überstand hinzugefügt werden musste. Die Salze konnten direkt in den Überstand gegeben werden, ohne die Konzentration der OMV zu senken. Die Salze konnten nach der Isolation jedoch nicht mehr entfernt werden. Dadurch wurden folgende Experimente, wie beispielsweise der WesternBlot, verfälscht. Daher wurde die PEG-Fällung durchgeführt. Hierbei wurde dem bakteriellen Überstand eine sterile Lösung von PEG und NaCl zugefügt, um die OMV zu fällen. Zwar nahm die Konzentration der OMV in der Lösung durch diese Methode ab, was das Auspelletieren erschwerte, Folgeexperimente konnten aber ohne Einschränkungen durchgeführt werden. Daher erwies sich die Zugabe des PEG und der NaCl-Lösung in den bakteriellen Überstand für die Experimente im Rahmen der Forschungsarbeit als überlegen. Daraufhin erfolgte zunächst die Zentrifugation. Hierdurch wurde der Einsatz von Ultrafiltrationsröhrchen möglich. Diese zusätzliche Aufreinigung reduzierte den Anteil an freien Proteinen und kleinen Zellbestandteilen und konzentrierte die OMV in der Flüssigkeit weiter auf. Das dabei entstandene Pellet wurde erneut in ein kleineres Volumen PEG-Lösung aufgenommen und endgültig gefällt. Der Überstand wurde vollständig verworfen und das OMV-Pellet konnte in ein beliebiges Medium aufgenommen werden. Für die folgenden Qualitätskontrollen wurde es in sterilem PBS gelöst.

Eine detaillierte Beschreibung der Isolation findet sich in Kapitel 2.2.4.

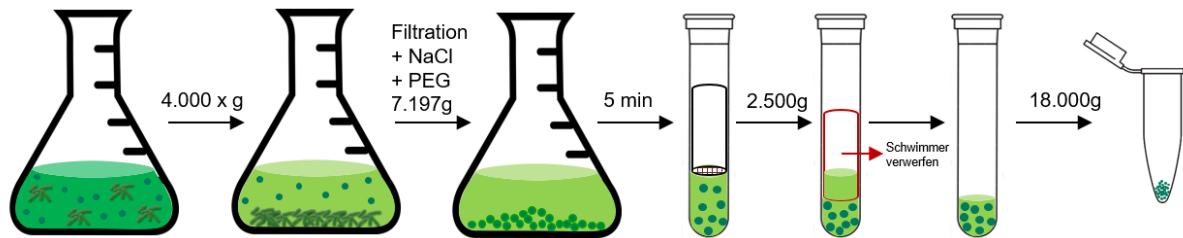


Abbildung 16: Isolationsprozess der OMV mit PEG-Fällung

Zunächst wurde der Bakterienstamm kultiviert und gezüchtet. Um die Bakterien aus dem Medium zu entfernen wurden sie zunächst abzentrifugiert und der Überstand daraufhin filtriert. Danach wurde eine NaCl-Lösung und eine PEG-Lösung dem Überstand zugefügt und erneut zentrifugiert. Die Ultrafiltrationsröhrchen führten in einem weiteren Zentrifugationsschritt zu einer Aufkonzentrierung der OMV. Die OMV wurden in einem letzten Zentrifugationsschritt pelletiert.

3.3.2 Qualitätskontrolle der isolierten OMV

Um die isolierten OMV in den Folgeexperimenten richtig einsetzen zu können waren sowohl Sterilität wie auch eine gute Qualität der OMV von zentraler Bedeutung. Hierfür wurden nach der Isolation Qualitätskontrollen durchgeführt. Zunächst wurden kleine Mengen der endgültigen Lösung auf sterile LB-Agar-Platten ohne Antibiotikum-Zusatz gebracht und für mehrere Tage bei 37°C inkubiert. Auf den Platten sind jedoch keine Kulturen gewachsen.

Um einen Nachweis der OMV zu erleichtern, wurden die OMV eines *E. coli* Cre-Stammes verwendet. Diese Bakterien laden bei der OMV-Produktion Cre-mRNA in die Vesikel, welche dann nach Isolation und Umschreibung in cDNA über eine PCR nachgewiesen werden konnten. Die OMV wurden dafür zunächst lysiert und die freigesetzte mRNA mit einer reversen Transkriptase in cDNA umgeschrieben. Als interne Kontrolle dienten dabei für positive Banden cDNA von lysierten *E. coli* Cre Bakterien und cDNA von VilCre bzw. AlbuminCre Mäusen, als Negativkontrolle cDNA von Gewebe einer Wildtyp-Maus. Neben dem Nachweis von Cre-mRNA wurde auch noch 16s-rRNA nachgewiesen, um die Herkunft aus bakteriellen Zellen zu beweisen. In beiden Fällen wurde eine DNA-Leiter hinzugegeben, um auch die Höhe der Banden zu kontrollieren. Die PCR-Resultate der Cre-Rekombinase sollte der DNA-Abschnitt 720 Basenpaare (Fu et. al. 2020), die 16s-rRNA etwa 200 Basenpaare (Ravn-Haren et. al 2012) lang sein.

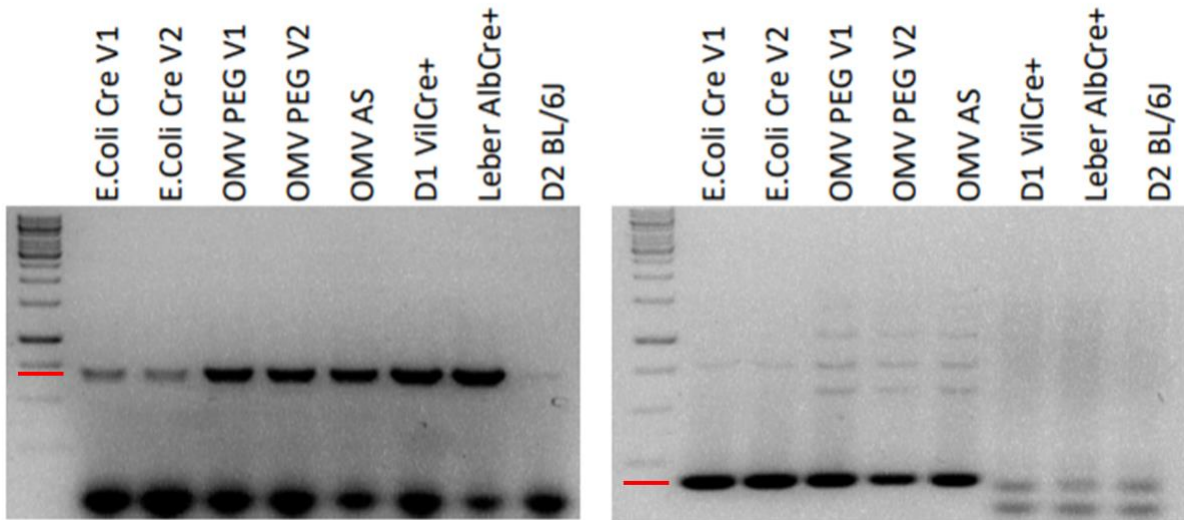


Abbildung 17: PCR-Nachweis der OMV-Isolation

Die Abbildungen zeigen die Ergebnisse der PCR-Untersuchungen zu Cre-Rekombinase (links) und 16S-rRNA (rechts). Hierfür dienten Isolationen lysierter *E. coli* Cre Bakterien, OMV-Isolationen mit Hilfe von Polyethylenglykol (PEG) oder Ammoniumsulfat (AS) und cDNA aus Gewebe von Cre-positiven Dünndarm (D1 VilCre+) und Leber (Leber AlbCre+). Das Dünndarmgewebe einer Wildtyp-Maus (D2 BL/6J) diente in beiden Fällen als Negativkontrolle. Die am weitesten links liegende Bande wurde mit einer DNA-Leiter beladen, um die Länge der nachgewiesenen cDNA zu überprüfen. Cre-Rekombinase konnte bis auf die Wildtyp-Maus überall nachgewiesen werden. Banden für die 16S-rRNA zeigen sich nur in den von Bakterien stämmigen Isolationen. Die erwartete Höhe für die Banden wurde für eine bessere Übersicht in der Leiter nachträglich rot markiert.

Um zu überprüfen ob und welche Proteine von den Bakterien in die OMV geladen wurden, wurde ein WesternBlot durchgeführt. Hierfür wurden Proteine aus Bakterien selbst, den OMV und humanen HCT-Zellen isoliert und diese auf eine gemeinsame Membran gebracht. Über Antikörperbindung an spezielle Proteine wurden diese Isolate dann untersucht. *E. coli* Cre Bakterien und die OMV dieser Bakterien konnten positiv auf Cre-Rekombinase Proteine getestet werden. *E. coli* GFP-Bakterien, deren OMV und Proteine aus humanen Zellen zeigten keine Banden.

DnaK war ein Protein, welches den Chaperonen zugeordnet wird. Dessen Aufgabe bestand dabei in der Kontrolle von Faltungen verschiedener Proteine, um schädliche Strukturen zu vermeiden (Calloni et. al, 2012). Da dies im Inneren des Bakteriums stattfand, konnte durch seine An- oder Abwesenheit die Herkunft des Proteinprofils eines WesternBlots überprüft werden. Die Färbung auf DnaK diente also zu einer weiteren Kontrolle, ob die Membran ausschließlich mit OMV-Proteinen geladen wurde,

oder eine Kontamination mit Bakterien stattgefunden hatte. Wie in Abbildung 18 zu sehen ist, sind deutliche Banden auf der vermuteten Höhe von 70 kDa bei kommensalen Darmbakterien, sowie *E. coli Cre* und *E. coli GFP* zu erkennen. Bei den OMV von *E. coli Cre* und *E. coli GFP* sind keine Banden zu sehen.

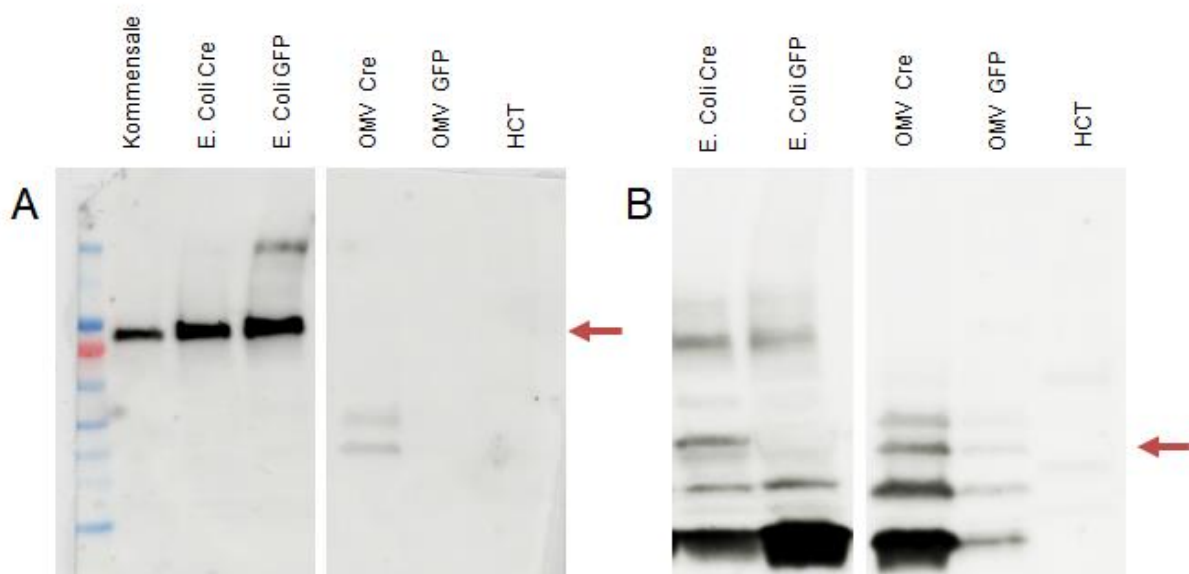


Abbildung 18: WesternBlot Ergebnisse

Beide Membranen enthielten dasselbe Proteinprofil. Der rote Pfeil deutete die Höhe der jeweils erwarteten Proteine an. Die farbige Leiter ganz links diente zur Orientierung für die Größe der Proteine.

- A) Färbung auf DnaK. Deutlich zu erkennen waren die Banden der Bakterien (Kommensale, *E. coli Cre* und *E. coli GFP*) während die OMV und die humanen Zellen (HCT) keine Banden zeigten.
- B) Färbung auf Cre-Rekombinase. Hier waren Banden sowohl bei den *E. coli Cre* Bakterien, sowie in den von *E. coli Cre* stammenden OMV erkennbar. Die anderen Profile waren negativ.

4. Diskussion

Klinische Relevanz und Aussicht

Die Kommunikation verschiedenster Lebensformen, von mikroskopisch kleinen Einzellern bis hin zu komplexen Organismen wie dem Menschen, spielt für das Gleichgewicht und die Aufrechterhaltung des Lebens eine zentrale Rolle. Extrazelluläre Vesikel nehmen dabei eine besondere Schlüsselfunktion ein, da sie universell von allen Zellen, eukaryotisch wie prokaryotisch, genutzt werden. Ziel dieser Arbeit war es, den Weg darmepithelialer und bakterieller Vesikel nachzuvollziehen, zu visualisieren und die Vesikel selbst in ihrer Zusammensetzung zu untersuchen.

Extrazelluläre Vesikel sind aufgrund ihrer Größe von 20-1000nm (Tsatsaronis et. al., 2018) schwer direkt nachzuweisen. Daher wurden für diese Arbeit Cre-Reporter Mäuse eingesetzt. Die Vesikel wurden im ersten Teil der Arbeit von Epithelzellen des Darms, im weiteren Verlauf als OMV von *E. coli* Cre Bakterien mit mRNA und Proteinen beladen. Zellen, die diese Vesikel aufgenommen haben, wurden durch das Cre-Rekombinase Protein rekombiniert. Dies führte zur Expression des rot-fluoreszierenden Farbstoffes tdTomato. Da dieses Signal spezifisch für die Cre-Rekombinase ist, kann genau gezeigt werden, in welche Zellen die Vesikel eingedrungen sind.

Im ersten Teil der Arbeit wurden Mäuse eingesetzt, die in den Epithelzellen des Darms Cre-Rekombinase exprimieren konnten. Untersucht wurde hierbei, inwieweit sich die Vesikel, die von diesen Zellen stammen, in andere Kompartimente des Tieres verteilen. Von besonderem Interesse für diese Arbeit war dabei die Darm-Leber-Achse und die Darm-Hirn-Achse. Die Leber ist das erste Organ, welches das venöse Blut des Darmes aufnimmt und verarbeitet. Weiterhin bildet sie über den enterohepatischen Kreislauf eine enge Verbindung mit dem Verdauungstrakt. Die Kommunikation wird dabei über verschiedene Formen geregelt: humoral, hormonell, neuronal und über Immunreaktionen. Viele Studien beschäftigen sich mit dem Einfluss des Mikrobioms auf diese Interaktion (Tripathi et. al., 2019). Ebenso wird die Darm-Hirn-Achse untersucht. Durch diese Verbindung sind beide Organe in der Lage sich gegenseitig zu beeinflussen (Carabotti et al., 2015). Der Einfluss der OMV, extrazelluläre Vesikel Gram-negativer Bakterien, wird dabei besonders diskutiert (Jones et. al., 2020; Malia

et. al., 2019; Muraca et. al., 2015). Um die Vesikeltranslokation körperfremder Vesikel zu verstehen, sollte auch die Kommunikation des Darms mit Leber und Gehirn über körpereigene Vesikel verstanden werden. Untersucht wurde in der vorliegenden Arbeit, inwieweit Vesikel, die von Epithelzellen des Darms stammen, in andere Kompartimente des Tieres gelangen. Studien zeigen, dass EV in der Lage sind, Proteine und mRNA vor Abbauprozessen zu schützen und somit im Organismus zu verteilen (Anand et. al., 2019; Andres et. al., 2019; Doyle & Wang, 2019; Li et. al., 2020). In der vorliegenden Arbeit konnte das bestätigt und visualisiert werden. Die Zielzellen lagen vor allem lokal in der Lamina propria, sowie in peripheren Organen wie Leber und Gehirn. Das tdTomato-Signal in den Zielzellen zeigt dabei, dass bioaktive Moleküle aktiv bleiben und dadurch Einfluss auf andere Zelltypen und Nachbarzellen nehmen können.

Die Vesikel bilden damit eine zentrale Funktion als Kommunikationsmedium des Darms. Viele Erkrankungen des Menschen zeigen sich durch chronische Entzündungen des Verdauungstraktes, wie beispielsweise Morbus Crohn oder Colitis Ulcerosa (Wehkamp et. al., 2016). Studien konnten zeigen, dass intestinale Entzündungen zu einer Einschränkung der Darmbarriere führen (Sánchez de Medina et. al., 2014). Entsprechend anderen Forschungsarbeiten (Rhee, 2014; Günther et. al., 2015) wurde LPS eingesetzt, um bei den Versuchstieren eine Entzündung des Darms zu provozieren. Diese konnte dann über eine HE-Färbung nachgewiesen werden. Besonders auffällig war, dass die Mäuse unterschiedlich stark auf verhältnismäßig gleiche Mengen an LPS reagierten. Die gesteigerte proinflammatorische Aktivierung des Epithels aufgrund der intensiven Reaktion auf das LPS führte zu einer verstärkten Barrierefunktion. Dies führte zu vermehrter Translokation der EV, welche peripher gehäuft aufgenommen wurden, was zu mehr Zellen mit positiven tdTomato-Signal führte. Es zeigt sich also, dass das Ausmaß der Entzündung maßgeblich an der Schwere der Barrierefunktion beteiligt ist. Die Expression des tdTomato Signals im Gehirn der Maus zeigt außerdem, dass die aus den Epithelzellen des Darms stammenden Vesikel in der Lage sind, die Blut-Hirn-Schranke zu durchdringen und erfolgreich die Zellen des Gehirns zu penetrieren. Hieraus kann abgeleitet werden, dass extrazelluläre Vesikel maßgeblich an der Darm-Hirn-Achse beteiligt sind und diese Verbindung durch lokale Entzündungsreaktionen im Darm verstärkt wird. Außerdem konnten bisherige Studien den Übergang von EV über die Blut-Hirn-

Schranke nur mit in-vitro Experimenten oder in-vivo am Zebrafisch zeigen (Ramos-Zaldívar et. al., 2022). Die vorliegenden Bilder und Ergebnisse zeigen jedoch eindeutig diesen Effekt auch beim Säugetier. Das genutzte Tiermodell ist damit eine hervorragende Basis, um weitere Studien zur Vesikeltranslokation und der Darm-Hirn-Schranke durchzuführen.

Um die Verteilung der Vesikel genauer zu untersuchen, war Teil dieser Arbeit herauszufinden, welche Zellen die Vesikel vermehrt aufnehmen. Studien haben in der Vergangenheit gezeigt, dass vor allem Makrophagen extrazelluläre Vesikel aufnehmen (Czernek et. al., 2015; He et. al., 2023). Dies konnte in der vorliegenden Arbeit bestätigt werden. Makrophagen sind in der Lage, freie Partikel zu phagozytieren und spielen dabei insbesondere in der Immunabwehr eine große Rolle (Mosser Edwards, 2008). Dabei sind sie auch zahlreich in der Lamina propria anzutreffen (Denning et. al., 2007). Die Ergebnisse der Fluoreszenzmikroskopie zeigen eine Kolokalisation des tdTomato-Proteins mit dem Makrophagenmarker F4/80 (Cassado 2017). Das bedeutet, dass einige der Makrophagen die Vesikel aufgenommen und die darin enthaltene mRNA translatiert haben, oder die Cre-Rekombinase selbst funktionstüchtig blieb. Auch die Leukozyten, nachgewiesen durch die Kolokalisation von tdT mit MPO als Teil des Immunsystems nehmen die Vesikel auf. Damit bestätigen sich die Thesen anderer Forschungen (Chennakrishnaiah et. al., 2018). Besonders auffällig ist das bereits beschriebene Bild der vermehrten roten Signale nach lokaler Entzündung. Da auch Fibroblasten vermehrt Vesikel aufnehmen, ist eine gesteigerte Produktion von extrazellulärer Vesikel durch die Epithelzellen wahrscheinlich. Dies ergänzt das Wissen der aktuellen Literatur, welche besagt, dass eine LPS-Stimulation von Endothelzellen zu vermehrter EV-Freisetzung führen kann (He et. al., 2023). Eine verbesserte Aufnahme der EV durch die Immunzellen durch Zytokine oder andere Mediatoren der Entzündung ist jedoch nicht auszuschließen. Die T-Zellen in-vivo zeigten keine signifikante Veränderung in der Expression von tdTomato. Um auszuschließen, dass zu wenige Vesikel vorhanden oder der Aktivierungsgrad der T-Zellen eine Rolle bei der Aufnahme spielen, wurden noch in-vitro Experimente durchgeführt. Da auch hier keine Veränderung erkennbar war, muss davon ausgegangen werden, dass T-Zellen die Vesikel entweder nicht aufnehmen oder die mRNA in den Vesikeln nicht translatieren, bzw. die Proteine deaktiviert werden. Zwar konnte bereits in anderen Studien gezeigt werden, dass die T-Zellen Aktivierung von

Exosomen beeinflusst wird (Anel et. al., 2019), jedoch müssen noch weitere Studien durchgeführt werden, um den Mechanismus und die Rolle der Vesikelaufnahme von T-Zellen in der Immunreaktion besser zu verstehen.

Die bereits beschriebenen Experimente gaben bereits einen guten Überblick über die Distribution und Zielzellen der extrazellulären Vesikel aus dem Epithel des Darmes. Der Darm spielt jedoch auch in der Kommunikation mit der Umgebung eine Rolle. So bildet er als Teil des Verdauungstraktes die Barriere zu allen mit der Nahrung aufgenommenen Stoffe. Weiterhin ist der Darm mit mehreren Millionen von Bakterien besiedelt. Viele dieser Mikroorganismen sind dabei für die Aufrechterhaltung der Homöostase von großer Bedeutung. Eine Veränderung dieses sensiblen Gleichgewichtes, durch das Eindringen pathogener Erreger oder eine falsche Nahrungszusammensetzung, kann schnell zu Entzündungsreaktionen (Al Bander et. al., 2020; Caruso et. al., 2020; Forbes et. al., 2016; Zhang et. al., 2015), Infektionen (Fletcher et. al., 2021; Ghosh & Jesudian, 2019; Mullish & Williams, 2018) und sogar Krebs (Ahn et. al., 2013) führen.

Die Bedeutung des Mikrobioms auf die Homöostase und Gesundheit des Organismus ist bereits lange bekannt. Um das Verständnis über den Mechanismus der Mikrobe-Wirt-Interaktion weiter zu verstehen, wurden von vielen Forschungsgruppen neben verschiedenen Versuchen mit unterschiedlichen Bakterienkulturen Forschungen zu deren Vesikeln unternommen (Jones et. al., 2020; Malia et. al., 2019; Muraca et. al., 2015). Insbesondere *E. coli* und ihre OMV waren schon Thema diverser Arbeiten (Alvarez et. al., 2019; McBroom et. al., 2006). Viele dieser Studien konnten bereits zentrale Fragen in der OMV-Forschung klären. So wurden beispielsweise OMV aufgereinigt und dann in-vitro oder in-vivo eingesetzt, um die Aufnahme und Distribution nachzuvollziehen. Problematisch hierbei ist vor allem der fehlende direkte Kontakt zwischen den Bakterien, deren OMV und den Zielzellen. Damit ist ein Aufbau gegeben, der die Realität nicht gänzlich widerspiegelt. In-vitro Experimente zeigten, dass Eukaryoten OMV aufnehmen und dieser Vorgang über eine Dynamin-abhängige Endozytose stattfindet (Jones et. al., 2020). Dies vernachlässigt jedoch den großen Einfluss anderer, teilweise noch unbekannter Faktoren, die im Darm vorkommen. Auch die direkte Gabe der aufgereinigten OMV bei bisher durchgeführten in-vivo Experimenten spiegelt nicht die physiologischen Bedingungen wider. Die Gabe über eine Magensonde (Hong et. al., 2023; Jones et. al., 2020), oder die direkte Injektion

der OMV in das Peritoneum (Jang et. al., 2015) ist unphysiologisch. Es vernachlässigt mögliche Faktoren wie Temperatur, bakterieller Stress, Mikroben-Wirt-Interaktion, Nahrungsangebot und vieles Weitere was die Ladung und Anzahl der Vesikel potenziell verändert. Die Versuche in der vorliegenden Arbeit verringert diese Störfaktoren. Die Bakterien befinden sich im Darm, wo sie physiologisch vorkommen. Die OMV werden vor Ort hergestellt und äußere Einflüsse werden somit beachtet. Die Beobachtung, dass *E. coli* GFP Bakterien keinen direkten Kontakt mit den Epithelzellen des Darms hatten (Bittel et. al., 2021), schließen andere Systeme als OMV zur Mikroben-Wirt-Interaktion aus.

Es konnte gezeigt werden, dass bakterielle Vesikel bereits unter physiologischen Bedingungen in der Lage sind, die Epithelbarriere zu durchdringen und Zellen in der Lamina propria, sowie im Stammzellbereich auf genetischer Ebene zu verändern. Diese Erkenntnis ist insofern interessant, da es für zukünftige therapeutische Ansätze viele Wege bereitet. Bereits jetzt wird daran geforscht, wie OMV genetisch so verändert werden können, dass sie Zellen mit spezifischen Oberflächenproteinen befallen, um so Chemotherapeutika gezielt in Krebszellen zu bringen (Rezaei Adriani et. al., 2023). Der Mechanismus, warum OMV von *E. coli* Bakterien insbesondere Stammzellen im Darm befallen, sollte daher weiter erforscht werden. Dies könnte im Hinblick auf kolorektale Karzinome neue Möglichkeiten zur Diagnose und Therapie eröffnen. Gleichzeitig könnte ebendieser Prozess Erklärungen bieten, warum es überhaupt zu kolorektalen Karzinomen kommt. Eine Studie zeigte auf, dass die Gram-negativen Bakterienspezies der Fusobakterien und Porphyromonas bei Patientinnen und Patienten mit Kolorektalen Karzinomen prozentual vermehrt vorhanden sind, als bei gesunden Menschen (Ahn et al., 2013). Dabei ist jedoch der genaue Mechanismus nicht bekannt. Möglicherweise sind die OMV der Bakterien und der damit einhergehende Befall der Stammzellen Ursache der Neoplasie. OMV als mögliche Ursache der Krebserkrankungen wird bereits heute vielfältig untersucht (Amatya et. al., 2021), gerade im Hinblick auf den Stammzellbefall bietet die vorliegende Arbeit neue Erkenntnisse über die Distribution der OMV.

Weiterhin ist diese Arbeit auch für extraintestinale Erkrankungen von Bedeutung. Für die Autoimmunerkrankung der Multiplen Sklerose ist bereits bekannt, dass kommensale Bakterien des Darmes einen Effekt auf die Darm-Hirn-Achse haben. Die bisher dargestellte Theorie ist dabei, dass die lokale Entzündung im Darm zu

Veränderungen des Immunsystems des gesamten Körpers führt (Kadowaki & Quintana, 2020). In den Vorexperimenten von Miriam Bittel konnte gezeigt werden, dass bei einer besonders starken Entzündung im Darm, hervorgerufen durch LPS, die Vesikel auch in periphere Organe wie Leber, Milz und sogar in das Gehirn einwandern können (Bittel et. al., 2021). So ist nicht auszuschließen, dass bei einer besonders starken Zerstörung der Darmbarriere die Vesikel in alle Kompartimente des Körpers translozieren und es überall zu genetischen Veränderungen kommen kann. Weiterhin kann LPS auf der Oberfläche der OMV lokale Immunantworten hervorrufen. Studien konnten bereits zeigen, dass Patienten mit Multipler Sklerose erhöhte Werte von LPS und LPS-bindenden Proteinen im Blutplasma aufweisen (Buscarinu et. al., 2019). Über den direkten Weg des LPS über OMV in das Gehirn ist eine Beteiligung der bakteriellen Vesikel an der Ätiologie von MS möglich. Eine weitere Studie zeigte, dass OMV des *Fusobacterium nucleatum* lokale Entzündung in Gelenken verursachen und damit rheumatoide Arthritis provozieren konnte (Hong et. al., 2023). Auch hier könnten therapeutische Ansätze gefunden werden, die die bakterielle Abgabe der OMV mit anschließender Aufnahme durch Körperzellen vermindert. Um diesen Aspekt genauer zu untersuchen, wäre es denkbar, keimfreie Mäuse mit einem bakterienfreien Vesikel-Isolat intravenös zu behandeln. Es wird vermutet, dass Mikroben wie Mykobakterien, *Helicobacter pylori* oder *Chlamydia pneumoniae* einen Einfluss auf die Entstehung der MS-Erkrankung nehmen (Cossu et al., 2018). Inwieweit die Einzeller selbst, oder aber ihre EV ursächlich dafür sind, kann mit einem solchen Experiment überprüft werden. Bei einem Modell mit keimfreien Mäusen können fremde OMV ausgeschlossen werden, sodass bakterielle EV speziesabhängig getestet werden können.

In der Forschung wurden bereits zahlreiche Tests mit extrazellulären Vesikeln durchgeführt, um ihr Potenzial als diagnostische und therapeutische Optionen zu erkunden. Wegen ihrer Biokompatibilität waren bisher Exosomen von eukaryotischen Zellen von großem Interesse. Herausfordernd dabei ist jedoch die Praktikabilität, da die Isolation der Exosomen sehr aufwendig und teuer ist (Fazal & Lee, 2021). Aufgrund dessen, dass bakterielle OMV, insbesondere die der *E. coli* schnell und preisgünstig hergestellt werden und dabei zusätzlich nahezu beliebig angepasst werden können, bieten sie mehr Möglichkeiten. Insbesondere finden OMV als mögliches Transportmedium für Impfstoffe viel Beachtung. Eine Studiengruppe konnte dabei sowohl die Herstellung als auch die Wirksamkeit solcher Impfstoff-OMV beschreiben

(Zanella et. al., 2021). Dabei können selbst bei neu auftretenden Erkrankungen, wie beispielsweise das SARS-CoV-2, die Bakterien angepasst werden, um schnell OMV-Impfstoffe herzustellen (van der Ley et. al., 2021). Diese sind sehr stabil, weil die Lipid-Doppelschicht die Inhaltsstoffe gut vor ihrer Umgebung schützt. So bleiben sie monatelang unter Raumtemperatur stabil (Zanella et. al., 2021). In Hinblick auf eine globale Pandemie, wäre die Distribution eines OMV-Impfstoffes um ein Vielfaches einfacher als beispielsweise der mRNA-Impfstoff von Biontech/Pfizer. Dieser muss, um seine Wirkung zu erhalten, bei -90°C bis maximal -60°C gelagert werden (European Medicines Agency, 2021). Solche Tiefkühler gibt es jedoch nicht überall und auch nur in begrenzten Mengen. Ein OMV-Impfstoff hingegen könnte ohne logistische Probleme jede medizinische Einrichtung ohne Qualitätsverlust erreichen (Zanella et. al., 2021). Über die Ergebnisse der vorliegenden Forschungsarbeit wird weiterhin deutlich, dass die Aufreinigung der OMV zur Impfstoffapplikation möglicherweise nicht notwendig ist. Da OMV direkt über das Darmepithel aufgenommen werden, wäre eine Schluckimpfung mit einer modifizierten Bakterienkultur denkbar, welche die OMV und damit den Impfstoff direkt im Darm des Körpers generieren. Weitere Versuche sollten diesbezüglich durchgeführt werden, um die Sicherheit und Wirksamkeit zu bestätigen.

Die Einsatzmöglichkeiten der OMV beschränkt sich nicht nur auf die Prävention und Immunmodulation. Viele Untersuchungen werden unternommen, Medikamente in bestimmte Organe oder Zellen zu bringen, um systemische unerwünschte Wirkungen auf ein Minimum zu reduzieren. So werden beispielsweise bereits Therapeutika mit Hilfe von Nanopartikeln magnetisch markiert, um diese dann mit starken Magneten an die Tumorstellen zu bringen (Farzin 2020). Mit Hilfe von OMV, die so angepasst werden können, dass sie die Zielzellen ohne weiteres Zutun von Gerätschaften erreichen, könnte man eine ebenso effektive Arzneimittelverabreichung entwickeln (Fazal & Lee, 2021). Die Ladung kann dabei beliebig angepasst werden. Chemotherapeutika, Antibiotika, strahlungsaktive Substanzen, Proteine oder Enzyme könnten alle in Zukunft über OMV vermittelt werden. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass Vesikel in der Lage sind die Blut-Hirn-Schranke zu durchdringen. Diese These wird auch durch andere Arbeiten unterstützt (Stentz et. al., 2018). Dies ist insofern von großer Relevanz für die Medizin, weil viele Medikamente nicht in der Lage sind die Blut-Hirn-Schranke zu überwinden. Dadurch wird viel Forschung an

möglichen Mediatoren betrieben, um die Arznei in das zentrale Nervensystem zu bringen (Wu et. al., 2023). Die OMV könnten ein potenzieller Kandidat für ein solches Transportmedium bilden. Die vorliegende Arbeit zeigt, dass die Vesikel über das Darmepithel aufgenommen und im Körper verteilt werden. Weitere Studien zeigen, dass oral applizierte OMV ihre Wirkung beibehalten (Hong et. al., 2023; Jones et. al., 2020), sodass eine Einnahme der potenziellen OMV-Impfstoffe oder OMV-Arzneimittel durchaus oral als Tablettenform denkbar wäre. Dies würde einen zusätzlichen Vorteil bieten, da die Einnahme somit nicht an Faktoren wie Ort, Zeitpunkt und medizinischem Personal gebunden wäre.

Methodenfindung zur Isolierung Outer Membrane Vesicles

Der Isolationsprozess der OMV beginnt zunächst mit einem Anzüchten der Bakterien unter geeigneten Bedingungen. Hierbei spielt vor allem die Dauer der Wachstumsphase eine Rolle. Ist diese zu kurz, werden nur wenige OMV von den *E. coli* hergestellt und in die Umgebung abgegeben. Die Isolate zeigen eine schlechte Quantität. Wachsen die Bakterien hingegen zu lange, so sterben bereits einige wieder ab und viele Teilchen kontaminieren das Medium, sodass die Qualität des Isolats nicht gut genug ist. In welcher Phase des Wachstums der Bakterien die OMV isoliert werden, hängt maßgeblich vom Forschungsziel ab und unterscheidet sich daher auch unter den Forschungsgruppen zum Teil noch stark (Klimentová & Stulík, 2015). Daher wurden auch im Rahmen dieser Forschungsarbeit mehrere unterschiedliche Versuche durchgeführt, um ein passendes Verfahren zu finden. Viele Methoden zielen auf ein Wachstumsergebnis von OD₆₀₀=1,0 ab (Jung et. al., 2017; Libardo et. al., 2023). Die OD, also optische Dichte, ist dabei ein Messverfahren, welches die Anzahl der Bakterien abschätzen kann. Mehrere Versuche der Isolation zeigten jedoch, dass für diesen *E. coli* Cre Stamm die Inkubationszeit zu kurz ist. Die daraus resultierende Anzahl an OMV ist zu wenig, um sie in den kommenden Schritten erfolgreich zu extrahieren. Besonders zuverlässig erwies sich daher die Dauer des Wachstums an der Zeit zu orientieren. Diese Überlegung orientiert sich an den Ergebnissen anderer Isolationsversuche (Klimentová & Stulík, 2015). Das Übertragen von 100µl Bakterienisolat mit einer OD₆₀₀ von 1,0 stellte sicher, dass immer dieselbe Menge an Bakterien in frisches Medium übertragen wurde. Die anschließende Inkubationszeit von 16 Stunden erwies sich in mehreren Versuchen als optimal, wie auch von anderen Forschungsgruppen bestätigt werden konnte (Mordukhovich & Bahar, 2017).

Eine weitere Herausforderung war, eine geeignete und vor allem zuverlässige Möglichkeit zu finden die OMV von den Bakterien zu trennen und zu fällen. Da die Bakterien sehr viel schwerer und größer sind als ihre OMV, kann die Trennung sehr einfach über eine Zentrifuge mit anschließender Filtration vorgenommen werden. Die Filter waren dabei begrenzt auf 0,22µm. In dieser Größe gehen zwar bereits größere OMV verloren, jedoch konnte nur so sichergestellt werden, dass die daraus resultierende Lösung steril ist (Tsatsaronis et. al., 2018). Die nachfolgende Fällung der OMV ist der kritische Teil des Protokolls. Eine beliebte Methode zur Fällung der OMV

stellt die Ultrazentrifuge dar (Jung et. al., 2017; Juodeikis & Carding, 2022; Libardo et. al., 2023). Insgesamt ist diese Methode jedoch bei zwei Durchgängen mit einer Dauer von 2 Stunden (Jung et. al., 2017), beziehungsweise einen Durchgang bei 18 Stunden (Libardo et. al., 2023) zu zeitintensiv. Weiterhin verursacht die Ultrazentrifugation zu viel Schaden an den Vesikeln. Hierdurch können diese zerstört, oder so stark verändert werden, dass nachfolgende Untersuchungen an diesen OMV zu anderen Ergebnissen führen als bei einer schonenden Isolationsmethode (Juodeikis & Carding, 2022). Bei Experimenten, welche eine komplexere Zusammensetzung als Bakterienmedium aufweist, wird die Ultrazentrifugation jedoch notwendig. Eine Forschungsgruppe beschäftigte sich mit der Isolation von OMV aus Blut und Stuhl. Das veröffentlichte Protokoll empfiehlt dabei die Verwendung von Ultrafiltration, Ultrazentrifugation und Größenausschluss-Chromatography, um die OMV von eukaryotische EV, Lipiden, Proteinen, Nahrungsresten und weiteren Kontaminanten zu trennen (Tulkens et. al., 2020).

Ähnlich wie die Proteinfällung können OMV mit Hilfe des hydrophoben Effektes leichter pelletiert werden. Sowohl Polyethylenglykol als auch Ammoniumsulfat erwiesen sich als geeignete Kandidaten. Das PEG wie auch das Ammoniumsulfat können bei geeigneter Konzentration den OMV die Hydrathülle entziehen. Das Wasser steht nicht länger für etwaige Wechselwirkungen mit den OMV zur Verfügung und diese können so nicht länger in der löslichen Form gehalten werden. Es entsteht ein Niederschlag. Um dem Salz bzw. dem PEG die nötige Zeit zu geben die Hydrathüllen um sich aufzubauen, werden entsprechende Lösungen im Kühlschrank gelagert. In Anlehnung an bereits erfolgten Vorversuchen erwiesen sich eine Lösung von 10% PEG und 75 mM NaCl (Ludwig et. al., 2018) oder 40% Ammoniumsulfat (Tiwari et. al., 2017) als geeignet. Da die Fällung mit Ammoniumsulfat die resultierende Lösung für einige Experimente wie den WesternBlot unbrauchbar machte, stellte die PEG-Fällung die beste Methode dar. Die darauffolgenden Schritte der Zentrifugation, Ultrafiltration und erneuter Zentrifugation dienen einer immer weiteren Aufkonzentrierung ohne Risiko auf Verlust einiger OMV. Im letzten Schritt wird die PEG-Lösung gefällt und die OMV in einem geeigneten Medium aufgenommen.

Weiterhin sind die endgültige Menge und Konzentration der OMV in der Lösung stark vom Anwender abhängig. Für die hier durchgeführten Qualitätskontrollen der PCR und des WesternBlots stört diese Variable nicht besonders. Sollten jedoch in zukünftigen

Experimenten die Menge der eingesetzten Vesikel eine Rolle spielen, muss ein anderes Protokoll angewandt werden. Besonders nutzerfreundlich scheint hierbei eine Isolation durch Ultrafiltrationseinheiten (Klimentová & Stulík, 2015). Zwar nutzt auch dieses Protokoll die Ultrafiltration aus, jedoch nur für sehr kleine Mengen von 2-5 ml. Wenn die OMV aus mehreren Litern mit Hilfe der Filtrationsmethode isoliert werden sollen, müssen bestimmte Pumpen und Filter angeschafft werden. Da dies äußerst preisintensiv ist, sollte eine genaue Abwägung der Vor- und Nachteile durchgeführt werden. Bei quantitativen Analysen und bei Vergleichen der Ladung zwischen verschiedenen Größen der OMV wird die Filtrationsmethode zukünftig jedoch unumgänglich sein (Reimer et al., 2021).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass dieses Protokoll hervorragend für erste Experimente und Versuche mit OMV geeignet ist. Die Isolation ist leicht verständlich, bedient sich einfacher Gerätschaften und Laborausstattung und ist vergleichsweise sehr einfach gehalten. Bei größeren Vorhaben, oder qualitativer Vergleiche verschiedener OMV-Isolationen, sollte das Protokoll jedoch angepasst werden.

Literaturverzeichnis

- Agus, A., Denizot, J., Thévenot, J., Martinez-Medina, M., Massier, S., Sauvanet, P., Bernalier-Donadille, A., Denis, S., Hofman, P., Bonnet, R., Billard, E., & Barnich, N. (2016). Western diet induces a shift in microbiota composition enhancing susceptibility to Adherent-Invasive E. coli infection and intestinal inflammation. *Scientific Reports*, *6*(1), 19032. <https://doi.org/10.1038/srep19032>
- Ahmed, M. (2022). Functional, diagnostic and therapeutic aspects of bile. *Clinical and Experimental Gastroenterology*, *15*, 105–120. <https://doi.org/10.2147/ceg.s360563>
- Ahn, J., Sinha, R., Pei, Z., Dominianni, C., Wu, J., Shi, J., Goedert, J. J., Hayes, R. B., & Yang, L. (2013). Human gut microbiome and risk for colorectal cancer. *Journal of the National Cancer Institute*, *105*(24), 1907–1911. <https://doi.org/10.1093/jnci/djt300>
- Al Bander, Z., Nitert, M. D., Mousa, A., & Naderpoor, N. (2020). The gut Microbiota and inflammation: An overview. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, *17*(20), 7618. <https://doi.org/10.3390/ijerph17207618>
- Allard, B. (2018). From excitation to intracellular Ca²⁺ movements in skeletal muscle: Basic aspects and related clinical disorders. *Neuromuscular Disorders: NMD*, *28*(5), 394–401. <https://doi.org/10.1016/j.nmd.2018.03.004>
- Alvarez, C.-S., Giménez, R., Cañas, M.-A., Vera, R., Díaz-Garrido, N., Badia, J., & Baldomà, L. (2019). Extracellular vesicles and soluble factors secreted by Escherichia coli Nissle 1917 and ECOR63 protect against enteropathogenic E. coli-induced intestinal epithelial barrier dysfunction. *BMC Microbiology*, *19*(1), 166. <https://doi.org/10.1186/s12866-019-1534-3>
- Amatya, S. B., Salmi, S., Kainulainen, V., Karihtala, P., & Reunanen, J. (2021). Bacterial extracellular vesicles in gastrointestinal tract cancer: An unexplored territory. *Cancers*, *13*(21), 5450. <https://doi.org/10.3390/cancers13215450>
- Anel, A., Gallego-Lleyda, A., de Miguel, D., Naval, J., & Martínez-Lostao, L. (2019). Role of exosomes in the regulation of T-cell mediated immune responses and in autoimmune disease. *Cells (Basel, Switzerland)*, *8*(2), 154. <https://doi.org/10.3390/cells8020154>
- Anand, S., Samuel, M., Kumar, S., & Mathivanan, S. (2019). Ticket to a bubble ride: Cargo sorting into exosomes and extracellular vesicles. *Biochimica et Biophysica Acta. Proteins and Proteomics*, *1867*(12), 140203. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2019.02.005>
- Andres, J., Smith, L. C., Murray, A., Jin, Y., Businaro, R., Laskin, J. D., & Laskin, D. L. (2020). Role of extracellular vesicles in cell-cell communication and inflammation

- following exposure to pulmonary toxicants. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 51, 12–18. <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2019.12.001>
- Bittel, M., Reichert, P., Sarfati, I., Dressel, A., Leikam, S., Uderhardt, S., Stolzer, I., Phu, T. A., Ng, M., Vu, N. K., Tenzer, S., Distler, U., Wirtz, S., Rothhammer, V., Neurath, M. F., Raffai, R. L., Günther, C., & Momma, S. (2021). Visualizing transfer of microbial biomolecules by outer membrane vesicles in microbe-host-communication in vivo. *Journal of Extracellular Vesicles*, 10(12), e12159. <https://doi.org/10.1002/jev2.12159>
- Buscarinu, M. C., Fornasiero, A., Romano, S., Ferraldeschi, M., Mechelli, R., Reniè, R., Morena, E., Romano, C., Pellicciari, G., Landi, A. C., Salvetti, M., & Ristori, G. (2019). The contribution of gut barrier changes to multiple sclerosis pathophysiology. *Frontiers in immunology*, 10. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01916>
- Cai, J.-S., & Chen, J.-H. (2014). The mechanism of enterohepatic circulation in the formation of gallstone disease. *The Journal of Membrane Biology*, 247(11), 1067–1082. <https://doi.org/10.1007/s00232-014-9715-3>
- Calloni, G., Chen, T., Schermann, S. M., Chang, H.-C., Genevoux, P., Agostini, F., Tartaglia, G. G., Hayer-Hartl, M., & Hartl, F. U. (2012). DnaK functions as a central hub in the E. coli chaperone network. *Cell Reports*, 1(3), 251–264. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2011.12.007>
- Carabotti, M., Scirocco, A., Maselli, M. A., & Severi, C. (2015). The gut-brain axis: interactions between enteric microbiota, central and enteric nervous systems. *Annals of Gastroenterology*, 28(2), 203–209.
- Caruso, R., Lo, B. C., & Núñez, G. (2020). Host-microbiota interactions in inflammatory bowel disease. *Nature Reviews. Immunology*, 20(7), 411–426. <https://doi.org/10.1038/s41577-019-0268-7>
- Chennakrishnaiah, S., Meehan, B., D'Asti, E., Montermini, L., Lee, T.-H., Karatzas, N., Buchanan, M., Tawil, N., Choi, D., Divangahi, M., Basik, M., & Rak, J. (2018). Leukocytes as a reservoir of circulating oncogenic DNA and regulatory targets of tumor-derived extracellular vesicles. *Journal of Thrombosis and Haemostasis: JTH*, 16(9), 1800–1813. <https://doi.org/10.1111/jth.14222>
- Cocucci, E., Racchetti, G., & Meldolesi, J. (2009). Shedding microvesicles: artefacts no more. *Trends in Cell Biology*, 19(2), 43–51. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2008.11.003>
- Constantinescu, C. S., Farooqi, N., O'Brien, K., & Gran, B. (2011). Experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) as a model for multiple sclerosis (MS): EAE as model for MS. *British Journal of Pharmacology*, 164(4), 1079–1106. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2011.01302.x>
- Cossu, D., Yokoyama, K., & Hattori, N. (2018). Bacteria-host interactions in multiple sclerosis. *Frontiers in Microbiology*, 9, 2966. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02966>

- Czernek, L., Chworos, A., & Duechler, M. (2015). The uptake of extracellular vesicles is affected by the differentiation status of myeloid cells. *Scandinavian Journal of Immunology*, 82(6), 506–514. <https://doi.org/10.1111/sji.12371>
- D’Arcy, M. S. (2019). Cell death: a review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy. *Cell Biology International*, 43(6), 582–592. <https://doi.org/10.1002/cbin.11137>
- Denning, T. L., Wang, Y.-C., Patel, S. R., Williams, I. R., & Pulendran, B. (2007). Lamina propria macrophages and dendritic cells differentially induce regulatory and interleukin 17-producing T cell responses. *Nature Immunology*, 8(10), 1086–1094. <https://doi.org/10.1038/ni1511>
- Dobson, R., & Giovannoni, G. (2019). Multiple sclerosis - a review. *European Journal of Neurology: The Official Journal of the European Federation of Neurological Societies*, 26(1), 27–40. <https://doi.org/10.1111/ene.13819>
- Dos Anjos Cassado, A. (2017). F4/80 as a major macrophage marker: The case of the peritoneum and spleen. *Results and Problems in Cell Differentiation*, 62, 161–179. https://doi.org/10.1007/978-3-319-54090-0_7
- Doyle, L. M., & Wang, M. Z. (2019). Overview of extracellular vesicles, their origin, composition, purpose, and methods for exosome isolation and analysis. *Cells (Basel, Switzerland)*, 8(7), 727. <https://doi.org/10.3390/cells8070727>
- El Aidy, S., Hooiveld, G., Tremaroli, V., Bäckhed, F., & Kleerebezem, M. (2013). The gut microbiota and mucosal homeostasis: colonized at birth or at adulthood, does it matter?: Colonized at birth or at adulthood, does it matter? *Gut Microbes*, 4(2), 118–124. <https://doi.org/10.4161/gmic.23362>
- Ellis, T. N., & Kuehn, M. J. (2010). Virulence and immunomodulatory roles of bacterial outer membrane vesicles. *Microbiology and Molecular Biology Reviews: MMBR*, 74(1), 81–94. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00031-09>
- Elmore, S. (2007). Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicologic Pathology*, 35(4), 495–516. <https://doi.org/10.1080/01926230701320337>
- EMA. (2020, Dezember 21). *Comirnaty*. European Medicines Agency. <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/comirnaty>
- Faber, D. S., & Pereda, A. E. (2018). Two forms of electrical transmission between neurons. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 11, 427. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2018.00427>
- Farzin, A., Etesami, S. A., Quint, J., Memic, A., & Tamayol, A. (2020). Magnetic nanoparticles in cancer therapy and diagnosis. *Advanced Healthcare Materials*, 9(9), e1901058. <https://doi.org/10.1002/adhm.201901058>

- Fazal, S., & Lee, R. (2021). Biomimetic Bacterial Membrane Vesicles for drug delivery applications. *Pharmaceutics*, 13(9), 1430.
<https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13091430>
- Ferguson, S. M., & De Camilli, P. (2012). Dynamin, a membrane-remodelling GTPase. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 13(2), 75–88.
<https://doi.org/10.1038/nrm3266>
- Fetissov, S. O. (2017). Role of the gut microbiota in host appetite control: bacterial growth to animal feeding behaviour. *Nature Reviews. Endocrinology*, 13(1), 11–25.
<https://doi.org/10.1038/nrendo.2016.150>
- Fletcher, J. R., Pike, C. M., Parsons, R. J., Rivera, A. J., Foley, M. H., McLaren, M. R., Montgomery, S. A., & Theriot, C. M. (2021). *Clostridioides difficile* exploits toxin-mediated inflammation to alter the host nutritional landscape and exclude competitors from the gut microbiota. *Nature Communications*, 12(1), 462.
<https://doi.org/10.1038/s41467-020-20746-4>
- Forbes, J. D., Van Domselaar, G., & Bernstein, C. N. (2016). The gut Microbiota in immune-mediated inflammatory diseases. *Frontiers in Microbiology*, 7, 1081.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01081>
- Furness, J. B. (2012). The enteric nervous system and neurogastroenterology. *Nature Reviews. Gastroenterology & Hepatology*, 9(5), 286–294.
<https://doi.org/10.1038/nrgastro.2012.32>
- Gehart, H., & Clevers, H. (2019). Tales from the crypt: new insights into intestinal stem cells. *Nature Reviews. Gastroenterology & Hepatology*, 16(1), 19–34.
<https://doi.org/10.1038/s41575-018-0081-y>
- Ghosh, G., & Jesudian, A. B. (2019). Small intestinal bacterial overgrowth in patients with cirrhosis. *Journal of Clinical and Experimental Hepatology*, 9(2), 257–267.
<https://doi.org/10.1016/j.jceh.2018.08.006>
- Green, E. R., & Meccas, J. (2016). Bacterial secretion systems: An overview. *Microbiology Spectrum*, 4(1). <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.vmbf-0012-2015>
- Günther, C., Buchen, B., He, G.-W., Hornef, M., Torow, N., Neumann, H., Wittkopf, N., Martini, E., Basic, M., Bleich, A., Watson, A. J. M., Neurath, M. F., & Becker, C. (2015). Caspase-8 controls the gut response to microbial challenges by Tnf- α -dependent and independent pathways. *Gut*, 64(4), 601–610.
<https://doi.org/10.1136/gutjnl-2014-307226>
- Günther, C., Martini, E., Wittkopf, N., Amann, K., Weigmann, B., Neumann, H., Waldner, M. J., Hedrick, S. M., Tenzer, S., Neurath, M. F., & Becker, C. (2011). Caspase-8 regulates TNF- α -induced epithelial necroptosis and terminal ileitis. *Nature*, 477(7364), 335–339. <https://doi.org/10.1038/nature10400>

- Günther, C., Rothhammer, V., Karow, M., Neurath, M., & Winner, B. (2021). The gut-brain axis in inflammatory bowel disease—current and future perspectives. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(16), 8870. <https://doi.org/10.3390/ijms22168870>
- He, Z., Greven, J., Shi, Y., Qin, K., Zhao, Q., Zhang, X., Buhl, E. M., Eschweiler, J., Hildebrand, F., & Balmayor, E. R. (2023). Extracellular vesicles derived from endothelial cells modulate macrophage phenotype in vitro. *European Journal of Medical Research*, 28(1). <https://doi.org/10.1186/s40001-023-01427-6>
- Hills, R. D., Jr, Pontefract, B. A., Mishcon, H. R., Black, C. A., Sutton, S. C., & Theberge, C. R. (2019). Gut microbiome: Profound implications for diet and disease. *Nutrients*, 11(7), 1613. <https://doi.org/10.3390/nu11071613>
- Hong, M., Li, Z., Liu, H., Zheng, S., Zhang, F., Zhu, J., Shi, H., Ye, H., Chou, Z., Gao, L., Diao, J., Zhang, Y., Zhang, D., Chen, S., Zhou, H., & Li, J. (2023). *Fusobacterium nucleatum* aggravates rheumatoid arthritis through FadA-containing outer membrane vesicles. *Cell Host & Microbe*, 31(5), 798-810.e7. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2023.03.018>
- Hou, Q., Huang, J., Ayansola, H., Masatoshi, H., & Zhang, B. (2020). Intestinal stem cells and immune cell relationships: Potential therapeutic targets for inflammatory bowel diseases. *Frontiers in Immunology*, 11, 623691. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.623691>
- Jang, S. C., Kim, S. R., Yoon, Y. J., Park, K.-S., Kim, J. H., Lee, J., Kim, O. Y., Choi, E.-J., Kim, D.-K., Choi, D.-S., Kim, Y.-K., Park, J., Di Vizio, D., & Gho, Y. S. (2015). In vivo kinetic biodistribution of nano-sized outer membrane vesicles derived from bacteria. *Small*, 11(4), 456–461. <https://doi.org/10.1002/smll.201401803>
- Jangi, S., Gandhi, R., Cox, L. M., Li, N., von Glehn, F., Yan, R., Patel, B., Mazzola, M. A., Liu, S., Glanz, B. L., Cook, S., Tankou, S., Stuart, F., Melo, K., Nejad, P., Smith, K., Topçuoğlu, B. D., Holden, J., Kivisäkk, P., ... Weiner, H. L. (2016). Alterations of the human gut microbiome in multiple sclerosis. *Nature Communications*, 7(1), 12015. <https://doi.org/10.1038/ncomms12015>
- Jones, E. J., Booth, C., Fonseca, S., Parker, A., Cross, K., Miquel-Clopés, A., Hautefort, I., Mayer, U., Wileman, T., Stentz, R., & Carding, S. R. (2020). The uptake, trafficking, and biodistribution of *Bacteroides thetaiotaomicron* generated outer membrane vesicles. *Frontiers in Microbiology*, 11, 57. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00057>
- Jung, A. L., Hoffmann, K., Herkt, C. E., Schulz, C., Bertrams, W., & Schmeck, B. (2017). *Legionella pneumophila* outer membrane vesicles: Isolation and analysis of their pro-inflammatory potential on macrophages. *Journal of Visualized Experiments: JoVE*, 120. <https://doi.org/10.3791/55146>
- Juodeikis, R., & Carding, S. R. (2022). Outer membrane vesicles: Biogenesis, functions, and issues. *Microbiology and Molecular Biology Reviews: MMBR*, 86(4). <https://doi.org/10.1128/mmbr.00032-22>

- Juza, R. M., & Pauli, E. M. (2014). Clinical and surgical anatomy of the liver: a review for clinicians: Clinical and Surgical Anatomy of the Liver. *Clinical Anatomy (New York, N.Y.)*, 27(5), 764–769. <https://doi.org/10.1002/ca.22350>
- Kadowaki, A., & Quintana, F. J. (2020). The gut-CNS axis in multiple sclerosis. *Trends in Neurosciences*, 43(8), 622–634. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2020.06.002>
- Kashima, R., Roy, S., Ascano, M., Martinez-Cerdeno, V., Ariza-Torres, J., Kim, S., Louie, J., Lu, Y., Leyton, P., Bloch, K. D., Kornberg, T. B., Hagerman, P. J., Hagerman, R., Lagna, G., & Hata, A. (2016). Augmented noncanonical BMP type II receptor signaling mediates the synaptic abnormality of fragile X syndrome. *Science Signaling*, 9(431), ra58. <https://doi.org/10.1126/scisignal.aaf6060>
- Kimura, K. (2020). Regulatory T cells in multiple sclerosis. *Clinical & Experimental Neuroimmunology*, 11(3), 148–155. <https://doi.org/10.1111/cen3.12591>
- Klimentová, J., & Stulík, J. (2015). Methods of isolation and purification of outer membrane vesicles from gram-negative bacteria. *Microbiological Research*, 170, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2014.09.006>
- Lee, Y. K., Menezes, J. S., Umesaki, Y., & Mazmanian, S. K. (2011). Proinflammatory T-cell responses to gut microbiota promote experimental autoimmune encephalomyelitis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108 Suppl 1(supplement_1), 4615–4622. <https://doi.org/10.1073/pnas.1000082107>
- Li, M., Liao, L., & Tian, W. (2020). Extracellular vesicles derived from apoptotic cells: An essential link between death and regeneration. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 8, 573511. <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.573511>
- Libardo, M. D. J., Durr, E., & Hernandez, L. D. (2023). A robust protocol to isolate outer membrane vesicles from nontypeable Haemophilus influenzae. *Methods and Protocols*, 6(2), 42. <https://doi.org/10.3390/mps6020042>
- Ludwig, A.-K., De Miroshedji, K., Doepfner, T. R., Börger, V., Ruesing, J., Rebmann, V., Durst, S., Jansen, S., Bremer, M., Behrmann, E., Singer, B. B., Jastrow, H., Kuhlmann, J. D., El Magraoui, F., Meyer, H. E., Hermann, D. M., Opalka, B., Raunser, S., Epple, M., ... Giebel, B. (2018). Precipitation with polyethylene glycol followed by washing and pelleting by ultracentrifugation enriches extracellular vesicles from tissue culture supernatants in small and large scales. *Journal of Extracellular Vesicles*, 7(1), 1528109. <https://doi.org/10.1080/20013078.2018.1528109>
- McBroom, A. J., Johnson, A. P., Vemulapalli, S., & Kuehn, M. J. (2006). Outer membrane vesicle production by Escherichia coli is independent of membrane instability. *Journal of Bacteriology*, 188(15), 5385–5392. <https://doi.org/10.1128/JB.00498-06>
- Miyake, S., Kim, S., Suda, W., Oshima, K., Nakamura, M., Matsuoka, T., Chihara, N., Tomita, A., Sato, W., Kim, S.-W., Morita, H., Hattori, M., & Yamamura, T. (2015).

- Dysbiosis in the gut Microbiota of patients with multiple sclerosis, with a striking depletion of species belonging to Clostridia XIVa and IV clusters. *PloS One*, 10(9), e0137429. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0137429>
- Mordukhovich, G., & Bahar, O. (2017). Isolation of Outer Membrane Vesicles from Phytopathogenic *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. *Bio-Protocol*, 7(5), e2160. <https://doi.org/10.21769/BioProtoc.2160>
- Mosser, D. M., & Edwards, J. P. (2008). Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nature Reviews. Immunology*, 8(12), 958–969. <https://doi.org/10.1038/nri2448>
- Mowat, A. M., & Agace, W. W. (2014). Regional specialization within the intestinal immune system. *Nature Reviews. Immunology*, 14(10), 667–685. <https://doi.org/10.1038/nri3738>
- Mozaheb, N., & Mingeot-Leclercq, M.-P. (2020). Membrane vesicle production as a bacterial defense against stress. *Frontiers in microbiology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.600221>
- Mullish, B. H., & Williams, H. R. (2018). Clostridium difficile infection and antibiotic-associated diarrhoea. *Clinical Medicine (London, England)*, 18(3), 237–241. <https://doi.org/10.7861/clinmedicine.18-3-237>
- Muraca, M., Putignani, L., Fierabracci, A., Teti, A., & Perilongo, G. (2015). Gut microbiota-derived outer membrane vesicles: under-recognized major players in health and disease? *Discovery Medicine*, 19(106), 343–348.
- Ochoa-Repáraz, J., Mielcarz, D. W., Ditrio, L. E., Burroughs, A. R., Foureau, D. M., Haque-Begum, S., & Kasper, L. H. (2009). Role of gut commensal microflora in the development of experimental autoimmune encephalomyelitis. *The Journal of Immunology*, 183(10), 6041–6050. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0900747>
- Ohashi, A., Murata, A., Cho, Y., Ichinose, S., Sakamaki, Y., Nishio, M., Hoshi, O., Fischer, S., Preissner, K. T., & Koyama, T. (2017). The expression and localization of RNase and RNase inhibitor in blood cells and vascular endothelial cells in homeostasis of the vascular system. *PloS One*, 12(3), e0174237. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0174237>
- Preta, G., Cronin, J. G., & Sheldon, I. M. (2015). Dynasore - not just a dynamin inhibitor. *Cell Communication and Signaling: CCS*, 13(1), 24. <https://doi.org/10.1186/s12964-015-0102-1>
- Ramos-Zaldívar, H. M., Polakovicova, I., Salas-Huenuleo, E., Corvalán, A. H., Kogan, M. J., Yefi, C. P., & Andia, M. E. (2022). Extracellular vesicles through the blood–brain barrier: a review. *Fluids and Barriers of the CNS*, 19(1). <https://doi.org/10.1186/s12987-022-00359-3>

- Rezaei Adriani, R., Mousavi Gargari, S. L., Bakherad, H., & Amani, J. (2023). Anti-EGFR bioengineered bacterial outer membrane vesicles as targeted immunotherapy candidate in triple-negative breast tumor murine model. *Scientific Reports*, *13*(1), 1–15. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-43762-y>
- Reimer, S. L., Beniac, D. R., Hiebert, S. L., Booth, T. F., Chong, P. M., Westmacott, G. R., Zhanel, G. G., & Bay, D. C. (2021). Comparative analysis of outer membrane vesicle isolation methods with an *Escherichia coli* tolA mutant reveals a hypervesiculating phenotype with outer-inner membrane vesicle content. *Frontiers in Microbiology*, *12*, 628801. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.628801>
- Rhee, S. H. (2014). Lipopolysaccharide: basic biochemistry, intracellular signaling, and physiological impacts in the gut. *Intestinal Research*, *12*(2), 90–95. <https://doi.org/10.5217/ir.2014.12.2.90>
- Salzman, N. H., Underwood, M. A., & Bevins, C. L. (2007). Paneth cells, defensins, and the commensal microbiota: a hypothesis on intimate interplay at the intestinal mucosa. *Seminars in Immunology*, *19*(2), 70–83. <https://doi.org/10.1016/j.smim.2007.04.002>
- Sánchez de Medina, F., Romero-Calvo, I., Mascaraque, C., & Martínez-Augustin, O. (2014). Intestinal inflammation and mucosal barrier function. *Inflammatory Bowel Diseases*, *20*(12), 2394–2404. <https://doi.org/10.1097/MIB.0000000000000204>
- Schächtle, M. A., & Rosshart, S. P. (2021). The Microbiota-gut-brain axis in health and disease and its implications for translational research. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, *15*, 698172. <https://doi.org/10.3389/fncel.2021.698172>
- Schepici, G., Silvestro, S., Bramanti, P., & Mazzon, E. (2019). The gut Microbiota in multiple sclerosis: An overview of clinical trials. *Cell Transplantation*, *28*(12), 1507–1527. <https://doi.org/10.1177/0963689719873890>
- Schoultz, I., & Keita, Å. V. (2020). The intestinal barrier and current techniques for the assessment of gut permeability. *Cells (Basel, Switzerland)*, *9*(8), 1909. <https://doi.org/10.3390/cells9081909>
- Spencer, N. J., & Hu, H. (2020). Enteric nervous system: sensory transduction, neural circuits and gastrointestinal motility. *Nature Reviews. Gastroenterology & Hepatology*, *17*(6), 338–351. <https://doi.org/10.1038/s41575-020-0271-2>
- Stärkel, P., & Schnabl, B. (2016). Bidirectional communication between liver and gut during alcoholic liver disease. *Seminars in Liver Disease*, *36*(4), 331–339. <https://doi.org/10.1055/s-0036-1593882>
- Stentz, R., Carvalho, A. L., Jones, E. J., & Carding, S. R. (2018). Fantastic voyage: the journey of intestinal microbiota-derived microvesicles through the body. *Biochemical Society Transactions*, *46*(5), 1021–1027. <https://doi.org/10.1042/BST20180114>

- Tiwari, V. (2017). Significances of OMV and Extracellular Vesicle Proteomics. *Journal of data mining in genomics & proteomics*, 08(01).
- Tripathi, A., Debelius, J., Brenner, D. A., Karin, M., Loomba, R., Schnabl, B., & Knight, R. (2018). The gut-liver axis and the intersection with the microbiome. *Nature Reviews. Gastroenterology & Hepatology*, 15(7), 397–411. <https://doi.org/10.1038/s41575-018-0011-z>
- Tsatsaronis, J. A., Franch-Arroyo, S., Resch, U., & Charpentier, E. (2018). Extracellular vesicle RNA: A universal mediator of microbial communication? *Trends in Microbiology*, 26(5), 401–410. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2018.02.009>
- Tulkens, J., De Wever, O., & Hendrix, A. (2020). Analyzing bacterial extracellular vesicles in human body fluids by orthogonal biophysical separation and biochemical characterization. *Nature Protocols*, 15(1), 40–67. <https://doi.org/10.1038/s41596-019-0236-5>
- Turner, J. R. (2009). Intestinal mucosal barrier function in health and disease. *Nature Reviews. Immunology*, 9(11), 799–809. <https://doi.org/10.1038/nri2653>
- van der Ley, P. A., Zariri, A., van Riet, E., Oosterhoff, D., & Kruiswijk, C. P. (2021). An intranasal OMV-based vaccine induces high mucosal and systemic protecting immunity against a SARS-CoV-2 infection. *Frontiers in immunology*, 12. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.781280>
- Wang, Y., Tong, J., Chang, B., Wang, B., Zhang, D., & Wang, B. (2014). Effects of alcohol on intestinal epithelial barrier permeability and expression of tight junction-associated proteins. *Molecular Medicine Reports*, 9(6), 2352–2356. <https://doi.org/10.3892/mmr.2014.2126>
- Wehkamp, J., Götz, M., Herrlinger, K., Steurer, W., & Stange, E. F. (2016). Inflammatory bowel disease. *Deutsches Arzteblatt International*, 113(5), 72–82. <https://doi.org/10.3238/arztebl.2016.0072>
- Williams, J. M., Duckworth, C. A., Burkitt, M. D., Watson, A. J. M., Campbell, B. J., & Pritchard, D. M. (2015). Epithelial cell shedding and barrier function: a matter of life and death at the small intestinal villus tip: A matter of life and death at the small intestinal villus tip. *Veterinary Pathology*, 52(3), 445–455. <https://doi.org/10.1177/0300985814559404>
- Wood, J. D. (2000). Neuropathy in the brain-in-the-gut. *European Journal of Gastroenterology & Hepatology*, 12(6), 597–600. <https://doi.org/10.1097/00042737-200012060-00002>
- Wu, D., Chen, Q., Chen, X., Han, F., Chen, Z., & Wang, Y. (2023). The blood–brain barrier: structure, regulation, and drug delivery. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 8(1), 1–27. <https://doi.org/10.1038/s41392-023-01481-w>

- Yaron, S., Kolling, G. L., Simon, L., & Matthews, K. R. (2000). Vesicle-mediated transfer of virulence genes from *Escherichia coli* O157:H7 to other enteric bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(10), 4414–4420. <https://doi.org/10.1128/AEM.66.10.4414-4420.2000>
- Zanella, I., König, E., Tomasi, M., Gagliardi, A., Frattini, L., Fantappiè, L., Irene, C., Zerbini, F., Caproni, E., Isaac, S. J., Grigolato, M., Corbellari, R., Valensin, S., Ferlenghi, I., Giusti, F., Bini, L., Ashhab, Y., Grandi, A., & Grandi, G. (2021). Proteome-minimized outer membrane vesicles from *Escherichia coli* as a generalized vaccine platform. *Journal of Extracellular Vesicles*, 10(4), e12066. <https://doi.org/10.1002/jev2.12066>
- Zhang, Y., Liu, Y., Liu, H., & Tang, W. H. (2019). Exosomes: biogenesis, biologic function and clinical potential. *Cell & Bioscience*, 9(1), 19. <https://doi.org/10.1186/s13578-019-0282-2>
- Zhang, Y.-J., Li, S., Gan, R.-Y., Zhou, T., Xu, D.-P., & Li, H.-B. (2015). Impacts of gut bacteria on human health and diseases. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(12), 7493–7519. <https://doi.org/10.3390/ijms16047493>

Verzeichnis der bisherigen Veröffentlichungen

Bittel, M., Reichert, P., Sarfati, I., Dressel, A., Leikam, S., Uderhardt, S., Stolzer, I., Phu, T. A., Ng, M., Vu, N. K., Tenzer, S., Distler, U., Wirtz, S., Rothhammer, V., Neurath, M. F., Raffai, R. L., Günther, C., & Momma, S. (2021). Visualizing transfer of microbial biomolecules by outer membrane vesicles in microbe-host-communication in vivo. *Journal of Extracellular Vesicles*, 10(12), e12159.
<https://doi.org/10.1002/jev2.12159>

Abkürzungsverzeichnis

ACK	<i>Ammonium-Chlorid-Kalium</i>
Actb	<i>Beta-actin</i>
ANOVA	<i>Varianzanalyse</i>
AS	<i>Ammoniumsulfat</i>
BCM	<i>Basales Kulturmedium</i>
BSA	<i>Bovines Serumalbumin</i>
<i>C. difficile</i>	<i>Clostridium difficile</i>
CCM	<i>Krypten Kulturmedium</i>
CD31	<i>Cluster of Differentiation 31</i>
cDNA	<i>komplementäre DNA</i>
CFSE	<i>Carboxyfluoresceinsuccinimidylester</i>
CIB	<i>Zellisolationpuffer</i>
Col	<i>Kollagen</i>
dH ₂ O	<i>Steriles destilliertes Wasser</i>
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DMSO	<i>Dimethylsulfoxid</i>
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
dNTP	<i>Nukleosidtriphosphate</i>
DTT	<i>Dithiotreitol, Dithiothreitol</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EAE	<i>Experimentelle autoimmune Enzephalitis</i>
ECL	<i>Enhanced chemiluminescence</i>
EDTA	<i>Ethylendiamintetraacetat</i>
EGF	<i>Epithelial Growth Factor</i>
EHEC	<i>Enterohämorrhagische Escherichia coli</i>
ELISA	<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i>
ESCRT	<i>Endosomal Sorting Complex Required for Transport</i>
EtOH	<i>Ethanol</i>
EV	<i>Extrazelluläre Vesikel</i>
FCS	<i>Fetal Calve Serum</i>
FELASA	<i>Federation of European Laboratory Animal Science Associations</i>
FISH	<i>Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung</i>
GALT	<i>Darmassoziiertes lymphatisches Gewebe</i>
GFP	<i>Grün fluoreszierendes Protein</i>
HCl	<i>Salzsäure</i>
HE	<i>Hämatoxylin-Eosin</i>
HEPES	<i>2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure</i>
IE	<i>Internationale Einheiten</i>
IEC	<i>Intestinale Epithelzellen</i>

Infy	<i>Interferon γ</i>
KCl	<i>Kaliumchlorid</i>
KG	<i>Körpergewicht</i>
KH ₂ PO ₄	<i>Kaliumdihydrogenphosphat</i>
KHCO ₃	<i>Kaliumhydrogencarbonat</i>
LB	<i>Lysogeny broth</i>
LPS	<i>Lipopolysaccharide</i>
miRNA	<i>Micro ribonucleic acid</i>
MPO	<i>Myeloperoxidase</i>
mRNA	<i>Messenger ribonucleic acid</i>
MS	<i>Multiple Sklerose</i>
MVB	<i>Multivesicular bodies</i>
MWCO	<i>Molecular weight cut-off</i>
Na ₂ HPO ₄	<i>Dinatriumhydrogenphosphat</i>
NAC	<i>N-Acetylcystein</i>
NaCl	<i>Natriumchlorid</i>
NaOH	<i>Natriumhydroxid</i>
ns	<i>Nicht signifikant</i>
OD	<i>Optische Dichte</i>
Omp	<i>Äußeres Membranprotein</i>
OMV	<i>Outer membrane vesicles</i>
PBS	<i>Phosphat-gepufferte Salzlösung</i>
PCR	<i>Polymerase-Kettenreaktion</i>
PEG	<i>Polyethylenglykol</i>
PFA	<i>Paraformaldehyd</i>
PolyIC	<i>Polyinosinsäure:Polycytidylsäure</i>
RNase	<i>Ribonuklease</i>
rpm	<i>Umdrehungen pro Minute</i>
rRNA	<i>ribosomale Ribonukleinsäure</i>
RT	<i>Reverse Transkriptase</i>
SDS	<i>Natriumlaurylsulfat</i>
SFB	<i>Segmentiert filamentöse Bakterien</i>
TAE	<i>TRIS-Acetat-EDTA</i>
TBS	<i>Trisgepufferte Saline</i>
tdT	<i>tdTomato</i>
TNF α	<i>Tumornekrosefaktor-α</i>
TRIS	<i>Tris(hydroxymethyl)aminomethan</i>
TSA	<i>Tyramide Signal Amplification</i>
VEGFR	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>
VE-Wasser	<i>Vollentsalztes Wasser</i>
ZNS	<i>Zentrales Nervensystem</i>
α -SMA	<i>Glatte-Muskulatur-Antikörper</i>

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Entstehung extrazellulärer Vesikel	8
Abbildung 2: Aufnahme von zellfremden extrazellulären Vesikeln	10
Abbildung 3: Transzellulärer und Parazellulärer Transport.....	12
Abbildung 4: Der Enterohepatische Kreislauf (Ahmed, M. 2022).....	16
Abbildung 5: Einfluss von LPS auf das Dünndarmepithel.....	49
Abbildung 6: Immunhistologie zur Identifikation EV-aufnehmender Zellen	50
Abbildung 7: Aufnahme von EV aus dem Darm in der Leber	52
Abbildung 8: EV-Distribution im Gehirn.....	53
Abbildung 9: T-Zellen exprimieren kein tdTomato nach EV-Kontakt.....	55
Abbildung 10: Bakterienwachstum nach Durchführung des Experimentes	57
Abbildung 11: Vergleich der tdTomato-Expression in Leber und Darm	58
Abbildung 12: Makrophagen zeigen deutliche Zeichen der Rekombination im Dünndarm	59
Abbildung 13: OMV zeigen sich in verschiedenen Kompartimenten der Villi...	61
Abbildung 14: Manipulation der OMV-Aufnahme in Rosa26tdTomato Dünndarmorganoiden mit Dynasore	62
Abbildung 15: Dynasore vermindert Rekombination durch E. coli Cre.....	64
Abbildung 16: Isolationsprozess der OMV mit PEG-Fällung	66
Abbildung 17: PCR-Nachweis der OMV-Isolation.....	67
Abbildung 18: WesternBlot Ergebnisse	68

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Auflistung der verwendeten Verbrauchs- und Hilfsmaterialien.....	22
Tabelle 2: Auflistung der verwendeten Geräte und Maschinen	23
Tabelle 3: Auflistung der verwendeten Software-Programme	24
Tabelle 4: Auflistung der verwendeten Chemikalien	25
Tabelle 5: Auflistung der verwendeten Puffer	27
Tabelle 6: Auflistung der verwendeten Primer	27
Tabelle 7: Auflistung der verwendeten PCR-Programme	28
Tabelle 8: Auflistung der verwendeten Stimulantien und Medikamente.....	28
Tabelle 9: Auflistung der verwendeten Antikörper und Färbungen	30
Tabelle 10: Auflistung der verwendeten Kits.....	30
Tabelle 11: Mauslinien.....	31