Aus dem Institut für Humangenetik
Theoretische Medizin und Biowissenschaften
der Medizinischen Fakultät
der Universität des Saarlandes, Homburg/Saar

Bidirektionale Kommunikation von Eukaryoten und Prokaryoten über extrazelluläre Vesikel

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Naturwissenschaften

der Medizinischen Fakultät

der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

2025

vorgelegt von
Laura Gröger
geb. am 29.06.1994
in Ludwigslust

Tag der Promotion: 02.09.2025

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Matthias Hannig

Berichterstatter: Prof. Dr. Eckart Meese
Prof. Dr. Dr. Sören L. Becker
Prof. Dr. Thomas Hankeln

„Ich habe gelernt, dass der Weg des Fortschritts
weder kurz noch unbeschwerlich ist.“

Marie Curie

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis ..... **I**
Abbildungsverzeichnis ..... **VI**
Tabellenverzeichnis ..... **X**
Abkürzungsverzeichnis ..... **XII**
1. Zusammenfassung **1**
Summary **3**
2. Einleitung **5**
2.1 *Morbus* Parkinson (M. Parkinson) 5
2.2 Das humane Darmmikrobiom 7
2.2.1 Veränderungen im Darmmikrobiom von Patienten mit M. Parkinson 8
2.3 Zell-Zell-Kommunikation 9
2.3.1 Extrazelluläre Vesikel (EVs) 10
2.3.2 Rolle von EVs und EV-RNAs bei der Zell-Zell-Kommunikation 12
2.4 Ausgangspunkt und Zielsetzung der Arbeit 14
3. Materialien und Methoden **16**
3.1 Materialien 16
3.1.1 Patientenmaterial 16
3.1.2 Eukaryotische Zelllinie 16
3.1.3 Bakterienstämme 17
3.1.4 Nähr- und Kulturmedien 17
3.1.4.1 Kulturmedien für eukaryotische Zellen 17
3.1.4.2 Flüssig- und Festmedien für Bakterienkulturen 18
3.1.5 Chemikalien und Reagenzien 18
3.1.6 Puffer und Lösungen 21
3.1.7 Experimentelle Kits 23
3.1.8 Fluoreszenzfarbstoffe 24
3.1.9 Antikörper 25
3.1.10 Synthetische miRNA-Oligonukleotide 25
3.1.11 Geräte und Hilfsmittel 26
3.1.12 Verbrauchsmaterialien 29
3.1.13 Sonstiges 32
3.1.14 Software und Datenbanken 32
3.2 Methoden 34
3.2.1 Zell- und mikrobiologische Methoden 34

3.2.1.1 Kultivierung von Bakterien 34
3.2.1.1.1 Anzucht der Bakterien in flüssigen und auf festen Kulturmedien 34
3.2.1.1.2 Messung des Bakterienwachstums 35
3.2.1.1.3 Isolation von BEVs aus bakteriellen Kulturüberständen 35
3.2.1.1.4 Behandlung von Bakterien mit eukaryotische EVs oder humanen miRNAs zur Analyse des Wachstums 36
3.2.1.1.5 Behandlung von Bakterien mit humanen miRNAs zur Analyse der Viabilität 37
3.2.1.2 Kultivierung von eukaryotischen Zellen 39
3.2.1.2.1 Subkultivierung von eukaryotischen Zellen 39
3.2.1.2.2 Bestimmung von eukaryotischen Zellzahlen 39
3.2.1.2.3 Isolation von EVs aus eukaryotischen Zellkulturüberständen 40
3.2.1.2.4 Behandlung von eukaryotischen Zellen mit BEVs zur Analyse des Transkriptoms 41
3.2.1.2.5 Chemische Transfektion von eukaryotischen Zellen mit BEV-RNA zur Analyse des Transkriptoms 42
3.2.1.2.6 Viabilitäts- und Zytotoxizitätsassay 43
3.2.2 Proteinbiochemische Methoden 45
3.2.2.1 Größenausschlusschromatographie 45
3.2.2.2 Isolation von Proteinen aus eukaryotischen Zellen 46
3.2.2.3 Bestimmung von Proteinkonzentrationen 46
3.2.2.4 *Sodium Dodecyl Sulfate*-Polyacrylamidgelelektrophorese 47
3.2.2.5 Western Blot 48
3.2.2.6 Bestimmung der Endotoxinkonzentration 49
3.2.3 Bildgebende Methoden 50
3.2.3.1 Bestimmung von Partikelgröße und -konzentration 50
3.2.3.2 Kryo-Transmissionselektronenmikroskopie 51
3.2.3.3 Rasterelektronenmikroskopie 51
3.2.3.4 Visualisierung der Internalisierung von BEVs in eukaryotische Zellen 52
3.2.3.4.1 Durchflusszytometrie von eukaryotischen Zellen 53
3.2.3.4.2 Konfokale Laser-Scanning Mikroskopie von eukaryotischen Zellen 53
3.2.3.5 Visualisierung der Internalisierung von eukaryotischen EVs und humanen miRNAs in Bakterien 54
3.2.3.5.1 Durchflusszytometrie und Konfokale Laser-Scanning Mikroskopie von Bakterien 55
3.2.4 Molekularbiologische Methoden 57
3.2.4.1 Isolation von DNA aus Stuhl 57

3.2.4.2 Isolation von RNA aus eukaryotischen Zellen 57
3.2.4.3 Isolation von RNA aus bakteriellen und eukaryotischen EVs 58
3.2.4.4 Ethanolfällung von Nukleinsäuren 59
3.2.4.5 Bestimmung der Nukleinsäure-Konzentration 59
3.2.4.5 Analyse von Nukleinsäure-Fragmenten 60
3.2.4.5.1 Agarosegelelektrophorese 60
3.2.4.5.2 Analyse von Nukleinsäuren mittels Agilent 2100 Bioanalyzer 61
3.2.4.6 Sequenzierung von Nukleinsäuren 62
3.2.4.6.1 Sequenzierung des Metagenom 62
3.2.4.6.2 Sequenzierung des Transkriptoms 63
3.2.4.6.3 Sequenzierung des miRNoms 64
3.2.5 Datenverarbeitung und -auswertung 65
3.2.5.1 Auswertung der Metagenom-Sequenzierung 65
3.2.5.2 Auswertung der Transkriptom-Sequenzierung 65
3.2.5.3 Auswertung der miRNom-Sequenzierung 66
4. Ergebnisse 67
Teil I: Analyse der Zusammensetzung des Darmmikrobioms von Parkinson-Patienten 69
4.1 Analyse der Alpha- und Beta-Diversität 69
4.2 Zusammensetzung des Darmmikrobioms auf verschiedenen taxonomischen Ebenen 71
Teil II: Einfluss von BEVs und BEV-RNA auf die Genexpression in eukaryotischen Zellen 75
4.3 Wachstumsverhalten von *L. casei*, *E. faecalis* und *P. mirabilis* 75
4.4 Charakterisierung von BEVs 77
4.5 Internalisierung von BEVs in Caco-2 Zellen 82
4.6 Einfluss von BEVs auf die Viabilität von Caco-2 Zellen 91
4.7 Quantitative und qualitative Analyse von RNA aus BEVs 93
4.8 Einfluss der Transfektion von BEV-RNA auf die Viabilität von Caco-2 Zellen 95
4.9 Quantifizierung der Endotoxinkonzentration in BEVs und BEV-RNA sowie dessen Einfluss auf die Viabilität von Caco-2 Zellen 98
4.10 Analyse des Transkriptoms von Caco-2 Zellen nach Inkubation mit BEVs oder Transfektion mit BEV-RNA 100
4.10.1 Auswahl der Bedingungen 100
4.10.2 Veränderung der Genexpression durch *L. casei* MVs und MV-RNA 102
4.10.3 Veränderung der Genexpression durch *E. faecalis* MVs und MV-RNA 107
4.10.4 Veränderung der Genexpression durch *P. mirabilis* OMV und OMV-RNA 110
4.10.4.1 Vergleich der Veränderungen mit *P. mirabilis* LPS 114

Teil III: Interaktion von Bakterien mit eukaryotischen EVs und humanen EV-miRNAs 126
4.11 Charakterisierung von eukaryotischen EVs 126
4.12 Internalisierung von Caco-2 EVs in Bakterien 131
4.13 Einfluss von Caco-2 EVs auf das Wachstum von unterschiedlichen Bakterien 135
4.14 Identifizierung von miRNAs in eukaryotischen EVs 138
4.14.1 Qualitative Analyse von EV-RNAs 139
4.14.2 Hierarchisches Clustering von EV-miRNAs 140
4.14.3 Detektion von differentiell exprimierten und abundanten EV-miRNAs 141
4.15 Internalisierung von miR-192-5p in Bakterien 147
4.16 Einfluss von miR-192-5p auf das Wachstum und die Viabilität von Bakterien 152
4.17 Einfluss von in Liposomen verpackter miR-192-5p auf die Viabilität von Bakterien. 155
4.18 Internalisierung von in Liposomen verpackter miR-192-5p in Bakterien 156
5. Diskussion 165
5.1 Veränderte Zusammensetzung des Darmmikrobioms von Patienten mit M. Parkinson 165
5.1.1 Kriterien für die Auswahl von *L. casei*, *E. faecalis* und *P. mirabilis* 167
5.2 *L. casei*, *E. faecalis* und *P. mirabilis* sezernieren BEVs 169
5.3 Zeit- und konzentrationsabhängige Internalisierung von BEVs in Caco-2 Zellen 170
5.4 BEVs beherbergen unterschiedliche RNA-Spezies 173
5.5 BEVs und BEV-RNA haben keinen negativen Effekt auf die Viabilität von Caco-2 Zellen 175
5.6 BEVs und BEV-RNA führen zu Veränderungen der Genexpression in Caco-2 Zellen 176
5.6.1 Veränderungen der Expression inflammationsassoziierter Gene 177
5.6.2 Veränderungen der Expression von Genen der intestinalen Barriere 181
5.6.3 Veränderungen in der Genexpression durch *P. mirabilis* OMVs sind unabhängig von den Effekten des LPS 184
5.7 Präsenz von EVs in konditioniertem und unkonditioniertem Zellkulturmedium 185
5.8 EVs aus konditioniertem und unkonditioniertem Zellkulturmedium weisen unterschiedliche miRNA-Expressionsprofile auf 186
5.9 Bakterien zeigen unterschiedliche Fähigkeit zur Aufnahme von humanen EV-miRNAs 188
5.10 Steigerung der Aufnahme von humanen EV-miRNAs in Bakterien durch die Verpackung in artifizielle Liposomen 190
5.11 Ausblick und Fazit 192
Literaturverzeichnis 194
Anhang 227

Publikationen **256**
Danksagung **259**
Lebenslauf **261**

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung der bidirektionalen Kommunikation zwischen Bakterien und humanen Zellen über EVs. 14
Abbildung 2: Mikroskopische Aufnahme von Caco-2 Zellen. 16
Abbildung 3: Schematischer Darstellung des Aufbaus eines NTA Systems. 50
Abbildung 4: Schematische Übersicht zur experimentellen Vorgehensweise. 68
Abbildung 5: Analyse der Alpha-Diversität. 70
Abbildung 6: Analyse der Beta-Diversität. 71
Abbildung 7: Zusammensetzung des Darmmikrobioms auf taxonomischer Ebene der Ordnung. 72
Abbildung 8: Zusammensetzung des Darmmikrobioms auf taxonomischer Ebene der Familie. 73
Abbildung 9: Taxonomischer Baum zur Visualisierung der Unterschiede im Darmmikrobiom von Parkinson-Patienten und gesunden Kontrollprobanden. 74
Abbildung 10: Wachstumsverhalten und rasterelektronenmikroskopische Aufnahme der Bakterien. 76
Abbildung 11: Chromatogramme und Proteinkonzentrationen von aufgereinigten BEVs. 78
Abbildung 12: Größenverteilung und Kryo-TEM Aufnahmen von BEVs. 79
Abbildung 13: Chromatogramme, Konzentrationen und Größe von BEVs und ihrem korrespondierenden unkonditionierten Medium. 81
Abbildung 14: Durchflusszytometrische Analyse der Aufnahme von Fluoreszenz-gelabelten BEVs in Caco-2 Zellen. 83
Abbildung 15: Durchflusszytometrische Analyse der Aufnahme von unterschiedlichen Konzentrationen Fluoreszenz-gelabelter BEVs in Caco-2 Zellen. 85
Abbildung 16: Visualisierung der Internalisierung von *L. casei* MVs in Caco-2 Zellen. 87
Abbildung 17: Visualisierung der Internalisierung von *E. faecalis* MVs in Caco-2 Zellen. 88
Abbildung 18: Visualisierung der Internalisierung von *P. mirabilis* OMVs in Caco-2 Zellen. 89
Abbildung 19: Negativkontrolle zum Nachweis der Spezifität der Internalisierungssignale durch Behandlung der Caco-2 Zellen mit PBS. 90
Abbildung 20: Zellviabilität und Zytotoxizität nach Inkubation von Caco-2 Zellen mit BEVs. 92
Abbildung 21: Quantitative Analyse der BEV-RNA. 93
Abbildung 22: Auswertung eines Agilent RNA 6000 Pico Chips für BEV-RNA. 94
Abbildung 23: Zellviabilität und Zytotoxizität nach Transfektion von Caco-2 Zellen mit BEV-RNA. 96
Abbildung 24: Zellviabilität und Zytotoxizität nach Transfektion von Caco-2 Zellen mit AllStars Negative Control siRNA. 97

Abbildung 25: Chromogene Messung der Endotoxinkonzentration. 98
Abbildung 26: Zellviabilität und Zytotoxizität nach Inkubation oder Transfektion von Caco-2 Zellen mit *P. mirabilis* LPS. 99
Abbildung 27: Differentiell exprimierte Gene nach Inkubation der Caco-2 Zellen mit *L. casei* MVs oder Transfektion von *L. casei* MV-RNA. 102
Abbildung 28: Anreicherungsanalyse von differentiell exprimierten Genen nach Inkubation der Caco-2 Zellen mit *L. casei* MVs oder Transfektion mit *L. casei* MV-RNA für 10 h. 103
Abbildung 29: Anreicherungsanalyse von differentiell exprimierten Genen nach Inkubation der Caco-2 Zellen mit *L. casei* MVs oder Transfektion mit *L. casei* MV-RNA für 24 h. 105
Abbildung 30: Anreicherungsanalyse von differentiell exprimierten Genen nach Inkubation der Caco-2 Zellen mit *L. casei* MVs oder Transfektion mit *L. casei* MV-RNA für 48 h. 106
Abbildung 31: Differentiell exprimierte Gene nach Inkubation der Caco-2 Zellen mit *E. faecalis* MVs oder Transfektion von *E. faecalis* MV-RNA. 107
Abbildung 32: Anreicherungsanalyse von differentiell exprimierten Genen nach Inkubation der Caco-2 Zellen mit *E. faecalis* MVs oder Transfektion mit *E. faecalis* MV-RNA für 10 h. 108
Abbildung 33: Anreicherungsanalyse von differentiell exprimierten Genen nach Inkubation der Caco-2 Zellen mit *E. faecalis* MVs oder Transfektion mit *E. faecalis* MV-RNA für 24 h. 109
Abbildung 34: Differentiell exprimierte Gene nach Inkubation der Caco-2 Zellen mit *P. mirabilis* OMVs oder Transfektion von *P. mirabilis* OMV-RNA. 111
Abbildung 35: Anreicherungsanalyse von differentiell exprimierten Genen nach Inkubation der Caco-2 Zellen mit *P. mirabilis* OMVs oder Transfektion mit *P. mirabilis* OMV-RNA für 10 h. 112
Abbildung 36: Anreicherungsanalyse von differentiell exprimierten Genen nach Inkubation der Caco-2 Zellen mit *P. mirabilis* OMVs oder Transfektion mit *P. mirabilis* OMV-RNA für 24 h. 113
Abbildung 37: Differentiell exprimierte Gene nach Inkubation oder Transfektion der Caco-2 Zellen mit *P. mirabilis* LPS. 115
Abbildung 38: Anreicherungsanalyse von differentiell exprimierten Genen nach Inkubation oder Transfektion der Caco-2 Zellen mit *P. mirabilis* LPS für 10 h. 116
Abbildung 39: Anreicherungsanalyse von differentiell exprimierten Genen nach Inkubation oder Transfektion der Caco-2 Zellen mit *P. mirabilis* LPS für 24 h. 117
Abbildung 40: Differentiell exprimierte Gene nach Inkubation der Caco-2 Zellen mit *P. mirabilis* OMVs oder Transfektion mit *P. mirabilis* OMV-RNA verglichen mit *P. mirabilis* LPS. . 118

Abbildung 41: Anreicherungsanalyse von differentiell exprimierten Genen nach Inkubation der Caco-2 Zellen mit *P. mirabilis* OMVs oder Transfektion mit *P. mirabilis* OMV-RNA im Vergleich zu *P. mirabilis* LPS für 10 h. 119
Abbildung 42: Anreicherungsanalyse von differentiell exprimierten Genen nach Inkubation der Caco-2 Zellen mit *P. mirabilis* OMVs oder Transfektion mit *P. mirabilis* OMV-RNA im Vergleich zu *P. mirabilis* LPS für 24 h. 123
Abbildung 43: Chromatogramme und Proteinkonzentrationen von aufgereinigten EVs. 127
Abbildung 44: Größenverteilung und Kryo-TEM Aufnahmen von EVs. 128
Abbildung 45: Chromatogramme, Konzentrationen und Größe von EV. 129
Abbildung 46: Detektion von Proteinen in Caco-2 Zellextrakt und aufgereinigten EVs. 130
Abbildung 47: Visualisierung der Interaktion von *L. casei* mit Caco-2 (-FCS) EVs. 131
Abbildung 48: Visualisierung der Interaktion von *E. faecalis* mit Caco-2 (-FCS) EVs. 133
Abbildung 49: Visualisierung der Interaktion von *P. mirabilis* mit Caco-2 (-FCS) EVs. 134
Abbildung 50: Wachstum von Bakterien in Anwesenheit von Caco-2 (-FCS) EVs. 136
Abbildung 51: Wachstum von *E. faecalis* in Anwesenheit von EVs aus unterschiedlichen Konditionen. 137
Abbildung 52: Auswertung eines Agilent RNA 6000 Pico Chips für EV-RNA. 139
Abbildung 53: Hierarchisches Clustering von miRNAs. 141
Abbildung 54: Differentielle Expression von miRNAs in EVs aus konditioniertem und unkonditioniertem Medium. 142
Abbildung 55: Expressionsunterschied (rpmmm-Differenz) von miRNAs in EVs aus konditioniertem und unkonditioniertem Medium. 144
Abbildung 56: Durchflusszytometrische Analyse der Aufnahme von Fluoreszenz-gelabelter synthetischer miRNA durch verschiedene Bakterien. 148
Abbildung 57: Visualisierung der Interaktion von *L. casei* mit miR-192-5p. 149
Abbildung 58: Visualisierung der Interaktion von *E. faecalis* mit miR-192-5p. 150
Abbildung 59:Visualisierung der Interaktion von *P. mirabilis* mit miR-192-5p. 151
Abbildung 60: Wachstum von Bakterien in Anwesenheit von miR-192-5p. 153
Abbildung 61: Viabilität von Bakterien in Anwesenheit von miR-192-5p. 154
Abbildung 62: Viabilität von Bakterien in Anwesenheit von in Liposomen verpackter miR-192-5p. 155
Abbildung 63: Durchflusszytometrische Analyse der Aufnahme von in Liposomen verpackter Fluoreszenz-gelabelter synthetischer miRNA durch verschiedene Bakterien. 157
Abbildung 64: Visualisierung der Interaktion von *L. casei* mit in Liposomen verpackter miR-192-5p. 158
Abbildung 65: Visualisierung der Interaktion von *E. faecalis* mit in Liposomen verpackter miR-192-5p. 160

Abbildung 66: Visualisierung der Interaktion von *P. mirabilis* mit in Liposomen verpackter miR-192-5p. 161
Abbildung 67: Durchflusszytometrische Analyse der Aufnahme von Fluoreszenz-gelabelter miRNA durch verschiedene Bakterien in Abhängigkeit von den Behandlungsbedingungen. 163
Abbildung 68: Visualisierung der Interaktion von verschiedenen Bakterien mit miR-192-5p in DMEM. 164

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verwendete synthetische miRNA-Oligonukleotide. 25
Tabelle 2: Detailangaben zu den verschiedenen Bedingungen während der Isolation der BEVs aus den Kulturüberständen von *L. casei*, *E. faecalis* und *P. mirabilis*. 36
Tabelle 3: Behandlungsbedingungen der Caco-2 Zellen mit BEVs. 41
Tabelle 4: Transfektionsbedingungen von Caco-2 Zellen mit BEV-RNA. 42
Tabelle 5: Patientenkollektiv für die Analyse der Zusammensetzung des Darmmikrobioms. 69
Tabelle 6: Bedingungen für die Behandlung der Caco-2 Zellen. 100
Tabelle 7: Differentielle Expression von ausgewählten Genen nach Inkubation mit *P. mirabilis* OMVs oder *P. mirabilis* LPS für 10 h. 121
Tabelle 8: Differentielle Expression von ausgewählten Genen nach Transfektion mit *P. mirabilis* OMV-RNA oder *P. mirabilis* LPS für 10 h. 122
Tabelle 9: Differentielle Expression von ausgewählten Genen nach Inkubation mit *P. mirabilis* OMVs oder *P. mirabilis* LPS für 24 h. 124
Tabelle 10: Differentielle Expression von ausgewählten Genen nach Transfektion mit *P. mirabilis* OMV-RNA oder *P. mirabilis* LPS für 24 h. 125
Tabelle 11: Expression (rpmmm) ausgewählter miRNAs in EVs aus konditioniertem Medium. 143
Tabelle 12: Expression (rpmmm) und Expressionsunterschied (rpmmm-Differenz) ausgewählter, in EVs aus konditioniertem Medium hoch exprimierter miRNAs. 145
Tabelle 13: Expression (rpmmm) und Expressionsunterschied (rpmmm-Differenz) ausgewählter, in EVs aus unkonditioniertem Medium hoch exprimierter miRNAs. 146
Tabelle 14: Differentielle Expression ausgewählter Gene nach Inkubation oder Transfektion von Caco-2 Zellen mit *L. casei* MVs oder *L. casei* MV-RNA. 227
Tabelle 15: Biologische Prozesse mit signifikanter Anreicherung von differentiell exprimierten Genen nach Inkubation von Caco-2 Zellen mit *L. casei* MVs für 24 h. 228
Tabelle 16: Biologische Prozesse mit signifikanter Anreicherung von differentiell exprimierten Genen nach Inkubation von Caco-2 Zellen mit *L. casei* MVs für 48 h. 230
Tabelle 17: Biologische Prozesse mit signifikanter Anreicherung von differentiell exprimierten Genen nach Transfektion von Caco-2 Zellen mit *E. faecalis* MV-RNA für 10 h. 231
Tabelle 18: Differentielle Expression ausgewählter Gene nach Inkubation oder Transfektion von Caco-2 Zellen mit *E. faecalis* MVs oder *E. faecalis* MV-RNA. 236
Tabelle 19: Biologische Prozesse mit signifikanter Anreicherung von differentiell exprimierten Genen nach Inkubation von Caco-2 Zellen mit *P. mirabilis* OMVs für 10 h. 236
Tabelle 20: Differentielle Expression ausgewählter Gene nach Inkubation oder Transfektion von Caco-2 Zellen mit *P. mirabilis* OMVs oder *P. mirabilis* OMV-RNA. 237

Tabelle 21: Biologische Prozesse mit signifikanter Anreicherung von differentiell exprimierten Genen nach Inkubation von Caco-2 Zellen mit *P. mirabilis* OMVs für 24 h. 238
Tabelle 22: Biologische Prozesse mit signifikanter Anreicherung von differentiell exprimierten Genen nach Transfektion von Caco-2 Zellen mit *P. mirabilis* OMV-RNA für 24 h. 239
Tabelle 23: Biologische Prozesse mit signifikanter Anreicherung von differentiell exprimierten Genen nach Transfektion von Caco-2 Zellen mit *P. mirabilis* LPS für 10 h. 239
Tabelle 24: Differentielle Expression ausgewählter Gene nach Inkubation oder Transfektion von Caco-2 Zellen mit *P. mirabilis* LPS. 240
Tabelle 25: Biologische Prozesse mit signifikanter Anreicherung von differentiell exprimierten Genen nach Inkubation von Caco-2 Zellen mit *P. mirabilis* LPS für 24 h. 241
Tabelle 26: Biologische Prozesse mit signifikanter Anreicherung von differentiell exprimierten Genen nach Transfektion von Caco-2 Zellen mit *P. mirabilis* LPS für 24 h. 243
Tabelle 27: Biologische Prozesse mit signifikanter Anreicherung von differentiell exprimierten Genen nach Inkubation von Caco-2 Zellen mit *P. mirabilis* OMVs im Vergleich zu *P. mirabilis* LPS für 10 h. 244
Tabelle 28: Differentielle Expression ausgewählter Gene nach Inkubation oder Transfektion von Caco-2 Zellen mit P. mirabilis OMVs oder *P. mirabilis* OMV-RNA im Vergleich zu *P. mirabilis* LPS. 246
Tabelle 29: Biologische Prozesse mit signifikanter Anreicherung von differentiell exprimierten Genen nach Inkubation von Caco-2 Zellen mit *P. mirabilis* OMVs im Vergleich zu *P. mirabilis* LPS für 24 h. 247
Tabelle 30: Biologische Prozesse mit signifikanter Anreicherung von differentiell exprimierten Genen nach Transfektion von Caco-2 Zellen mit *P. mirabilis* OMV-RNA im Vergleich zu *P. mirabilis* LPS für 24 h. 252
Tabelle 31: miRNAs mit erhöhter Expression in EVs aus konditioniertem Medium. 254
Tabelle 32: miRNAs mit verringerter Expression in EVs aus konditioniertem Medium. 255

Abkürzungsverzeichnis

Symbol	Bedeutung
%	Prozent
°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
µM	Mikromolar
6-OHDA	6-Hydroxydopamin
A	Ampere (elektrische Stromstärke)
AB	Apoptotische Körperchen (*Apoptotic bodies*)
Abb.	Abbildung
adj.	Adjustiert
ANC	AllStars *Negative Control* siRNA
ATCC	*American Type Culture Collection*
ATP	Adenosintriphosphat
BCA	Bicinchoninsäure (*Bicinchoninic acid*)
BEV	Bakterielle extrazelluläre Vesikel
BHI	Hirn-Herz-Infusion (*Brain heart infusion*)
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
Caco-2	Cancer-coli 2 (Zelllinie)
CCL (z. B. CCL2)	C-C Ligand (*C-C motif chemokine ligand*)
CCR (z. B. CCR5)	C-C Chemokin Rezeptor (*C-C motif chemokine receptor*)
CD (z. B. CD81)	*Cluster of Differentiation*
CFU	Kolonie-bildende Einheit (*Colony forming unit*)
CL	*Cross-linked*
CLDN (z. B. CLDN1)	Claudin
CLSM	Konfokales Laserscanmikroskop (*Confocal laser scanning microscope*)
cm²	Quadratzentrimeter
CMV	Zytoplasmatische Membranvesikel (*Cytoplasmatic membrane vesicle*)

CO_2	Kohlenstoffdioxid
CSF (z. B. CSF1)	Koloniestimulierender Faktor (*Colony stimulating factor*)
Cu^{1+}	einwertige Kupferionen
Cu^{2+}	zweiwertige Kupferionen
$CuSO_4$	Kupfersulfat (*Copper sulfate*)
CXCL (z. B. CXCL8)	C-X-C Ligand (*C-X-C motif chemokine ligand*)
Cy3	Cyanin3
DAPI	4′,6-Diamidin-2-phenylindol
DiI	1,1'-Dioctadecyl-3,3,3',3'-Tetramethylindocarbocyaninperchlorat
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure (*Desoxyribonucleic acid*)
DNB	DNA Nanoball
dsDNA	doppelsträngige Desoxyribonukleinsäure (*Double stranded desoxyribonucleic acid*)
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
dsRNA	doppelsträngige Ribonukleinsäure (*Double stranded ribonucleic acid*)
E. coli	*Escherichia coli*
E. faecalis	*Entercoccus faecalis*
ECL	*Enhanced chemiluminescence*
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	*Enzyme-linked Immunosorbent Assay*
Em	Emission
et al.	und andere (et alii)
EU	Endotoxin Einheit (*Endotoxin unit*)
EV	Extrazelluläre Vesikel
Ex	Anregung (*Excitation*)
FC	*Fold Change*
FCS	Fötales Kälberserum (*Fetal calf serum*)
FDR	Falscherkennungsrate *(False discovery rate)*
g	g-Kraft (g = 9,80665 m/s²)
g (Gewicht)	Gramm
GO	*Gene Ontology*
GPCR	G-Protein gekoppelten Rezeptoren *(G-protein-coupled receptor*)
GSA	*Genome Sequence Archive*
h	Stunde (*Hour*)

HCl	Chlorwassersoff
HIPS	Helmholtz-Institut für Pharmazeutische Forschung Saarland
HMDS	Hexamethyldisilazan
hsa	homo sapiens
IFN (z. B. IFN-γ)	Interferon
IL (z. B. IL4)	Interleukin
ILV	Intraluminäre Vesikel (*Intra luminal vesicle*)
INM	Leibniz-Institut für Neue Materialien
ISEV	*International Society for Extracellular Vesicles*
ITS	Insulin-Transferrin-Selenium
ITS-X	Insulin-Transferrin-Selenium-Ethanolamin
JAM	*Junctional adhesion molecule*
KCl	Kaliumchlorid
kV	Kilovolt
l	Liter
L. casei	*Lacticaseibacillus casei/Lactobacillus casei*
LAL	Limulus-Amöbozyten-Lysat
LDH	Lactatdehydrogenase
L-Dopa	Levodopa
lncRNA	Lange nicht-kodierende Ribonukleinsäure (*Long non-coding ribonucleic acid*)
Log10	Dekadischer Logarithmus (Zehnerlogarithmus)
Log2	Binärer Logarithmus (Zweiterlogarithmus)
LPS	Lipopolysaccharid
LTA	Lipoteichonsäure (*Lipoteichoic acid*)
M	Molar
MAGI	*Membrane-associated guanylate kinase inverted*
MAMP	Mikroben-assoziierten molekularen Mustern (*Microbe-associated molecular pattern*)
MD-2	*Myeloid differentiation factor-2*
mg	Milligramm
$MgCl_2$	Magnesiumchlorid
min	Minute
miRNA/miR	mikroRNA (*microRNA*)
MISEV	*Minimal information for studies of extracellular vesicles*
MJFF	Michael J. Fox Foundation for Parkinson’s Research

ml	Milliliter
mM	Millimolar
mRNA	Boten-RNA (*Messanger RNA*)
MRS	deMan-Rogosa-Sharpe
msRNA	*microRNA-size small ribonucleic acid*
MV	Membranvesikel
MVB	Multivesikuläre Körperchen (*Multivesicular bodies*)
MyD88	*Myeloid differentiation primary response 88*
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
NCBI	*National Center for Biotechnology*
NEAA	Nicht-essentielle Aminosäure (*Non-essential amino acid*)
ng	Nanogramm
NGS	*Next generation sequencing*
nm	Nanometer
nM	Nanomolar
nt	Nukleotide
NTA	*Nanoparticle tracking analysis*
OD	Optische Dichte
OIMV	Außen-Innenmembranvesikel (*Outer-inner membrane vesicle*)
OMV	Außenmembranvesikel (*Outer membrane vesicle*)
ORA	Anreicherungsanalyse (*Over-representation analysis*)
ORF	Offener Leserahmen (*Open reading frame*)
OTU	Operative taxonomische Einheit (*operative taxonomic unit*)
p	p-Wert (Signifikanzwert)
P. mirabilis	*Proteus mirabilis*
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PAMP	Pathogen-assoziierte molekulare Muster (*Pathogen-associated molecular pattern*)
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung (*Phosphate buffered saline*)
PCoA	Hauptkoordinatenanalyse (*principle coordinate analysis*)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (*Polymerase chain reaction*)
PD	Morbus Parkinson (*Parkinson's Disease*)
PE	Phycoerythrin
PE (Sequenzierung)	von zwei Enden (*Paired-End*)
pH	Potential des Wasserstoffs (Pondus hydrogenii/potentia hydrogenii)

PI	Propidiumiodid
pmol	Pikomol
pNA	p-Nitroanilin
Poly(A)	Polyadenylsäure (*Polyadenylic acid*)
PRR	„Mustererkennungsrezeptor“ (*Pattern recognition receptor*)
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RCA	*Rolling circle amplification*
REM/SEM	Rasterelektronenmikroskop (*Scanning electron microscope*)
RISC	*RNA-induced silencing complex*
RNA	Ribonukleinsäure (*Ribonucleic acid*)
rpm	Umdrehungen pro Minute (*Revolutions per minute*)
rpmmm	*Reads per mapped million miRNAs*
rRNA	Ribosomale RNA
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
SCFA	Kurzkettige Fettsäuren (*Short chain fatty acids*)
SDS	Natriumdodecylsulfat (*Sodium dodecyl sulfate*)
SE (Sequenzierung)	von einem Ende (*Single-end*)
SEC	Größenausschluss-Chromatographie (*Size exclusion chromatography*)
siRNA	Kleine eingreifende Ribonukleinsäure (*Small interfering ribonucleic acid*)
sncRNA	Kleine nicht-kodierende Ribonukleinsäure (*Small noncoding ribonucleic acid*)
SNpc	Substantia nigra pars compacta
sRNA	Kleine Ribonukleinsäure (*Small ribonucleic acid*)
ssDNA	einzelsträngige Desoxyribonukleinsäure (*Single stranded desoxyribonucleic acid*)
T4P	Typ 4 Pili
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-Ethylendiamintetraacetat
TAMP	*Tight junction-associated MARVEL protein*
TBE	Tris-Borat-Ethylendiamintetraacetat
TBS	Tris-gepufferte Kochsalzlösung (*Tris buffered saline*)
TBST	Tris-gepufferte Kochsalzlösung mit Tween® 20 (*Tris buffered saline with Tween® 20*)

TE	Tris-Ethylendiamintetraacetat
TEM	Transmissionselektronenmikroskop (T*ransmission electron microscope*)
TJ	*Tight junction*
TLR (z. B TLR2)	Toll-like Rezeptor (*Toll-like receptor*)
TNE	Tris-Natriumchlorid-EDTA
TNF (z. B. TNF-α)	Tumornekrosefaktor (*Tumor necrosis factor*)
tRNA	Transfer Ribonukleinsäure (*Transfer ribonucleic acid*)
u. a.	unter anderem
USA	Vereinigte Staaten von America (*United States of America*)
UTR	Untranslatierte Region (*Untranslated region*)
V	Volt
v/v	Volumenprozent (*Volume per volume*)
w/v	Massenprozent (*Weight per volume*)
WGS	Ganzgenomsequenzierung (*Whole genome sequencing*)
z. B.	zum Beispiel
α	Alpha
β	Beta
λ	Lambda

1. Zusammenfassung

Extrazelluläre Vesikel sind kleine Lipid-Membranpartikel, die von Pro- und Eukaryoten in den extrazellulären Raum sezerniert werden und eine Reihe von verschiedenen Molekülen wie Proteine, Lipide aber auch Nukleinsäuren wie etwa RNA transportieren können (Yáñez-Mó et al., 2015). In den vergangenen Jahren konnte gezeigt werden, dass extrazelluläre Vesikel eine wichtige Funktion bei der *Cross-Kingdom* Kommunikation zwischen Bakterien und humanen Zellen ausüben. Insbesondere hat dabei die Rolle der mit den extrazellulären Vesikeln assoziierten RNAs sowie der Zusammenhang mit der Entstehung und Progression von verschiedenen Erkrankungen immer weiter an Interesse gewonnen (Amatya et al., 2021; Iyaswamy et al., 2023; Munhoz da Rocha et al., 2020; Q. Shen et al., 2022).

Morbus Parkinson ist eine der häufigsten neurodegenerative Erkrankung der Welt (Poewe et al., 2017). Zahlreiche Studien haben gezeigt, dass bei Parkinson-Patienten Veränderungen in der Zusammensetzung des Darmmikrobioms auftreten (Hill-Burns et al., 2017; Hopfner et al., 2017; A. Lin et al., 2018). Kürzlich konnte zudem nachgewiesen werden, dass diese Veränderungen im Zusammenhang mit bei Parkinson-Patienten häufig auftretenden Obstipationen stehen (Fu et al., 2022), welche zum Teil Jahre vor der Diagnose der Erkrankung in Erscheinung treten können (Adams-Carr et al., 2016; Noyce et al., 2012; Svensson et al., 2016). In den vergangenen Jahren wurde daher vermehrt der Gastrointestinaltrakt als Ursprung von M. Parkinson diskutiert (Breen et al., 2019; Houser & Tansey, 2017; Lionnet et al., 2018). Voraussetzung für den Einfluss des Darmmikrobioms auf die Pathogenese von *Morbus* Parkinson ist jedoch eine wechselseitige Kommunikation den Bakterien auf der einen und den Darmepithelzellen auf der anderen Seite.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit bestand somit darin die Kommunikation von Bakterien, bei denen eine Verbindung zu *Morbus* Parkinson besteht, und humanen intestinalen Epithelzellen über extrazelluläre Vesikel zu untersuchen. Zu diesem Zweck wurde zunächst die Zusammensetzung des Darmmikrobioms von Parkinson-Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollprobanden untersucht, um Bakterienfamilien und -spezies mit veränderter Häufigkeit zu identifizieren. Im Folgenden wurden die Bakterien *Lacticaseibacillus casei*, *Enterococcus faecalis* und *Proteus mirabilis* exemplarisch ausgewählt und deren extrazelluläre Vesikel näher charakterisiert. Dabei zeigte sich, dass alle untersuchten Bakterien in unterschiedlichem Maße extrazelluläre Vesikel sezernieren und diese sowohl zeit- als auch konzentrationsabhängig von humanen Darmepithelzellen aufgenommen werden, wobei die extrazellulären Vesikel von *Enterococcus faecalis* und *Proteus mirabilis* deutlich schneller internalisiert wurden als die von *Lacticaseibacillus casei.* Darüber hinaus wurde gezeigt, dass alle bakteriellen extrazellulären Vesikel unterschiedliche RNA-Fragmente transportieren, wobei der größte Anteil kleine RNAs mit einer Länge unter 200 Nukleotiden waren. Die Analyse des Transkriptoms der

Darmepithelzellen zeigte, dass sowohl die bakteriellen extrazellulären Vesikel als auch die damit assoziierte RNA selbst zu spezifischen Veränderungen in der Genexpression unter anderem von Zytokinen und Chemokinen führen kann. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass die durch die extrazellulären Vesikel von *Proteus mirabilis* hervorgerufenen Effekte nicht alleine durch die in den extrazellulären Vesikeln enthaltenen Lipopolysaccharide erklärt werden konnten.

Um die Kommunikation der humanen Zellen mit Bakterien näher analysieren zu können, wurden die bereits untersuchten Bakterienspezies mit extrazellulären Vesikeln, welche von Darmepithelzellen sezerniert wurden, inkubiert. Dabei zeigte sich, dass vor allem *Enterococcus faecalis* dazu in der Lage war, eukaryotische extrazelluläre Vesikel zu internalisieren, wodurch das Wachstum der Bakterien beeinflusst werden konnte. Mit Hilfe einer smallRNA-Sequenzierung konnten anschließend microRNAs, unter anderem die miR-192-5p, identifiziert werden, die in extrazellulären Vesikel von Darmepithelzellen sezerniert wurden. Weitere Analysen haben gezeigt, dass *Proteus mirabilis* im Gegensatz zu den anderen beiden Bakterien dazu in der Lage war, die humane miR-192-5p zu internalisieren. Durch die Verpackung der miRNA in artifizielle Liposomen konnte die Aufnahme in *Lacticaseibacillus casei* und *Enterococcus faecalis* jedoch deutlich gesteigert werden.

Zusammenfassend konnten die Ergebnisse dieser Arbeit die individuellen Auswirkungen der verschiedenen bakteriellen extrazellulären Vesikel sowie der damit assoziierten RNA bei der Kommunikation mit humanen Darmepithelzellen zeigen. Darüber hinaus liefern die Untersuchungen Einblicke in die Fähigkeit von eukaryotischen Zellen mit Bakterien über humane microRNAs zu kommunizieren. Die gewonnenen Erkenntnisse sollen somit dazu beitragen die bidirektionale Kommunikation zwischen Pro- und Eukaryoten im Rahmen von verschiedenen Erkrankungen besser zu verstehen.

Summary

Bidirectional communication of eukaryotes and prokaryotes via extracellular vesicles

Extracellular vesicles are small membrane particles that can be secreted by prokaryotes and eukaryotes into the extracellular space. Their cargo can include a variety of different molecules such as proteins, lipids, and nucleic acids like RNA (Yáñez-Mó et al., 2015). Recently, it has been demonstrated that extracellular vesicles play a critical role in cross-kingdom communication between bacteria and human cells. In this context, the role of EV-associated RNAs and their connection to the development and progression of various diseases have gained increasing interest (Amatya et al., 2021; Iyaswamy et al., 2023; Munhoz da Rocha et al., 2020; Q. Shen et al., 2022).

Parkinson's disease is one of the most common neurodegenerative diseases in the world (Poewe et al., 2017). Numerous studies have demonstrated changes in the composition of the gut microbiome in Parkinson's patients (Hill-Burns et al., 2017; Hopfner et al., 2017; A. Lin et al., 2018). Recent findings suggest that these alterations are associated with constipation, a common symptom in Parkinson’s patients (Fu et al., 2022), which can manifest years for the diagnosis of the disease (Adams-Carr et al., 2016; Noyce et al., 2012; Svensson et al., 2016). In the past years, the gastrointestinal tract has therefore increasingly been discussed as a potential origin of Parkinson’s disease (Breen et al., 2019; Houser & Tansey, 2017; Lionnet et al., 2018). However, a prerequisite for the influence of the gut microbiome on the pathogenesis of Parkinson's disease is the bidirectional communication between bacteria on one side and intestinal epithelial cells on the other.

Hence, the aim of this thesis was to investigate the communication between bacteria associated with Parkinson's disease and human intestinal epithelial cells via extracellular vesicles. At first, the composition of the gut microbiome in Parkinson’s patients was compared to that of healthy controls to identify bacterial families and species with altered abundances. Subsequently, the bacteria *Lacticaseibacillus casei*, *Enterococcus faecalis*, and *Proteus mirabilis* were selected for further characterization of their extracellular vesicles. It was found that all examined bacteria secrete extracellular vesicles to varying degrees, which were taken up by human intestinal epithelial cells in a time- and concentration-dependent manner. Notably, extracellular vesicles from *Enterococcus faecalis* and *Proteus mirabilis* were internalized significantly faster than those from *Lacticaseibacillus casei*. Furthermore, it was shown that all bacterial extracellular vesicles transport various RNA fragments, with a majority of these RNAs being smallRNAs with a length under 200 nucleotides. Transcriptome analysis of intestinal epithelial cells revealed that both bacterial extracellular vesicles and associated RNA itself can lead to specific changes in the expression of genes, including those encoding

for cytokines and chemokines. Moreover, it was shown that the effects caused by extracellular vesicles from *Proteus mirabilis* were not exclusively caused by lipopolysaccharides contained in these vesicles.

To further analyze the communication between human cells and bacteria, the previously studied bacterial species were incubated with extracellular vesicles secreted from intestinal epithelial cells. It has been observed that especially *Enterococcus faecalis* could internalize eukaryotic extracellular vesicles, which subsequently influenced the bacterial growth. Using smallRNA sequencing, microRNAs including miR-192-5p have been identified, which were secreted in extracellular vesicles from intestinal epithelial cells. Further analyses demonstrated that, unlike the other two bacteria, *Proteus mirabilis* was able to internalize human miR-192-5p. However, packaging of the microRNA into artificial liposomes significantly increased the uptake in *Lacticaseibacillus casei* and *Enterococcus faecalis*.

In summary, the findings of this thesis highlight the individual effects of bacterial extracellular vesicles and their associated RNAs in communication with human intestinal epithelial cells. Furthermore, the results provide insights into the ability of eukaryotic cells to communicate with bacteria via human microRNAs. These findings aim to enhance the understanding of bidirectional communication between prokaryotes and eukaryotes in the context of various diseases.

2. Einleitung

2.1 *Morbus* Parkinson (M. Parkinson)

Die Neurodegeneration beschreibt den fortschreitenden Verlust von Neuronen sowie damit einhergehend ihrer normalen Funktion. Erkrankungen, die sich durch eine Neurodegeneration auszeichnen, werden auch unter dem Begriff neurodegenerative Erkrankungen zusammengefasst (Przedborski et al., 2003). *Morbus* Parkinson (M. Parkinson, *Parkinson's Disease*, PD) ist direkt nach *Morbus* Alzheimer eine der am häufigsten auftretenden neurodegenerativen Erkrankung weltweit (Poewe et al., 2017). Sie wurde erstmals 1817 von dem englischen Arzt James Parkinson beschrieben, der die Erkrankung als *Paralysis agitans* oder auch *Shaking Palsy* (Schüttellähmung) bezeichnete (Parkinson, 1817).
Die genauen Ursachen für M. Parkinson sind noch nicht vollständig bekannt. Dennoch konnten bereits einige Faktoren identifiziert werden, die mit einem erhöhten Erkrankungsrisiko verbunden sind. Einer der Hauptrisikofaktoren ist dabei das Alter. Insgesamt sind heutzutage etwa 0,3 % aller Menschen von M. Parkinson betroffen, wobei die Inzidenz mit zunehmendem Alter auf über 3 % in der Bevölkerung über 80 Jahren ansteigt (Poewe et al., 2017; Pringsheim et al., 2014). Neben dem Alter gehören auch das Geschlecht sowie die Ethnie zu den bekannten Risikofaktoren, die die Erkrankung begünstigen können (Kurtzke & Goldberg, 1988; Van Den Eeden et al., 2003). Die Prävalenz für M. Parkinson ist beispielsweise in Europa verglichen mit afrikanischen und asiatischen Staaten deutlich erhöht (McInerney-Leo et al., 2004; Muangpaisan et al., 2009). Zudem erkranken etwa zweimal mehr Männer als Frauen an M. Parkinson (Baldereschi et al., 2000). Etwa 5 - 15 % aller Erkrankungen treten zudem familiär durch Vererbung von Mutationen in Parkinson-assoziierten Genen, den sogenannten *PARK*-Genen, auf (Balestrino & Schapira, 2020; Gasser, 2005). Vor allem Mutationen in *Parkin* (*PARK2*), *PINK1* (*PARK6*) und *DJ-1* (*PARK7*) scheinen dabei mit besonders frühen Formen von M. Parkinson („*early-onset*-Parkinson"), die bereits vor dem 40. Lebensjahr auftreten, zusammenzuhängen (Gasser, 2005). Darüber hinaus sind auch verschiedene Umweltfaktoren bekannt, die die sporadische Entstehung von M. Parkinson begünstigen können. Zu diesen gehören z. B. der Kontakt mit Pestiziden (Priyadarshi et al., 2000, 2001). Zusätzlich konnte auch nachgewiesen werden, dass die Einnahme von β_2-Adrenozeptor Antagonisten, sogenannten β-Blockern, ebenfalls das Risiko für M. Parkinson steigern kann (Hopfner et al., 2019; Mittal et al., 2017). Im Gegensatz dazu scheinen wiederum andere Umweltfaktoren wie der Konsum von Koffein (Palacios et al., 2012), das Rauchen von Zigaretten (Wang et al., 2022) oder auch die Einnahme von Calciumantagonisten (Gudala et al., 2015) den gegenteiligen Effekt auszuüben.

Pathologisch zeichnet sich M. Parkinson durch die spezifische Degeneration von dopaminergen Neuronen in bestimmten Hirnarealen, vor allem der Substantia nigra pars compacta (SNpc) aus (Damier et al., 1999; Fernley & Lees, 1991). Von der SNpc erstrecken sich dopaminerge Projektionen bis in das Corpus striatum, die gemeinsam das nigrostriatale System bilden und an der Steuerung und dem Erlernen von motorischen Fähigkeiten sowie auch an der Modulation des Schmerzempfindens beteiligt sind (Klein et al., 2019). Infolge des Verlustes der dopaminergen Neuronen kommt es zu einem striatalen Dopaminmangel (Scherman et al., 1989). Ein weiteres charakteristisches Zeichen von M. Parkinson ist die Präsenz von sogenannten Lewy-Körperchen (*Lewy body*). Es handelt sich dabei um intraneuronale, eosinophile Einschlüsse, deren Hauptbestandteile fehlgefaltetes Alpha-Synuclein ist (Balestrino & Schapira, 2020; Spillantini et al., 1997). Die Lewy-Körperchen sind dabei sowohl im zentralen als auch im enterischen Nervensystem, dem sogenannten Darmnervensystem, zu finden (Bethlem & den Hartog Jager, 1960; Greenfield & Bosanquet, 1953; Wakabayashi et al., 1989), weswegen von Braak et al. im Jahr 2003 erste Hypothesen zur Darm-Hirn-Achse und der Beteiligung von Pathogenen im Darm an der Entstehung von M. Parkinson aufgestellt wurden (Braak, Rüb, et al., 2003; Braak, Tredici, et al., 2003). Durch die Akkumulation der Lewy-Körperchen kommt es zur Beeinträchtigung von verschiedenen zellulären Prozessen. Diese betreffen z. B. die Funktion von Mitochondrien, was wiederum zu oxidativem Stress führen kann (Hsu et al., 2000; Mizuno et al., 1998). Darüber hinaus beeinträchtigen die Aggregate auch die proteosomale Funktion (Snyder et al., 2003) und können zur synaptischen Dysfunktion beitragen (Scott et al., 2010). In Folge der spezifischen zellulären Veränderungen kommt es bei Patienten mit M. Parkinson zur Ausprägung von spezifischen Symptomen. Diese lassen sich in motorische und nicht-motorische Symptome unterteilen. Zu den motorischen Symptomen zählen das charakteristische Zittern (Ruhetremor), die Versteifung der Muskulatur (Rigor), eine verlangsamte Bewegung (Bradykinese) sowie die Störung des Gleichgewichts (Posturale Instabilität) (Postuma et al., 2015). Zu den nicht-motorischen Symptomen gehören unter anderem Demenz, Depressionen, Angst- und Schlafstörungen oder auch Verlust des Geruchssinns (Aarsland et al., 2005; Bollu & Sahota, 2017; Brown et al., 2011; Haehner et al., 2009; Hobson & Meara, 2004; Reijnders et al., 2008). Darüber hinaus können bei den Patienten aber auch verschiedene gastrointestinale Veränderung wie Flatulenzen (Blähungen), Nausea (Übelkeit) und vor allem Obstipationen (Verstopfungen) beobachtet werden (Su et al., 2017), wobei letztere bereits viele Jahre vor der Diagnose von M. Parkinson auftreten können (Adams-Carr et al., 2016; Noyce et al., 2012; E. Svensson et al., 2016).

2.2 Das humane Darmmikrobiom

Das Darmmikrobiom beherbergt bis zu 100 Billionen Mikroorganismen aus allen drei Domänen (Bakterien, Archaeen und Eukaryoten) und stellt damit die größte mikrobielle Gemeinschaft im menschlichen Körper dar (Bäckhed et al., 2005; Savage, 1977). Vor allem der Dickdarm (Kolon) ist mit 10^{11} – 10^{12} Zellen/ml der am stärksten besiedelte Bereich im gesamten Gastrointestinaltrakt (Ley et al., 2006; Whitman et al., 1998). Es wird angenommen, dass das Darmmikrobiom eines erwachsenen Menschen aus über 1.000 verschiedenen Bakterienspezies besteht (J. Qin et al., 2010). Zu den am stärksten vertretenen Phyla eines gesunden Darmmikrobioms gehören dabei Bacteroidetes und Firmicutes. Im Gegensatz dazu kommen Actinobacteria, Fusobacteria, Proteobacteria und Verrucomicrobia eher weniger häufig vor (Eckburg et al., 2005). Die genaue Zusammensetzung unterliegt jedoch dynamischen Veränderungen und kann durch verschiedene Faktoren wie etwa der Ernährung, dem Alter oder durch die Einnahme von Medikamenten beeinflusst werden (Anthony et al., 2022; David et al., 2014; Leite et al., 2021; Muegge et al., 2011; Palleja et al., 2018). Darüber hinaus übt das Darmmikrobiom als Teil einer symbiotischen Beziehung mit seinem Wirt eine Reihe von wichtigen Funktionen aus (Jandhyala et al., 2015). Die Mikroorganismen beziehen ihre Nährstoffe aus der vom Wirt aufgenommenen Nahrung. Durch Fermentation sind sie dazu in der Lage aus Kohlenhydraten u. a. kurzkettige Fettsäuren (*Short chain fatty acid*, SCFA), wie Acetat, Butyrat oder Propionat zu synthetisierten, die wiederum als Energiequelle für die Darmepithelzellen dienen können (Macfarlane & Macfarlane, 2003; Roediger, 1982). Darüber hinaus sind die Mikroorganismen auch an der Synthese von verschiedenen Vitaminen beteiligt, die vom Wirt selbst nicht synthetisiert werden können (LeBlanc et al., 2013). Das Darmmikrobiom trägt außerdem zum Aufbau des Immunsystems bei (H.-J. Wu & Wu, 2012). Gleichzeitig muss jedoch dafür gesorgt werden, dass das Immunsystem nützlichen, kommensalen Mikroorganismen gegenüber tolerant ist, aber ein übermäßiges Wachstum von Pathogenen verhindern muss (Jandhyala et al., 2015). Funktioniert dies nicht, kann das zur Dysbiose, also zur Störung der normalen mikrobiellen Besiedlung des Darms, führen (Levy et al., 2017).

2.2.1 Veränderungen im Darmmikrobiom von Patienten mit M. Parkinson

Eine Dysbiose des Darmmikrobioms konnte bereits bei einer Vielzahl von verschiedenen Erkrankungen wie Diabetes, Asthma oder auch *Morbus* Crohn beobachtet werden (Buffet-Bataillon et al., 2022; Dash et al., 2023; Ma et al., 2022; Wang et al., 2021). In den letzten Jahren wurde zudem bekannt, dass es auch bei neurodegenerativen Erkrankungen wie M. Parkinson zu Veränderungen in der Zusammensetzung des Darmmikrobioms kommen kann (Hill-Burns et al., 2017; Hopfner et al., 2017; A. Lin et al., 2018; Romano et al., 2021). Zu den Taxa, die bei Parkinson-Patienten oftmals verstärkt im Darmmikrobiom gefunden werden können, gehören neben der Familie Entercoccaceae, im Speziellen die Gattung *Enterococcus* (Hasegawa et al., 2015; Hopfner et al., 2017; C. H. Lin et al., 2019; Pietrucci et al., 2019) auch die Familie Verrucomicrobiaceae mit der Gattung *Akkermansia* (Keshavarzian et al., 2015; C. H. Lin et al., 2019; Vascellari et al., 2020) und Bakterien aus der Familie Enterobacteriaceae (Nakahara et al., 2023; Unger et al., 2016; Wallen et al., 2020). Darüber hinaus konnte in mehreren Studien ein erhöhtes Vorkommen der Familie Lactobacillaceae und vor allem der Gattung *Lactobacillus* (Hasegawa et al., 2015; Hill-Burns et al., 2017; Hopfner et al., 2017; Scheperjans et al., 2015) beschrieben werden. Im Gegensatz dazu ist das Vorkommen von Mikroorganismen z. B. aus der Familie Lachnospiraceae mit der Gattung *Blautia* (Barichella et al., 2019; Hill-Burns et al., 2017; Keshavarzian et al., 2015; Pietrucci et al., 2019), der Familie Oscillospiraceae (Ruminococcaceae) mit den Gattungen *Ruminococcus* und *Faecalibacterium* (Keshavarzian et al., 2015; Lin et al., 2019; Petrov et al., 2017; Wallen et al., 2020) in Parkinson-Patienten deutlich vermindert. Weiterhin gibt es Studien, die auch eine Verringerung von Bakterien der Familie Prevotellacaea mit der Gattung *Prevotella* (Nakahara et al., 2023; Petrov et al., 2017; Unger et al., 2016) detektieren konnten. Während das vermehrte oder verringerte Vorkommen der oben genannten Familien oder Gattungen in vielen Studien beschrieben werden konnte, gibt es jedoch auch einige Studien, die entgegengesetzte Beobachtungen gemacht haben. So wurde im Darmmikrobiom von Patienten mit M. Parkinson z. B. auch eine Verminderung von Bakterien der Familie Lactobacillaceae und Entercoccaceae (Unger et al., 2016) beobachtet oder eine Erhöhung der Gattung *Prevotella* beschrieben (Wallen et al., 2020).

Vor kurzem belegte eine Studie zudem die Annahme, dass die Dysbiose des Darmmikrobioms mit Obstipationen bei Patienten mit M. Parkinson verbunden ist (Fu et al., 2022). Diese Beobachtung setzt jedoch voraus, dass die Bakterien im Darm und die umliegenden Darmzellen in der Lage sein müssen, miteinander zu kommunizieren. Dieser Prozess wird auch im Allgemeinen als Zell-Zell-Kommunikation bezeichnet.

2.3 Zell-Zell-Kommunikation

Die Zell-Zell-Kommunikation ist eine essenzielle Funktion von Zellen, bei der Signale zwischen Zellen weitergegeben werden, um so einen intrazellulären Effekt in der Empfängerzelle auszulösen (Armingol et al., 2021). In Eukaryoten lassen sich verschiedene Arten der Signalübertragungen unterscheiden. Die juxtakrine Signaltransduktion setzt den direkten Kontakt der kommunizierenden Zellen zueinander voraus und beruht auf der Weiterleitung von Signalmolekülen z. B. durch *Gap Junctions*. Auf diese Weise können Moleküle zwischen den Zellen ausgetauscht werden, ohne dass diese zuvor in den extrazellulären Raum sezerniert werden müssen (Armingol et al., 2021; Evans, 2015; Nair et al., 2019). Die parakrine Zell-Zell-Kommunikation setzt hingegen keinen direkten Kontakt der Zellen miteinander voraus. Sie beruht auf der Sekretion der Signalmoleküle und Diffusion dieser zu nahegelegenen Empfängerzellen (Armingol et al., 2021; Nair et al., 2019). Ein Beispiel für parakrine Kommunikation ist die Wundheilung. Dabei wird von verwundeten Zellen Adenosintriphosphat (ATP) freigesetzt, welches von den umliegenden Zellen erkannt wird und in diesen ebenfalls die Wundheilung anregt (Handly et al., 2015). Die endokrine Zell-Zell-Kommunikation unterscheidet sich von der parakrinen Zell-Zell-Kommunikation darin, dass die sezernierten Signalmoleküle zunächst einen längeren Weg durch extrazelluläre Flüssigkeiten zurücklegen, um die Empfängerzellen zu erreichen (Armingol et al., 2021; Nair et al., 2019). Das beste Beispiel für die endokrine Signaltransduktion ist das Hormon Insulin, welches von spezialisierten Zellen des Pankreas ins Blut abgegeben und dann an Insulinrezeptoren auf z. B. Leberzellen binden kann und für die Regulation des Blutzuckerspiegels verantwortlich ist (Wrana, 2023). Neben diesen Formen der Zell-Zell-Kommunikation existiert auch noch die autokrine Signalgebung, bei der die Signalmoleküle an Rezeptoren der gleichen Zelle binden, die diese Signalmoleküle sezerniert hat, und die spezialisierte Kommunikation von Neuronen über Neurotransmitter (Armingol et al., 2021; Nair et al., 2019).

Wie bei den eukaryotischen Zellen kann Zell-Zell-Kommunikation auch bei Prokaryoten beobachtet werden. Die Kommunikation zwischen Bakterien wird dabei als *Quorum Sensing* bezeichnet. Beim *Quorum Sensing* kommt es zunächst zur Freisetzung von chemischen Signalmolekülen, die als Autoinduktoren bezeichnet werden. Steigt die Konzentration dieser Signalmoleküle in Abhängigkeit von der Größe der Bakterienpopulation an und übersteigt einen gewissen Schwellenwert, kann dies wiederum von den Bakterien detektiert werden und zur Veränderung der Genexpression in den Bakterien führen (Waters & Bassler, 2005). *Quorum Sensing* spielt eine wichtige Rolle bei der Regulation der Expression von Virulenzfaktoren oder bei der Biofilmbildung (Cvitkovitch et al., 2003; Hammer & Bassler, 2003; R. S. Smith & Iglewski, 2003). Neben dem *Quorum Sensing* gibt es auch noch das sogenannte *Quorum Quenching* (Waters & Bassler, 2005). Wie der Name bereits vermuten lässt, handelt

es sich dabei um die gezielte Inhibition des *Quorum Sensing*, z. B. wenn verschiedene Bakterienspezies in der gleichen Umgebung um dieselbe Ressource konkurrieren (Y. Lin et al., 2003; Lyon et al., 2002; Park et al., 2005; Waters & Bassler, 2005). Neben der Kommunikation von Pro- oder Eukaryoten untereinander ist auch deren Kommunikation miteinander immer mehr Gegenstand der aktuellen Forschung. Diese Art der Kommunikation, z. B. zwischen Bakterien und ihrem humanen Wirt, wird auch als *Cross-Kingdom* oder *Inter-Kingdom* Kommunikation bezeichnet (Hughes & Sperandio, 2008). In den letzten Jahren hat dabei die Beteilung von sogenannten extrazellulären Vesikeln vor allem bei der *Cross-Kingdom* Kommunikation immer mehr an Interesse gewonnen.

2.3.1 Extrazelluläre Vesikel (EVs)

Extrazelluläre Vesikel (EVs) sind kleine Lipidmembran-Partikel, die von Zellen in den extrazellulären Raum sezerniert werden (Yáñez-Mó et al., 2015). Die ersten Beschreibungen von EVs gehen auf Chargaff und West in den 1940er-Jahren zurück. Chargaff arbeitete damals an einem Protokoll zur Trennung von Gerinnungsfaktoren und Zellen im Blut und isolierte durch Zufall wahrscheinlich erstmals EVs, die er zunächst als Abbauprodukte von Blutkörperchen bezeichnete (Chargaff & West, 1946). Erst viele Jahre später beschrieb Wolf, dass durch Ultrazentrifugation von frischem Plasma, welches frei von Blutplättchen ist, winzige Partikel, die er als *platelet-dust* (Blutplättchen-Staub) bezeichnete, sedimentiert werden können und veröffentlichte die ersten elektronenmikroskopischen Aufnahmen dieser Partikel (P. Wolf, 1967). Weitere Aufnahmen wurden 1971 von Crawford veröffentlicht, der zudem erstmals den Begriff *microparticles* (Mikropartikel) nutzte (Crawford, 1971). In den darauffolgenden Jahren nahm die Erforschung dieser Partikel, die zunächst noch als extrazelluläre Mikrovesikel, kleine Partikel oder Virus-ähnliche Partikel bezeichnet wurden, stetig zu. Der Begriff Exosomen wurde erstmals 1981 für Vesikel genutzt, die an bestimmten Bereichen der Plasmamembran sezerniert werden (Trams et al., 1981). Einige Jahre später wurde der Begriff Exosomen ebenfalls genutzt, um Vesikel zu beschreiben, die bei der Fusion von multivesikulären Körperchen (*Multivesicular body*, MVB) mit der Plasmamembran freigesetzt werden (Johnstone et al., 1987). Mit der immer umfangreicher werdenden Forschung und dem größeren Verständnis zur Biogenese dieser Partikel war klar, dass es eine einheitliche Nomenklatur dieser Partikel benötigte. Im Jahr 2011 wurde von György et al. deshalb der Begriff extrazelluläre Vesikel als eine allgemeine Bezeichnung für bewegliche und durch eine Membran begrenzte Partikel eingeführt (György et al., 2011).

Die Sekretion von EVs wurde bereits für alle Eukaryoten, von Amöben bis hin zu Säugetieren beschrieben (Colombo et al., 2014). Basierend auf ihrer Biogenese aber auch ihren morphologischen und biochemischen Eigenschaften können eukaryotische EVs in verschiedene Klassen wie Exosomen, Mikrovesikel und apoptotische Körperchen unterteilt werden (György et al., 2011). Exosomen haben eine Größe von etwa 30 – 100 nm (György et al., 2011; Théry et al., 2009). Ihre Entstehung ist ein mehrstufiger Prozess und beginnt mit der Einstülpung und Abschnürung der endosomalen Membran, wodurch es zur Entstehung von Vesikeln im Lumen der späten Endosomen kommt. Diese werden auch als intraluminale Vesikel (*Intraluminal vesicle*, ILV) bezeichnet. Die späten Endosomen können eine große Anzahl dieser ILVs enthalten und werden daher auch MVBs genannt. Die MVBs können anschließend entweder mit Lysosomen oder Autophagosomen fusionieren, wodurch es zur Degradation der ILVs kommt, oder mit der Plasmamembran, wodurch die ILVs als sogenannte Exosomen in den extrazellulären Raum abgegeben werden (Kalluri & LeBleu, 2020). Eine weitere Klasse der EVs mit einer Größe von ca. 100 – 1.000 nm sind die Mikrovesikel (György et al., 2011; Théry et al., 2009). Sie werden durch die nach außen gerichtete Knospung sowie die Abschnürung dieser von der Plasmamembran gebildet (György et al., 2011). Eine dritte Klasse der EVs stellen die apoptotischen Körperchen (*Apoptotic body*, AB) dar. Anders als Exosomen und Mikrovesikel, die sowohl unter physiologischen als auch pathologischen Bedingungen von den Zellen sezerniert werden, werden apoptotische Körperchen nur von sterbenden Zellen gebildet und können eine Größe von bis zu 5 µm haben (Battistelli & Falcieri, 2020; El Andaloussi et al., 2013; György et al., 2011). Darüber hinaus existieren noch weitere Klassen wie Onkosomen oder Migrasomen, die unter speziellen Bedingungen sezerniert und ebenfalls unter dem Begriff EVs zusammengefasst werden (Minciacchi et al., 2015; X. Zhang et al., 2023). Die verschiedenen Moleküle, die von unterschiedlichen EVs transportiert werden sind recht ähnlich und reichen von Proteinen und Lipiden bis hin zu Nukleinsäuren (Guescini et al., 2010; Haraszti et al., 2016; Kahlert et al., 2014; Skog et al., 2008; Valadi et al., 2007; Yeung et al., 2022). In apoptotischen Körperchen können neben diesen Molekülen zudem auch ganze Zellorganellen gefunden werden (L. Jiang et al., 2017).
Wie in Eukaryoten ist die Sekretion von EVs auch bei einer Vielzahl von Prokaryoten beschrieben (Deatheragea & Cooksona, 2012). Besonders bakterielle EVs (BEVs) haben in den letzten Jahren stark an Aufmerksamkeit gewonnen. Sie werden sowohl von kommensalen als auch von pathogenen Bakterien sezerniert und haben typischerweise eine Größe zwischen 20 - 400 nm (Toyofuku et al., 2019). Die Bildung von BEVs unterliegt dabei verschiedenen Faktoren und kann unter bestimmten Bedingungen wie etwa Stress beeinflusst und z. B. erhöht werden (MacDonald & Kuehna, 2013; Maredia et al., 2012; McBroom & Kuehn, 2007; Orench-Rivera & Kuehn, 2016). Ähnlich wie bei den Eukaryoten wird der Begriff BEVs lediglich als Überbegriff genutzt und kann je nach Ursprung der Vesikel nochmals in

Außenmembranvesikel (*Outer membrane vesicle*, OMV), Außen-Innenmembranvesikel (*Outer-inner membrane vesicle*, OIMV) und zytoplasmatische Membranvesikel (*Cytoplasmatic membrane vesicle*, CMV) unterteilt werden (Toyofuku et al., 2019). BEVs, die von Gram-negativen Bakterien sezerniert werden, werden zumeist als OMVs bezeichnet. Die Sekretion solcher OMVs wurde bereits in den 1960er-Jahren bei *Escherichia coli* (*E. coli*) beschrieben (Knox et al., 1966). Wie der Name vermuten lässt, stammen die OMVs aus der äußeren Membran der Bakterienhülle (Hoekstra et al., 1976). Erst 2013 wurde entdeckt, dass Gram-negative Bakterien neben OMVs auch noch sogenannte OIMVs mit einer doppelten Lipidschicht sezernieren (Pérez-Cruz et al., 2013). BEVs von Gram-positiven Bakterien werden auch als Membranvesikel (*Membrane vesicle*, MV) bezeichnet. Im Vergleich zu den OMVs wurden MVs erst relativ spät im Jahr 2009 aus Kulturen von *Staphylococcus aureus* isoliert (E. Lee et al., 2009). Sowohl BEVs von Gram-negativen als auch Gram-positiven Bakterien transportieren dabei eine Vielzahl von verschiedenen Molekülen wie Proteine, Polysaccharide und Nukleinsäuren, aber auch Toxine (Altindis et al., 2014; Blenkiron et al., 2016; Bryant et al., 2017; Kunsmann et al., 2015; E. Lee et al., 2007; S. Liao et al., 2014; Y. Shen et al., 2012).

2.3.2 Rolle von EVs und EV-RNAs bei der Zell-Zell-Kommunikation

Die Rolle von EVs bei der Zell-Zell-Kommunikation ist in den vergangenen Jahren immer weiter in den Fokus der Forschung gerückt. Die generelle Funktion von EVs liegt dabei in der Übertragung der transportierten Moleküle an Empfängerzellen, woraufhin in diesen wiederum verschiedene zelluläre Funktionen moduliert werden können (Yáñez-Mó et al., 2015). Dahingehend wurde nicht nur den EVs selbst, sondern auch den in EVs transportierten RNAs im Zusammenhang mit der *Cross-Kingdom* Kommunikation immer wieder eine entscheidende Rolle zugeschrieben (Munhoz da Rocha et al., 2020).

Bisher konnten eine ganze Reihe von verschiedenen RNA-Klassen in eukaryotischen EVs detektiert werden. Dazu zählen z. B. Boten-RNAs (*Messenger RNA*, mRNA), Transfer-RNAs, (*Transfer RNA*, tRNA), ribosomale RNAs (*Ribosomal RNA*, rRNA), lange nicht-kodierende RNAs (*Long noncoding RNA*, lncRNA) oder microRNAs (miRNAs) (Chiou et al., 2018; Gezer et al., 2014; Jenjaroenpun et al., 2013; Miranda et al., 2014; Nolte-'t Hoen et al., 2012; Valadi et al., 2007). Die erste Entdeckung, dass miRNAs in EVs von eukaryotischen Zellen transportiert werden können, geht auf Valadi et al. im Jahr 2007 zurück. Sie fanden zudem heraus, dass sich die untersuchten Zellen und EVs hinsichtlich ihres miRNA-Expressionsprofils unterscheiden, was darauf hindeutet, dass miRNAs spezifisch in EVs verpackt werden (Valadi et al., 2007). Seitdem gab es immer mehr Berichte über miRNAs, die in EVs von Zellen sezerniert werden und die Genexpression in unterschiedlichen

Empfängerzellen verändern können (M. T. N. Le et al., 2014; Mittelbrunn et al., 2011; Umezu et al., 2013, 2014). Bei miRNAs handelt es sich um etwa 22 nt lange, nicht-kodierende RNA-Moleküle, die die Genexpression auf posttranskriptioneller Ebene regulieren können (Ambros et al., 2003; Eddy, 2001). In Eukaryoten erfolgt die Bindung der in den RISC (*RNA-induced silencing complex*) integrierten miRNA zumeist in der 3‘-UTR (3‘-untranslatierte Region) der Ziel-mRNA, kann jedoch in selteneren Fällen auch in der 5’-UTR (5‘-untranslatierte Region) oder aber im offenen Leserahmen (*Open reading frame*, ORF) erfolgen (Bartel, 2004; Lytle et al., 2007; Moretti et al., 2010; Qin et al., 2010). In Folge der Bindung kommt es zur Degradierung oder Deadenylierung der mRNA bzw. zur Inhibition der Translation (Hutvágner & Zamore, 2002; L. Wu et al., 2006; Y. Zeng et al., 2002, 2003). Auf diese Weise können miRNAs eine Vielzahl von zellulären Prozessen wie Apoptose, Zelldifferenzierung und -proliferation kontrollieren (Miska, 2005). Ein weiterer Meilenstein war die Entdeckung, dass humane miRNAs das Potenzial besitzen, die Genexpression von Prokaryoten zu verändern (S. Liu et al., 2016). Im Gegensatz zur klassischen posttranskriptionellen Regulation der Genexpression durch miRNAs in eukaryotischen Zellen wurde in der Studie aus dem Jahr 2016 jedoch nicht nur eine Verringerung, sondern auch eine Erhöhung einzelner Transkripte beobachtet. So konnte z. B. nach Kultivierung von *E. coli* in Anwesenheit von miR-1226-5p ein erhöhtes Level von *yegH* Transkripten gemessen werden (S. Liu et al., 2016). Weitere Publikationen der letzten Jahre konnten ebenfalls einen Einfluss von humanen und murinen miRNAs auf die Genexpression und das Wachstum verschiedener Bakterien zeigen (C. Li et al., 2023; S. Liu et al., 2019; Santos et al., 2020; L. Zhao et al., 2022).

In BEVs von Gram-negativen und Gram-positiven Bakterien können ebenfalls unterschiedliche RNA-Klassen detektiert werden. Darunter finden sich z. B. tRNAs, rRNAs, mRNAs oder kleine nicht-kodierende RNAs (*Small RNA/Small noncoding RNA*, sRNA/sncRNA), von denen einige eine ähnliche Größe wie eukaryotische miRNAs aufweisen und auch als *miRNA-size small RNAs* (msRNA) bezeichnet werden (Blenkiron et al., 2016; J. W. Choi et al., 2017; Ghosal et al., 2015; Joshi et al., 2021; Malabirade et al., 2018; Sjöström et al., 2015). In den vergangenen Jahren wurde die Funktion der BEV-RNAs vor allem bei der Interaktion von Pathogenen mit ihrem Wirt vermehrt untersucht. Verschiedene Studien kamen dabei zu dem Ergebnis, dass die in den BEVs transportierten RNAs in Empfängerzellen zur Veränderung der Genexpression führen können. So konnte beispielsweise gezeigt werden, dass sRNAs, die von *Pseudomonas aeruginosa*, *Helicobacter pylori* oder verschiedenen parodontalen Pathogenen in BEVs sezerniert werden, die Sekretion von Zytokinen in eukaryotischen Empfängerzellen unterdrücken können (J. W. Choi et al., 2017; Koeppen et al., 2016; H. Zhang et al., 2020).

2.4 Ausgangspunkt und Zielsetzung der Arbeit

Die Entstehung von M. Parkinson ist ein multifaktorieller Prozess, der trotz intensiver Forschung immer noch nicht vollständig aufgeklärt ist. Seitdem im Jahr 2003 die ersten Hypothesen zur Darm-Hirn-Achse und deren Verbindung zu M. Parkinson aufkamen (Braak, Rüb, et al., 2003; Braak, Tredici, et al., 2003), wurde in den darauffolgenden Jahren vermehrt der Gastrointestinaltrakt als Ursprung von M. Parkinson diskutiert (Breen et al., 2019; Houser & Tansey, 2017; Lionnet et al., 2018). Für diese Hypothese spricht u. a. die Beobachtung, dass bereits früh im Laufe der Pathogenese von M. Parkinson gastrointestinale Veränderungen wie Obstipationen beobachtet werden können (Adams-Carr et al., 2016; Noyce et al., 2012; Svensson et al., 2016). Dabei konnte erst vor kurzem gezeigt werden, dass Obstipationen bei Parkinson-Patienten mit einer Dysbiose des Darmmikrobioms zusammenhängen (Fu et al., 2022). Eine Voraussetzung dafür, dass ein verändertes Darmmikrobiom einen Einfluss auf die Pathogenese von M. Parkinson haben kann, ist, dass sowohl die Bakterien als auch die humanen Zellen im Darm in der Lage sein müssen, miteinander zu kommunizieren. Im Zuge dessen hat die Beteiligung von EVs sowie im Speziellen der Rolle der mit den EVs assoziierten RNAs bei einer solchen *Cross-Kingdom* Kommunikation immer mehr an Bedeutung gewonnen (Munhoz da Rocha et al., 2020). Das Ziel der vorliegenden Arbeit bestand daher darin, die Kommunikation zwischen Bakterien, bei denen eine Verbindung zu M. Parkinson bekannt ist, und humanen Darmepithelzellen über EVs zu untersuchen (**Abb. 1**).

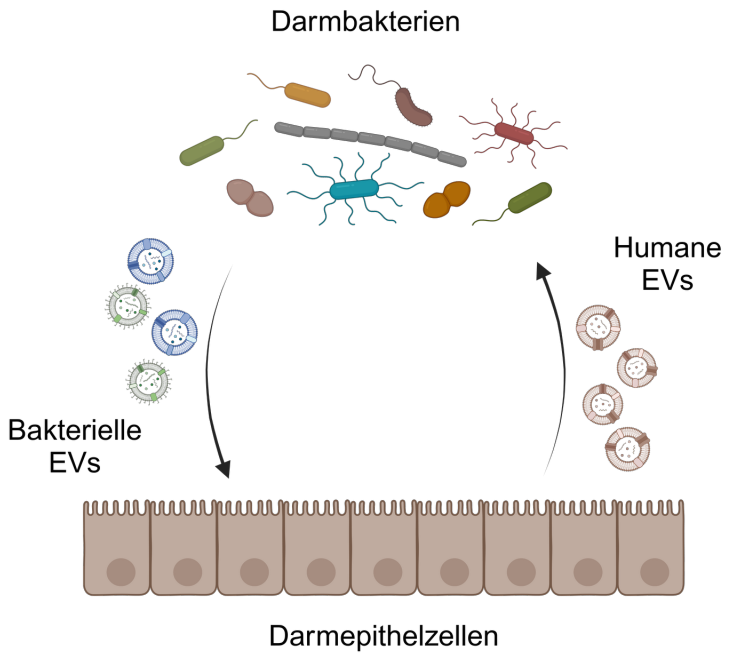

Abbildung 1: Schematische Darstellung der bidirektionalen Kommunikation zwischen Bakterien und humanen Zellen über EVs.
(Abbildung in Anlehnung an H.-J. Lee, 2019, erstellt mit BioRender)

Das erste Teilziel bestand darin, die Zusammensetzung des Darmmikrobioms bei Patienten mit M. Parkinson im Vergleich zu gesunden Kontrollprobanden zu untersuchen, um Bakterienfamilien zu identifizieren, deren Abundanz im Darm von Parkinson-Patienten verändert war. Auf Grundlage der Ergebnisse sollten im Folgenden einzelne Bakterienspezies aus den identifizierten Familien ausgewählt und deren Kommunikation mit humanen Zellen über BEVs näher untersucht werden. Unter anderem sollte die Aufnahme der BEVs in die humanen Darmepithelzellen gezeigt sowie deren Einfluss auf die Viabilität der eukaryotischen Zellen analysiert werden. Nach qualitativer und quantitativer Analyse der mit den BEVs assoziierten RNA sollte dann der Effekt der BEVs sowie der BEV-RNA selbst auf die Genexpression in Darmepithelzellen analysiert werden. Analog dazu sollte die *Cross-Kingdom* Kommunikation von Darmepithelzellen über eukaryotische EVs und EV-miRNAs in Richtung der Bakterien näher untersucht werden. Dabei sollte neben der Charakterisierung der EV-RNA, insbesondere der miRNAs, ebenfalls Aspekte wie die Aufnahme der EVs bzw. der EV-miRNAs in die Bakterien sowie mögliche Veränderungen des Wachstums oder der Viabilität der Bakterien analysiert werden.

Die aus dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse sollen damit das Verständnis der Funktion von bakteriellen und eukaryotischen EVs sowie mit EVs assoziierten RNAs bei der *Cross-Kingdom* Kommunikation erweitern und ihre Rolle bei der Entstehung von Erkrankungen wie z. B. M. Parkinson näher beleuchten.

3. Materialien und Methoden

3.1 Materialien

3.1.1 Patientenmaterial

Für die Untersuchung der Zusammensetzung des Darmmikrobioms wurden Stuhlproben von Patienten mit M. Parkinson sowie gesunden Kontrollprobanden verwendet. Alle Stuhlproben wurden zwischen 2015 und 2017 im Rahmen der von der Michael J. Fox Foundation for Parkinson's Research (MJFF) geförderten Studie „RESISTA-PD – *Effects of Resistant Starch on Bowel Habits, Short Chain Fatty Acids and Gut Microbiota in Parkinson Disease*" (Leiter der Studie: Prof. Dr. Marcus Unger) gesammelt. Für die Analyse des Metagenoms als Teil dieser Arbeit wurden insgesamt 77 Stuhlproben verwendet. Davon waren 50 Proben von Patienten mit M. Parkinson und 27 Proben von gesunden Kontrollprobanden.

3.1.2 Eukaryotische Zelllinie

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die eukaryotische Zelllinie Cancer coli-2 (Caco-2) HTB-37™ der Firma ATCC® (American Type Culture Collection) verwendet. Es handelt sich dabei um eine humane Zelllinie, die 1977 von Fogh et al. aus einem kolorektalen Adenokarzinom etabliert wurde (Fogh et al., 1977). Die Zellen wachsen adhärent und weisen eine Epithel-ähnliche Morphologie auf. **Abb. 2** zeigt eine mikroskopische Aufnahme der Caco-2 Zellen bei geringer sowie hoher Zelldichte.

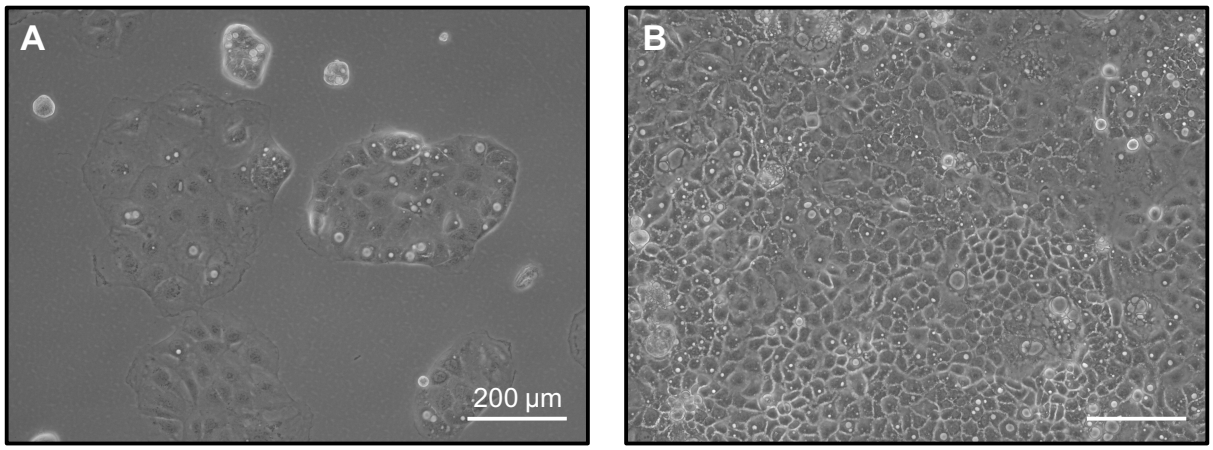

Abbildung 2: Mikroskopische Aufnahme von Caco-2 Zellen.
Die Aufnahmen zeigen die Zellen bei niedriger (**A**) und hoher (**B**) Zelldichte. Größenstandard: 200 µm

3.1.3 Bakterienstämme

Alle Bakterien, die für die Versuche der vorliegenden Arbeit verwendet wurden, wurden vom Leibnitz-Institut Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) bezogen.

Bakterium	Bestellnummer
Enterococcus faecalis	DSM 20478
Lacticaseibacillus casei	DSM 20011
Proteus mirabilis	DSM 4479

3.1.4 Nähr- und Kulturmedien

3.1.4.1 Kulturmedien für eukaryotische Zellen

Dulbecco‘s Modified Eagle‘s Medium

Die Kultivierung der eukaryotischen Zellen erfolgte in Dulbecco‘s Modified Eagle‘s Medium (DMEM). Vor der Verwendung wurden das DMEM mit 10 % (v/v) fötalem Kälberserum (*fetal calf serum*, FCS) und 1 % (v/v) nicht-essentiellen Aminosäuren (*non-essential amino acid*, NEAA) supplementiert.

Medien und Zusätze für die humane Zellkultur	Bezugsquelle
Gibco™ Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, hoher Glukosegehalt)	Thermo Fisher Scientific (Waltham, Massachusetts, USA)
Gibco™ MEM Non-Essential Amino Acids Solution (100x)	Thermo Fisher Scientific (Waltham, Massachusetts, USA)
Gibco™ Fötales Kälberserum (FCS)	Thermo Fisher Scientific (Waltham, Massachusetts, USA)

3.1.4.2 Flüssig- und Festmedien für Bakterienkulturen

deMan-Rogosa-Sharpe Medium

Für die Herstellung des Flüssigmediums wurden 52 g des dehydrierten deMan-Rogosa-Sharpe (MRS) Mediums entsprechend der Herstellerangaben in 1 l destilliertem Wasser gelöst, autoklaviert und anschließend bei 4 °C gelagert.

Hirn-Herz-Infusionsmedium

Zur Herstellung des Flüssigmediums wurden 37 g des dehydrierten Hirn-Herz-Infusionsmedium (*Brain Heart Infusion*, BHI) in 1 l destilliertem Wasser gelöst und anschließend autoklaviert. Das Medium konnte dann bei 4 °C gelagert werden.

MRS und BHI-Agarplatten

Für die Herstellung von MRS oder BHI Agarplatten wurde das MRS oder BHI-Medium wie oben beschrieben vorbereitet, anschließend mit 1,5 % (w/v) Agar versetzt und autoklaviert. Nachdem das Gemisch auf etwa 60 °C abgekühlt war wurde es unter sterilen Bedingungen in Petrischalen gegossen. Nach dem Erstarren des Agars wurden die Agarplatten in sterile Tüten verpackt und bis zur Verwendung bei 4 °C gelagert werden.

Medien und Zusätze für die Bakterienkultur	Bezugsquelle
Agar	Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, USA)
BHI-Bouillon	Merck Millipore (Burlington, Massachusetts, USA)
MRS-Bouillon	Carl Roth® (Karlsruhe, Deutschland)

3.1.5 Chemikalien und Reagenzien

Chemikalien und Reagenzien	Bezugsquelle
3-Mercato-1,2-propanediol	Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, USA)
Ambion™ Nuklease-freies Wasser	Invitrogen™ (Carlsbad, Kalifornien, USA)
Ambion™ Tris-EDTA Puffer (pH 8,0)	Thermo Fisher Scientific (Waltham, Massachusetts, USA)
Aqua destillata (A. dest)	Eigene Versorgung
BD FACSClean Lösung	Becton Dickinson (Franklin Lakes, New Jersey, USA)

Chemikalien und Reagenzien	Bezugsquelle
BD FACSFlow™ Trägerflüssigkeit	Becton Dickinson (Franklin Lakes, New Jersey, USA)
BD FACSRinse Lösung	Becton Dickinson (Franklin Lakes, New Jersey, USA)
Borsäure	Carl Roth® (Karlsruhe, Deutschland)
Bovines Serumalbumin (BSA)	Carl Roth® (Karlsruhe, Deutschland)
Bromphenolblau	Serva Electrophoresis GmbH (Heidelberg, Deutschland)
CASYton	OLS® OMNI Life Science GmbH & Co. KG (Bremen, Deutschland)
cOmplete™ Mini EDTA-freier Proteasehemmer-Cocktail	Roche (Mannheim, Deutschland)
Dako Fluorescence Mounting Medium	Agilent Technologies (Santa Clara, Kalifornien, USA)
DNA Molecular Weight Marker III	Roche (Mannheim, Deutschland)
Dulbecco's Phosphatgepufferte Salzlösung (Phosphate buffered saline, PBS)	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Essigsäure (99 %)	Carl Roth® (Karlsruhe, Deutschland)
Ethanol ROTIPURAN® ≥99,8 %	Carl Roth® (Karlsruhe, Deutschland)
Ethidiumbromid-Lösung 1 % (10 mg/ml)	Carl Roth® (Karlsruhe, Deutschland)
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, USA)
Formaldehyd-Lösung 16 % (w/v), methanolfrei	Thermo Fisher Scientific (Waltham, Massachusetts, USA)
Gibco™ PBS Tabletten	Thermo Fisher Scientific (Waltham, Massachusetts, USA)
Gibco™ Trypsin-EDTA (0,05 %)	Thermo Fisher Scientific (Waltham, Massachusetts, USA)
Glutardialdehyd (Elektronenmikroskopie-Qualität, 25 % Lösung in Wasser)	Thermo Fisher Scientific (Waltham, Massachusetts, USA)
Glycerin	Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, USA)
Glycin	Carl Roth® (Karlsruhe, Deutschland)
Glykogen (5 mg/ml)	Invitrogen™ (Carlsbad, Kalifornien, USA)
Hexamethyldisilazan ≥99,9 % (HMDS)	Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, USA)
Methanol ROTISOLV®	Carl Roth® (Karlsruhe, Deutschland)
Natriumacetat	Carl Roth® (Karlsruhe, Deutschland)

Chemikalien und Reagenzien	**Bezugsquelle**
Natriumchlorid (NaCl)	VWR™ International (Radnor, Pennsylvania, USA)
Natriumdodecylsulfat (*Sodium dodecyl sulfate*, SDS)	Carl Roth® (Karlsruhe, Deutschland)
Natriumhydroxid (NaOH)	Carl Roth® (Karlsruhe, Deutschland)
Pierce® Ripa Puffer	Thermo Fisher Scientific (Waltham, Massachusetts, USA)
Polyadenylsäure (1 mg/ml)	Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, USA)
PonceauS™	Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, USA)
Precision Plus Protein™ Dual Color Standard	Bio-Rad Laboratories Inc. (Hercules, Kalifornien, USA)
Protein Standard (BSA) Lösung (1 mg/ml)	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
QIAzol Lysis Reagent	Qiagen (Hilden, Deutschland)
Saponin	Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, USA)
Sepharose™ CL-2B	GE Healthcare (Chicago, Illinios, USA)
Trichlormethan/Chloroform	Carl Roth® (Karlsruhe, Deutschland)
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	Carl Roth® (Karlsruhe, Deutschland)
Triton® X-100	Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, USA)
Tween® 20	Carl Roth® (Karlsruhe, Deutschland)
Tween® 80	MP Biomedicals (Santa Ana, Kalifornien, USA)
UltraPure™ Agarose	Invitrogen™ (Carlsbad, Kalifornien, USA)
UltraPure™ Glykogen (20 µg/µl)	Invitrogen™ (Carlsbad, Kalifornien, USA)
Xylencyanol	Carl Roth® (Karlsruhe, Deutschland)

3.1.6 Puffer und Lösungen

Puffer und Lösungen	Zusammensetzung
0,05 % Tween® 80	500 µl 5 % Tween® 80 ad 50 ml PBS (steril)
0,5 M EDTA (pH 8,0)	18,6 g EDTA 80 ml A. dest pH auf 8,0 mit NaOH einstellen ad 100 ml A. dest
10x Ladepuffer	100 µl 50x TAE-Puffer 3,5 ml Glycerol 400 µl 0,5 M EDTA ad 5 ml A. dest Spatelspitze Bromphenolblau Spatelspitze Xylencyanol
10x Tris-gepufferte Kochsalzlösung (Tris buffered saline, TBS)	24 g Tris 88 g NaCl ad 1 l A. dest
1x SDS-Laufpuffer	25 mM Tris 190 mM Glycin 0,1 % SDS gelöst in A. dest
1x TBS mit Tween® 20 (TBST)	0,1 % Tween® 20 gelöst in 1x TBS
1x Transferpuffer	25 mM Tris 190 mM Glycin 0,1 % SDS 20 % Methanol gelöst in A. dest

Puffer und Lösungen	Zusammensetzung
2x Sample Buffer	130 mM Tris 6 % SDS 10 % 3-Mercato-1,2-propanediol 10 % Glycerol (0,05 % Bromphenolblau) gelöst in A. dest
3 M Natriumacetat (pH 7,0)	24,61 g Natriumacetat 80 ml A. dest pH auf 7,0 einstellen ad 100 ml A. dest
5 % Tween® 80	5 % Tween® 80 gelöst in PBS vor Gebraucht sterilfiltriert
50x Tris-Acetat-EDTA (TAE)-Puffer	242 g Tris 57,1 ml Essigsäure (99 %) 100 ml 0,5 M EDTA (pH 8,0) pH auf 8,0 einstellen ad 1 l A. dest
5x Tris-Borat-EDTA (TBE)-Puffer	54 g Tris 27,5 g Borsäure 20 ml 0,5 M EDTA (pH 8,0) Ad 1 l A. dest
Blocking-/Permeabilisierungspuffer (1 % BSA/0,05 % Saponin)	1 % BSA 0,05 % Saponin gelöst in PBS vor Gebrauch filtriert
Blockingpuffer (5 % BSA/1x TBST)	5 % BSA Gelöst in 1x TBST

Puffer und Lösungen	Zusammensetzung
Fixierlösung (3 % Glutardialdehyd)	3 % Glutardialdehyd (25 %) gelöst in A. dest
Fixierlösung (4 % Formaldehyd)	4 % Formaldehyd-Lösung (16 %) gelöst in PBS
PBS für EV-Präparation	1 PBS Tablette Ad 500 ml A. dest vor Gebrauch sterilfiltriert
Ripa Puffer mit Proteaseinhibitor	1 Proteasehemmer Cocktail Tablette 4 ml Pierce® Ripa Puffer

3.1.7 Experimentelle Kits

Experimentelle Kits	Bezugsquelle
Agilent DNA 1000 Kit	Agilent Technologies (Santa Clara, Kalifornien, USA)
Agilent RNA 6000 Nano Kit	Agilent Technologies (Santa Clara, Kalifornien, USA)
Agilent RNA 6000 Pico Kit	Agilent Technologies (Santa Clara, Kalifornien, USA)
BGISEQ-500RS DNB Make Load Reagent Kit	MGI Tech Co, Ltd. (Shenzhen, China)
BGISEQ-500RS High-throughput Sequencing Kit (PE100)	MGI Tech Co, Ltd. (Shenzhen, China)
Cytotoxicity Detection Kit (LDH)	Roche (Mannheim, Deutschland)
DNBSEQ-G400RS High-throughput Sequencing Reagent Set (FCL, PE100)	MGI Tech Co, Ltd. (Shenzhen, China)
Lipofectamine™ 3000 Transfektionsreagenz	Thermo Fisher Scientific (Waltham, Massachusetts, USA)
LIVE/DEAD™ BacLight™ Bacterial Viability Kit	Invitrogen™ (Carlsbad, Kalifornien, USA)
MGIEasy Circularization Module	MGI Tech Co, Ltd. (Shenzhen, China)

Experimentelle Kits	Bezugsquelle
MGIEasy DNA Library Prep Kit	MGI Tech Co, Ltd. (Shenzhen, China)
MGIEasy RNA Library Prep Set	MGI Tech Co, Ltd. (Shenzhen, China)
MGIEasy rRNA Depletion Kit	MGI Tech Co, Ltd. (Shenzhen, China)
MGIEasy smallRNA Library Prep Kit	MGI Tech Co, Ltd. (Shenzhen, China)
miRNeasy Micro Kit	Qiagen (Hilden, Deutschland)
miRNeasy Serum/Plasma Kit	Qiagen (Hilden, Deutschland)
Pierce™ Chromogenic Endotoxin Quant Kit	Thermo Fisher Scientific (Waltham, Massachusetts, USA)
PrestoBlue™ Zellviabilitätsreagenz	Invitrogen™ (Carlsbad, Kalifornien, USA)
QuantiPro™ BCA Assay Kit	Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, USA)
Qubit™ 1x dsDNA HS Assay Kit	Invitrogen™ (Carlsbad, Kalifornien, USA)
Qubit™ RNA HS Assay Kit	Invitrogen™ (Carlsbad, Kalifornien, USA)
Qubit™ ssDNA Assay Kit	Invitrogen™ (Carlsbad, Kalifornien, USA)
RNase-freie DNase Set	Qiagen (Hilden, Deutschland)
SignalFire™ Elite ECL Reagenz	Cell Signaling Technology® (Danvers, Massachusetts, USA)

3.1.8 Fluoreszenzfarbstoffe

Fluoreszenzfarbstoffe	Bezugsquelle
4′,6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI)	Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, USA)
Alexa Fluor™ 488 Phalloidin	Invitrogen™ (Carlsbad, Kalifornien, USA)
GelStar™ Nucleic Acid Stain	Lonza Group AG (Basel, Schweiz)
PKH26 Fluoreszenz-Zell-Linker	Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, USA)
Vybrant™ DiI Zellkennzeichnungslösung	Invitrogen™ (Carlsbad, Kalifornien, USA)

3.1.9 Antikörper

Antikörper	Hersteller
Rabbit monoclonal anti-Calnexin	Cell Signaling Technology® (Danvers, Massachusetts, USA)
Rabbit monoclonal anti-CD81	Cell Signaling Technology® (Danvers, Massachusetts, USA)
Rabbit monoclonal anti-IgG Peroxidase antibody	Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, USA)

3.1.10 Synthetische miRNA-Oligonukleotide

Im Rahmen dieser Arbeit wurden synthetischen miRNA-Oligonukleotide verwendet, welche als doppelsträngige RNA von der Firma Eurofins Genomics (Ebersberg, Deutschland) synthetisiert wurden. Die Oligonukleotide wurden auf Grundlage der miRNA-Sequenz aus der Datenbank miRBase (release 22) designt. Die lyophilisierten Oligonukleotide wurden dann nach Angaben der Hersteller zu einer Konzentration von 100 pmol/µl in 1 x siMAX Universal Buffer (30 nM HEPES, 100 mM KCl, 1 mM $MgCl_2$, pH = 7,3) gelöst und bei -20 °C gelagert. Der Sense-Strang entsprach der Sequenz der reifen miR-192-5p und der Antisense-Strang dem der reifen miR-192-3p. Diese sollten als Duplex die humane miRNA nachahmen. Die genauen Oligonukleotid-Sequenzen und zusätzliche 5‘ Modifikationen können **Tab. 1** entnommen werden.

Tabelle 1: Verwendete synthetische miRNA-Oligonukleotide.
Angegeben sind die Sequenzen der humanen (*Homo sapiens*, hsa) miRNA von Sense und Antisense-Strang sowie die 5‘ Modifikationen an den jeweiligen Strängen.

Name	Strang	Oligonukleotid-Sequenz (5' → 3')	5' Modifikationen
hsa-miR-192-5p	Sense	CUGACCUAUGAAUUGACAGCC	Phosphat
	Antisense	CUGCCAAUUCCAUAGGUCACAG	Phosphat
Cy3-hsa-miR-192-5p	Sense	CUGACCUAUGAAUUGACAGCC	Cyanin3
	Antisense	CUGCCAAUUCCAUAGGUCACAG	Phosphat

3.1.11 Geräte und Hilfsmittel

Geräte und Hilfsmittel	Bezugsquelle
Agilent 2100 Bioanalyzer	Agilent Technologies (Santa Clara, Kalifornien, USA)
Axio Vert.A1 Mikroskop	Carl Zeiss Microscopy GmbH (Oberkochen, Deutschland)
Axiocam Erc 5s Mikroskopkamera	Carl Zeiss Microscopy GmbH (Oberkochen, Deutschland)
BD FACSFlow™ Supply System	Becton Dickinson (Franklin Lakes, New Jersey, USA)
BD LSRFortessa™ Cell Analyzer	Becton Dickinson (Franklin Lakes, New Jersey, USA)
BGIDL-50 DNB Loader	MGI Tech Co, Ltd. (Shenzhen, China)
BGISEQ-500 Sequenzierer	MGI Tech Co, Ltd. (Shenzhen, China)
Branson Digital Sonifier® Model 250 D	G. Heinemann Ultraschall- und Labortechnik (Schwäbisch Gmünd, Deutschland)
Branson Sonifier® Model 250	G. Heinemann Ultraschall- und Labortechnik (Schwäbisch Gmünd, Deutschland)
CASY Cell counter & Analyzer	OLS® OMNI Life Science GmbH & Co. KG (Bremen, Deutschland)
ChemiDoc™ Touch Imaging System	Bio-Rad Laboratories Inc. (Hercules, Kalifornien, USA)
CO_2-Inkubator	BINDER GmbH (Tuttlingen, Deutschland)
ColonyCount V	Gerber Instruments AG (Illnau-Effretikon, Schweiz)
DeVision DBOX	Decon Science Tec GmbH (Hohengandern, Deutschland)
DNBSEQ-G400 Sequenzierer	MGI Tech Co, Ltd. (Shenzhen, China)
DWK Life Sciences DURAN® Kulturkolben in Erlenmeyerform (100 ml, 250 ml und 500 ml)	Carl Roth® (Karlsruhe, Deutschland)
DWK Life Sciences Kimble™ Kontes™ FlexColumn™ Chromatographiesäulen	Fisher Scientific (Pittsburgh, Pennsylvania, USA)
DynaMag™-2	Invitrogen™ (Carlsbad, Kalifornien, USA)

Geräte und Hilfsmittel	Bezugsquelle
Ecotron Inkubationsschüttler	Infors HT (Bottmingen, Schweiz)
Elektrophorese-Netzgerät EV231	neoLab Migge GmbH (Heidelberg, Deutschland)
Evo HD15 Rasterelektronenmikroskop	Carl Zeiss Microscopy GmbH (Oberkochen, Deutschland)
Fisherbrand™ Zelldichtemessgeräte	Fisher Scientific (Pittsburgh, Pennsylvania, USA)
Fluo-O-Blu Blaulicht-Transilluminator	Biozym Scientific GmbH (Hessisch Oldendorf, Niedersachsen)
Flüssigkeits-Absaugsystem BVC control	Vacuubrand GmbH + Co. KG (Wertheim, Deutschland)
Infinite M200 Pro Plattenleser	Tecan Group AG (Männedorf, Schweiz)
Innova™ 24 Inkubationsschüttler	New Brunswick Scientific™ (Edison, New Jersey, USA)
Leica DMi8 Mikroskop	Leica Microsystems (Wetzlar, Deutschland)
Leica EL6000 Externe Lichtquelle zur Fluoreszenz-Anregung	Leica Microsystems (Wetzlar, Deutschland)
Leica TCS SP8 System	Leica Microsystems (Wetzlar, Deutschland)
M220 Focused-Ultrasonicator	Covaris® (Woburn, Massachusetts, USA)
MGISP-960 Automated Sample Preparation System	MGI Tech GmbH, Ltd. (Shenzhen, China)
Milli-Q® Advantage A10 Wasseraufbereitungsanlage	Merck Millipore (Burlington, Massachusetts, USA)
Mini-PROTEAN Tetra Cell	Bio-Rad Laboratories Inc. (Hercules, Kalifornien, USA)
Multipette® M4 Mehrfachdispenser-Pipette	Eppendorf GmbH (Hamburg, Deutschland)
Multiskan™ GO Spektrophotometer	Thermo Fisher Scientific (Waltham, Massachusetts, USA)
NanoDrop™ 2000 Spektralphotometer	Thermo Fisher Scientific (Waltham, Massachusetts, USA)
NanoSight LM10	Malvern Panalytical (Malvern, Worcestershire, Vereinigtes Königreich)
PerfectBlue™ Horizontales Gelsystem Midi	Peqlab Biotechnologie GmbH (Erlangen, Deutschland)

Geräte und Hilfsmittel	Bezugsquelle
Pipetten (P2.5, P10, P20, P200 und P1000)	Brand GmbH & Co. KG (Wertheim, Deutschland)
Pipettierhelfer Powerpette Pro	VWR™ International (Radnor, Pennsylvania, USA)
Q150R ES Sputter Coater	Quorum Technologies Ltd. (Laughton, East Sussex, Vereinigtes Königreich)
Qubit™ 4 Fluorometer	Invitrogen™ (Carlsbad, Kalifornien, USA)
Rollmischer RM5	Ingenieurbüro CAT, M. Zipperer GmbH (Ballrechten-Dottingen, Deutschland)
Spark® Cyto Plattenleser	Tecan Group AG (Männedorf, Schweiz)
Standard Power Pack P25 T Supply Netzteil	Biometra GmbH (Göttingen, Deutschland)
Stiftprobenteller aus Aluminium	Plano GmbH (Wetzlar, Deutschland)
Sunlab® Mini-Magnetrührer SU1250	neoLab Migge GmbH (Heidelberg, Deutschland)
Synergy LX Multifunktionslesegerät	BioTek Instruments, Inc. (Winooski, Vermont, USA)
TE42 und TE62 Tank Blotting-Einheit	Hoefer Inc. (Holliston, Massachusetts, USA)
Thermo Scientific™ Safe 2020 biologische Sicherheitswerkbank	Fisher Scientific (Pittsburgh, Pennsylvania, USA)
Thermocycler peqSTAR	Peqlab Biotechnologie GmbH (Erlangen, Deutschland)
Thermomixer F1.5	Eppendorf GmbH (Hamburg, Deutschland)
Ultrazentrifuge Optima™ L-90K	Beckman Coulter GmbH (Brea, Kalifornien, USA)
Ultrazentrifugenrotor Typ 45Ti	Beckman Coulter GmbH (Brea, Kalifornien, USA)
Unimax 1010 Plattformschüttler	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG (Schwabach, Deutschland)
Universalwärmeschrank UN75	Memmert GmbH + Co. KG (Schwabach, Deutschland)
Vortexer IKA® MS3	IKA®-Werke GmbH & Co. KG (Staufen, Deutschland)
Vortex-Genie® 2	Scientific Industries, Inc. (Bohemia, New York, USA)

Geräte und Hilfsmittel	Bezugsquelle
Wasserbad WNB14	Memmert GmbH + Co. KG (Schwabach, Deutschland)
XCell SureLock™ Mini-Zelle	Invitrogen™ (Carlsbad, Kalifornien, USA)
Zentrifuge Micro Star 17	VWR™ International (Radnor, Pennsylvania, USA)
Zentrifuge Rotina 420 R	Andreas Hettich GmbH & Co. KG (Tuttlingen, Deutschland)
Zentrifuge Universal 320 R	Andreas Hettich GmbH & Co. KG (Tuttlingen, Deutschland)

3.1.12 Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterialien	Bezugsquelle
Abdeckplatten aus Polystyrol	Greiner Bio-One GmbH (Frickenhausen, Deutschland)
AFA-Tubes® (50 µl)	Covaris® (Woburn, Massachusetts, USA)
Agilent Filterspitzen (96 Spitzen/Rack, 250 µl)	Agilent Technologies (Santa Clara, Kalifornien, USA)
Aluminiumdeckel	PerkinElmer (Waltham, Massachusetts, USA)
Amersham™ Protran™ 0,2 µm Nitrozellulose Western-Blotting-Membran	GE Healthcare (Chicago, Illinios, USA)
Axygen® MaxyClear Snaplock Mikrozentrifugenröhrchen	Fisher Scientific (Pittsburgh, Pennsylvania, USA)
Axygen® Wide Bore Filterspitzen (200 µl und 1000 µl)	Fisher Scientific (Pittsburgh, Pennsylvania, USA)
BD Plastipack® Einmalspritzen (50 ml)	Becton Dickinson (Franklin Lakes, New Jersey, USA)
CASYcups	OLS® OMNI Life Science GmbH & Co. KG (Bremen, Deutschland)
Cellstar® Polypropylen Röhrchen (15 ml und 50 ml)	Greiner Bio-One GmbH (Frickenhausen, Deutschland)
Cellstar® Serologische Pipetten (2 ml, 5 ml, 10 ml und 25 ml)	Greiner Bio-One GmbH (Frickenhausen, Deutschland)

Verbrauchsmaterialien	Bezugsquelle
Cellstar® Zellkulturflaschen (T75 und T25)	Greiner Bio-One GmbH (Frickenhausen, Deutschland)
Cellstar® Zellkulturplatten in schwarz oder transparent mit flachem Boden, mit oder ohne Deckel (12-, 48- und 96-Well)	Greiner Bio-One GmbH (Frickenhausen, Deutschland)
Combitips advanced® Direktverdrängerpipettenspitzen (5 ml und 10 ml)	Eppendorf GmbH (Hamburg, Deutschland)
Corning™ Costar™ Zentrifugenröhrchen Spin-X Membranfilter aus Celluloseacetat (0,45 µm)	Fisher Scientific (Pittsburgh, Pennsylvania, USA)
CryoPure Röhrchen (2 ml)	Sarstedt AG & Co.KG (Nürnbrecht, Deutschland)
Falcon® 5 ml Rundbodenröhrchen aus Polystyrol	Corning, Inc. (Corning, New York, USA)
Filtrationsgerät Stericup® mit Durapore® PVDF-Membran Porengröße 0,22 µm und 0,45 µm (150 ml und 500 ml)	Merck Millipore (Burlington, Massachusetts, USA)
Fisherbrand™ DeepWell™ Polypropylen-Mikrotiterplatten (96-Well)	Fisher Scientific (Pittsburgh, Pennsylvania, USA)
Gel-Blottingpapiere Whatman®	Carl Roth® (Karlsruhe, Deutschland)
Halb-Mikro-Küvetten	Sarstedt AG & Co.KG (Nürnbrecht, Deutschland)
Hard-Shell® PCR Platten in Weiß (96-Well)	Bio-Rad Laboratories Inc. (Hercules, Kalifornien, USA)
Impfösen (10 µl)	Sarstedt AG & Co.KG (Nürnbrecht, Deutschland)
Injekt® Solo Einmalspritzen (2 ml, 10 ml und 20 ml)	B. Braun Melsungen AG (Melsungen, Deutschland)
Injekt®-F Feindosierungsspritze (1 ml)	B. Braun Melsungen AG (Melsungen, Deutschland)
Kimtech® Science Präzisionswischtücher	Kimberly-Clark Professional (Roswell, Georgia, USA)
Leitfähige Kohlenstoffklebepads	Plano GmbH (Wetzlar, Deutschland)

Verbrauchsmaterialien	Bezugsquelle
Mμltiguard Filterspitzen (10 µl)	Sorenson™ Bioscience, Inc. (Murray, Utah, USA)
Nuklease-freie PCR-Reaktionsgefäße (0,2 ml)	VWR™ International (Radnor, Pennsylvania, USA)
Nunc™ Lab-Tek™ II Kammerdeckgläser (8-Well)	Thermo Fisher Scientific (Waltham, Massachusetts, USA)
Parafilm® M Verschlussfolie	Carl Roth® (Karlsruhe, Deutschland)
Pasteurpipetten aus Glas	Brand GmbH & Co. KG (Wertheim, Deutschland)
Petrischalen aus Polysterol (100/22 mm)	Greiner Bio-One GmbH (Frickenhausen, Deutschland)
Präzisionsdeckgläser, 22 x 22 mm aus Borosilikatglas	Paul Marienfeld GmbH & Co. KG (Lauda Königshofen, Deutschland)
qPCR Strip mit 8 Reaktionsgefäßen und gewölber Kappe (0,2 ml)	Axon Lab AG (Reichenbach/Stuttgart, Deutschland)
Ratiomed® Einmal-Skalpellklingen aus Carbonstahl	megro GmbH & Co. KG (Wesel, Deutschland)
RNase-freie, nicht-haftende Mikrozentrifugenröhrchen (1,5 ml)	Invitrogen™ (Carlsbad, Kalifornien, USA)
ROTILABO® Einmal-Wägeschalen	Carl Roth® (Karlsruhe, Deutschland)
Safeguard Filterspitzen (20 µl, 200 µl und 1250 µl)	Peqlab (Erlangen, Deutschland)
Safelock Reaktionsgefäße (1,5 ml und 2 ml)	Eppendorf GmbH (Hamburg, Deutschland)
Sartorius Minisart™ NML Spritzenvorsatzfilter aus Celluloseacetat (0,2 µm)	Fisher Scientific (Pittsburgh, Pennsylvania, USA)
Sterican® Einmal-Kanüle, langer Schliff, Gr. 2, G 21	Carl Roth® (Karlsruhe, Deutschland)
SuperFrost® Objektträger	Thermo Fisher Scientific (Waltham, Massachusetts, USA)
Ultrazentrifugenröhrchen aus Polycarbonat mit Aluminiumdeckel (70 ml)	Beckman Coulter GmbH (Brea, Kalifornien, USA)

3.1.13 Sonstiges

Bezeichnung	Bezugsquelle
4–15% mini-PROTEAN® TGX™ Precast Protein	Bio-Rad Laboratories Inc. (Hercules, Kalifornien, USA)
AllStars *Negative Control* siRNA (ANC)	Qiagen (Hilden, Deutschland)
AMPure XP Beads	Beckman Coulter GmbH (Brea, Kalifornien, USA)
Lipopolysaccharid von *Proteus mirabilis*	Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, USA)
Novex™ TBE-Gele (6 %)	Invitrogen™ (Carlsbad, Kalifornien, USA)
RNAClean XP Beads	Beckman Coulter GmbH (Brea, Kalifornien, USA)

3.1.14 Software und Datenbanken

Software	Entwickler bzw. zugehörige Website
BD FACSDiva™ Software v9.0.1	Becton Dickinson (Franklin Lakes, New Jersey, USA)
Bioanalyzer 2100 Expert Software vB.02.11.SI824	Agilent Technologies (Santa Clara, USA)
BioRender	https://www.biorender.com/
CASY Software v1.0.2.2	OLS® OMNI Life Science GmbH & Co. KG (Bremen, Deutschland)
DeVision G Software v2.0	Decon Science Tec GmbH (Hohengandern, Deutschland)
FlowJo™ Software v10.6.0	Becton Dickinson (Franklin Lakes, New Jersey, USA)
Gen5™ Microplate Reader and Imager Software v3.11	BioTek Instruments, Inc. (Winooski, Vermont, USA)
GeneTrail 3.2	https://genetrail.bioinf.uni-sb.de/
GraphPad Prism 8 v8.4.3	GraphPad Software, LLC (Boston, Massachusetts, USA)
Leica Application Suite X (Las X) v3.5.5.19976	Leica Microsystems (Wetzlar, Deutschland)
Mendeley Reference Manager	Elsevier (Amsterdam, Niederlande)

Software	Entwickler bzw. zugehörige Website
MGISP-960 Software v1.6.1.301	MGI Tech Co, Ltd. (Shenzhen, China)
Microsoft® Office Word, Excel und PowerPoint 2016	Microsoft Corporation (Redmond, Washington, USA)
miRBase (release 22)	https://www.mirbase.org/
NanoDrop 2000/2000c Software v1.5	Thermo Fisher Scientific (Waltham, Massachusetts, USA)
National Center for Biotechnology Information (NCBI)	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/
NTA 3.4 Software v3.4.4	Malvern Panalytical (Malvern, Worcestershire, Vereinigtes Königreich)
SonoLab™ 7.2 Software v7.2.1.0	Covaris® (Woburn, Massachusetts, USA)
SparkControl™ Software v3.2	Tecan Group AG (Männedorf, Schweiz)
Tecan i-Control™ Software v3.37	Tecan Group AG (Männedorf, Schweiz)
ZEISS SmartSEM Software v6.09	Carl Zeiss Microscopy GmbH (Oberkochen, Deutschland)
ZEN 3.0 (blue edition) Mikroskopie-Software v3.0.79.000	Carl Zeiss Microscopy GmbH (Oberkochen, Deutschland)

3.2 Methoden

3.2.1 Zell- und mikrobiologische Methoden

3.2.1.1 Kultivierung von Bakterien

In der vorliegenden Arbeit wurden drei verschiedene Bakterienstämme sowohl auf Fest- als auch in Flüssigkulturmedien angezüchtet. Die Anzucht der Bakterien sowie alle damit einhergehenden Experimente erfolgten im Helmholtz-Institut für Pharmazeutische Forschung Saarland (HIPS, Leiter des Instituts: Prof. Dr. Rolf Müller) am Campus der Universität des Saarlandes in Saarbrücken in der Abteilung von Prof. Dr. Gregor Fuhrmann und Prof. Dr. Claus-Michael Lehr.

3.2.1.1.1 Anzucht der Bakterien in flüssigen und auf festen Kulturmedien

Ausgehend von Dauerkulturen, die bei -80 °C lagerten, konnten die verschiedenen Bakterien in flüssigen und auf festen Kulturmedien angezüchtet werden. Für die Anzucht von *L. casei* wurde mit einer sterilen Impföse ein Teil der Dauerkultur mittels Drei-Ösen-Ausstrich auf einer MRS-Agarplatte ausgestrichen und für fünf Tage bei 37 °C und 5 % CO_2 bebrütet. Die bewachsene Platte konnte mit Parafilm abgedichtet und anschließend für maximal zwei Wochen bei 4 °C gelagert werden. Für die Anzucht des Bakteriums in Flüssigkulturen wurde eine Kolonie mit einer sterilen Impföse in MRS-Medium eingerührt und über Nacht bei 37 °C kultiviert. Ausgehend von der Übernachtkultur wurde anschließend die Hauptkultur mit entsprechender optischer Dichte angeimpft. Die Methode zur Bestimmung der optischen Dichte wird in Abschnitt **3.2.1.1.2** genauer beschrieben.
Die Anzucht von *E. faecalis* und *P. mirabilis* erfolgte auf BHI-Agarplatten. Von den Dauerkulturen wurden ebenfalls ein Teil der Bakterien mittels Drei-Ösen-Ausstrich auf je eine BHI-Agarplatte übertragen. Die BHI-Agarplatten mit *P. mirabilis* wurden anschließend bei 37 °C, die Agarplatten mit *E. faecalis* bei 37 °C und 5 % CO_2 bebrütet. Nach 24 h wurden die bewachsenen Platten mit Parafilm abgedichtet und für maximal zwei Wochen bei 4 °C gelagert. Zur Anzucht von *E. faecalis* oder *P. mirabilis* in Flüssigkulturen wurden je eine Kolonie in BHI-Medium eingerührt und über Nacht bei 37 °C kultiviert. Am nächsten Tag wurde die optische Dichte der Übernachtkulturen gemessen und die Hauptkulturen angesetzt.

3.2.1.1.2 Messung des Bakterienwachstums

In der vorliegenden Arbeit wurde das Wachstum der Bakterien mit Hilfe von zwei unterschiedlichen Methoden bestimmt. Die Zelldichte der bakteriellen Flüssigkulturen wurde durch die Messung der optischen Dichte (*optical density*, OD) kontrolliert. Dazu wurde in Küvetten oder einer 96-Well Zellkulturplatte ein Teil der jeweiligen Flüssigkulturen sowie das entsprechende Kulturmedium als Referenz vorgelegt und anschließend die Absorption in einem Photometer oder Plattenleser bei einer Wellenlänge von 600 nm gemessen. Die OD der Bakterienkultur entsprach dann dem jeweiligen gemessenen Wert für die Flüssigkultur abzüglich der Referenz.

Weiterhin wurde das Wachstum der Bakterien auch durch die Bestimmung der Kolonie-bildenden Einheiten (*colony forming unit*, CFU) untersucht. Dafür wurden zunächst 20 µl Bakterienkultur in mehreren Schritten jeweils 1:10 (v/v) in 0,05 % Tween® 80 verdünnt. Anschließend wurden von jeder Verdünnung dreimal 20 µl auf eine MRS oder BHI-Agarplatte getropft und diese entsprechend der unter **3.2.1.1.1** angegebenen Bedingungen für das jeweilige Bakterium bebrütet. Das Wachstum wurde in regelmäßigen Abständen überprüft und die einzelnen Kolonien in den jeweiligen Verdünnungsstufen gezählt. Die CFU/ml ließ sich dann anhand folgender Formel ermitteln.

Formel 1: Formel zur Berechnung der Kolonie-bildenden Einheiten pro Milliliter (CFU/ml).

$$\text{CFU/ml} = \frac{\text{Anzahl der Kolonien x Verdünnungsfaktor}}{\text{Ausplattiertes Volumen (ml)}}$$

3.2.1.1.3 Isolation von BEVs aus bakteriellen Kulturüberständen

Ein Ziel dieser Arbeit war es, aus den Flüssigkulturen von *L. casei*, *E. faecalis* und *P. mirabilis* BEVs zu isolieren. Es lassen sich eine Reihe von verschiedenen Methoden zur Isolation von EVs unterscheiden. Im Rahmen dieser Arbeit wurden alle BEVs durch Ultrazentrifugation isoliert.

Für die Isolation von BEVs aus den Kulturüberständen wurde ausgehend von Übernachtkulturen zunächst für jedes der drei Bakterien eine separate 250 ml-Kultur mit einer OD von 0,1 angesetzt und bei 37 °C im Brutschrank kultiviert. Nachdem die Bakterien die frühe Phase des stationären Wachstums erreicht haben, wurden die Flüssigkulturen in 50 ml Röhrchen überführt und abzentrifugiert, um die Bakterien zu pelletieren. Der klare Überstand wurde anschließend zur weiteren Entfernung von Bakterien durch eine sterile Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membran filtriert. Die gewonnenen Überstände wurden im

Folgenden unter aseptischen Bedingungen in 70 ml-Ultrazentrifugenröhrchen aus Polykarbonat überführt und die BEVs durch Ultrazentrifugation pelletiert. Die Überstände wurden anschließend vorsichtig entfernt und je drei Pellets in einem Gesamtvolumen von 500 µl 0,22 µm-filtriertem PBS resuspendiert. Die resuspendierten Pellets wurden anschließend bei -80 °C gelagert oder direkt über Größenausschlusschromatographie (siehe **3.2.2.1**) aufgereinigt. Die spezifischen Angaben hinsichtlich Kultivierungszeit, Zentrifugationsgeschwindigkeiten und weiterem sind in **Tab. 2** zusammengefasst.

Tabelle 2: Detailangaben zu den verschiedenen Bedingungen während der Isolation der BEVs aus den Kulturüberständen von *L. casei*, *E. faecalis* und *P. mirabilis*.
Angegeben sind die jeweiligen Kultivierungszeiten, die Zentrifugationsschritte, Porengröße der genutzten Filter sowie Länge und Geschwindigkeit der Ultrazentrifugation.

Bakterium	*L. casei*	*E. faecalis*	*P. mirabilis*
Kultivierungszeit	40 h	6 h	9 h
Zentrifugation	10 min, 9.500 x g, 4 °C	10 min, 3.850 x g, 4 °C	10 min, 3.850 x g, 4 °C
Porengröße Filter	0,45 µm	0,45 µm	0,22 µm
Ultrazentrifugation	2 h, 100.000 x g, 4 °C	3 h, 160.000 x g, 4 °C	2 h, 100.000 x g, 4 °C

3.2.1.1.4 Behandlung von Bakterien mit eukaryotische EVs oder humanen miRNAs zur Analyse des Wachstums

Im Rahmen dieser Arbeit sollte untersucht werden, inwiefern eukaryotische EVs oder einzelne humane miRNAs einen Einfluss auf das Wachstum von verschiedenen Bakterien ausüben. Um das Wachstum von *L. casei*, *E. faecalis* und *P. mirabilis* zu untersuchen, wurden dafür zunächst Übernachtkulturen der jeweiligen Bakterien in ihrem entsprechenden Kulturmedium angesetzt. Am nächsten Tag wurde die OD gemessen und in einer 96-Well Zellkulturplatte 100 µl der verdünnten Übernachtkultur (OD = 0,01) vorlegt. Um den Einfluss von eukaryotischen EVs auf das Bakterienwachstum zu untersuchen, wurden die Bakterien im Folgenden mit 100 µl EVs in unterschiedlichen Konzentrationen oder PBS als Kontrolle gemischt. Um den Effekt der synthetischen miR-192-5p auf das Wachstum der Bakterien zu untersuchen, wurden diese mit 0,5 µM, 2 µM oder 4 µM synthetischer miR-192-5p in PBS in einem Gesamtvolumen von 150 µl gemischt. Als Kontrolle dienten Bakterien, die mit dem gleichen Volumen 1 x siMAX Universal Buffer (6 µl), in welchem die synthetische miRNA gelöst

war, inkubiert wurden. Die 96-Well Zellkulturplatte wurde anschließend bei 37 °C kultviert und die OD in regelmäßigen Abständen durch Messung der Absorption bei einer Wellenlänge von 600 nm dokumentiert.

3.2.1.1.5 Behandlung von Bakterien mit humanen miRNAs zur Analyse der Viabilität

Neben dem Wachstum wurde auch die Viabilität der Bakterien nach Behandlung mit der synthetischen miR-192-5p untersucht. Dafür wurde im Rahmen dieser Arbeit das LIVE/DEAD™ BacLight™ Bacterial Viability Kit (Invitrogen™) genutzt. Das Prinzip dieser Methode basiert auf der unterschiedlichen Membranpermeabilität von toten und lebenden Bakterien für verschiedene Fluoreszenzfarbstoffe. Das SYTO™ 9 ist dabei in der Lage, sowohl tote als auch lebende Bakterien anzufärben, wohingegen Propidiumiodid (PI) lediglich in Bakterien mit geschädigter Membran eindringen kann. Durch die Nutzung beider Fluoreszenzfarbstoffe lässt sich auf diese Weise gleichzeitig der prozentuale Anteil toter als auch lebender Bakterien in einer Suspension ermitteln (Boulos et al., 1999).
Die Viabilität der Bakterien wurde in zwei unterschiedlichen Bedingungen untersucht. Zum einen wurden die Bakterien wie in **3.2.1.1.4** beschrieben mit 4 µM synthetischer miR-192-5p oder 1 x siMAX Universal Buffer in PBS in einem Gesamtvolumen von 150 µl inkubiert. Zum anderen sollte auch untersucht werden, inwiefern eine Verpackung der synthetischen miR-192-5p in Liposomen vor Inkubation mit den Bakterien einen Einfluss auf deren Viabilität ausübt. Dafür wurde das Lipofectamine™ 3000 Transfektionsreagenz der Firma Invitrogen™ genutzt. Im Rahmen dieses Versuches wurde das Transfektionsreagenz genutzt, um die Verpackung der miR-192-5p in EVs zu simulieren. Zu Beginn wurde dafür wie bereits beschrieben Übernachtkulturen der verschiedenen Bakterien mit dem jeweiligen Kulturmedium auf eine OD von 0,01 verdünnt und 100 µl pro Well in eine 96-Well Zellkulturplatte vorgelegt. Anschließend wurde der Transfektionsmix angesetzt. Dafür wurden im Folgenden in einem Reaktionsgefäß 7,5 µl Lipofectamine™ 3000 in 17,5 µl DMEM ohne Zusätze verdünnt. In einem weiteren Reaktionsgefäß wurden dann 4 µM synthetische miR-192-5p mit 15 µl DMEM ohne Zusätze und 5 µl P3000™ Verstärkerreagenz verdünnt. Anschließend wurden jeweils 25 µl von beiden Verdünnungen in einem Reaktionsgefäß vermischt und für 15 min bei Raumtemperatur zur Ausbildung der Liposomenkomplexe inkubiert. Der gesamte Transfektionsansatz (50 µl) wurde anschließend vorsichtig zu den 100 µl Bakteriensuspension gegeben und diese dann bei 37 °C inkubiert. Zur Überprüfung von eventuellen toxischen Effekten des Transfektionsreagenzes wurden die Bakterien zusätzlich entweder mit 6 µl 1 x siMAX Universal Buffer in Kombination mit den Liposomen oder 8 µg in

Liposomen verpackter Polyadenylsäure, kurz Poly(A), inkubiert wurden. Das eingesetzte Volumen bzw. die Menge entsprach jeweils den Bedingungen der Versuchsansätze mit der synthetischen miRNA. Als Kontrolle diente in diesem Versuch DMEM ohne Zusätze, welches für die Präparation der Liposomenkomplexe genutzt wurde. Nach Ende der Inkubationszeit wurde entsprechend den Herstellerangaben des LIVE/DEAD™ BacLight™ Bacterial Viability Kit zunächst Bakteriensuspensionen mit unterschiedlichen Verhältnissen lebender und toter Bakterien vorbereitet. Diese dienten als Referenz zur Bestimmung der prozentualen Anteile lebender Bakterien in den zu untersuchenden Proben. Zur Herstellung einer Suspension mit abgetöteten Bakterien wurde ein Teil der Bakterien, welche als Kontrollen mit PBS oder DMEM behandelt wurden, für 30 min auf 95 °C erhitzt. Anschließend wurden die Bakterien für 5 min bei 7.000 x g pelletiert, in 200 µl PBS resuspendiert und entsprechend der Angaben der Hersteller durch Zugabe von 0,6 µl SYTO™ 9/PI (1:1, v/v) für 15 min bei Raumtemperatur im Dunkeln angefärbt. Danach wurden die gefärbten Bakterien in eine schwarze 96-Well Mikrotiterplatte überführt und die Fluoreszenz von SYTO™ 9 (λEx/λEm 485/530 nm) und PI (λEx/λEm 485/630 nm) gemessen. Die Fluoreszenzintensitäten von SYTO™ 9 und PI konnten anschließend genutzt werden, um auf Basis der Referenzwerte den prozentualen Anteil lebender Bakterien in den zu untersuchenden Proben zu ermitteln. Dafür wurde die folgende, durch Ou et al. (2019) modifizierte Formel genutzt.

Formel 2: Formel zur Berechnung des prozentualen Anteils lebender Bakterien (Ou et al., 2019).

$$\%\ \text{lebende Bakterien} = \frac{\left(100 \times \frac{\text{SYTO™ 9}}{\text{PI}}\right)}{\left(1 + \frac{\text{SYTO™ 9}}{\text{PI}}\right)}$$

3.2.1.2 Kultivierung von eukaryotischen Zellen

Im Rahmen dieser Arbeit wurde als humane Modellzelllinie Caco-2 HTB-37™, im Folgenden lediglich als Caco-2 bezeichnet, der Firma ATCC® verwendet. Die Kultivierung der eukaryotischen Zellen sowie alle Experimente mit den Zellen fanden ebenfalls im HIPS am Campus der Universität des Saarlandes in Saarbrücken statt.

3.2.1.2.1 Subkultivierung von eukaryotischen Zellen

Die Caco-2 Zellen wurden in Zellkulturflaschen (75 cm^2) bei 37 °C und 5 % CO_2 in einem Brutschrank kultiviert. Das Kulturmedium (DMEM + 10 % FCS + 1 % NEAA) wurde alle zwei bis drei Tage gewechselt. Für die Stammhaltung wurden die Zellen wöchentlich passagiert. Dafür wurde zunächst das verbrauchte Zellkulturmedium entfernt und die Zellen zweimal mit 10 ml PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit 3 ml 0,05 % Trypsin-EDTA für etwa 5 min bei 37 °C und 5 % CO_2 vom Boden der Zellkulturflasche abgelöst. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 7 ml Zellkulturmedium abgestoppt. Als nächstes wurde die Zellsuspension in ein 15 ml Röhrchen überführt und die Zellen für 4 min bei 300 x g pelletiert. Der Überstand wurde entfernt und die Caco-2 Zellen in 10 ml frischem Zellkulturmedium resuspendiert. Die Zellzahl wurde im Anschluss mit Hilfe des Zellzählers CASY bestimmt (siehe **3.2.1.2.2**). Von dieser Zellsuspension wurde anschließend zwischen 0,5 x 10^6 und 1 x 10^6 Caco-2 Zellen in eine neue Zellkulturflasche mit 13 ml Zellkulturmedium überführt und im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO_2 kultiviert. Alle Experimente wurden mit Caco-2 Zellen in Passage 19 ± 5 durchgeführt.

3.2.1.2.2 Bestimmung von eukaryotischen Zellzahlen

Für die Bestimmung der eukaryotischen Zellzahl wurde der Zellzähler CASY der Firma OLS® OMNI Life Science genutzt. Das Prinzip des Geräts beruht auf der elektrischen Erfassung von Zellen, wenn diese eine sogenannte Messpore passieren. Passiert eine Zelle mit intakter Zellmembran die Messpore, kommt es zum Ausschluss des elektrischen Stroms, wodurch ein Signal generiert wird. Das Signal ist wiederum abhängig von der Größe der Zellen. Eine Zelle mit einer beschädigten Membran ist nicht dazu in der Lage, den Strom auszuschließen. Auf diese Weise können simultan lebende als auch tote Zellen erfasst werden, ohne dass ein Anfärben der Zellen nötig ist. Für die Bestimmung der Caco-2 Zellzahl wurden 100 µl Zellsuspension in 10 ml CASYton pipettiert und durch langsames Invertieren gemischt. Von dieser Lösung wurden anschließend dreimal 400 µl für die Messung in einer Kapillare mit

einem Durchmesser von 150 µm eingesetzt. Nach der Messung wurde von dem Gerät die Gesamt-Zellzahl, die Viabilität, die Anzahl der lebenden sowie toten Zellen und die Aggregation der Zellen berechnet. Ausgehend von der Lebendzellzahl wurde anschließend das Volumen errechnet, welches von der ursprünglichen Zellsuspension eingesetzt werden musste, um die gewünschte Zellzahl zu erhalten.

3.2.1.2.3 Isolation von EVs aus eukaryotischen Zellkulturüberständen

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden neben bakteriellen auch EVs aus eukaryotischen Zellkulturüberständen isoliert. Diese wurden unter verschiedenen Bedingungen gewonnen, sodass im Folgenden zwischen drei verschiedenen Ursprüngen für die eukaryotischen EVs unterschieden wird. Es werden zwischen EVs aus konditioniertem Medium mit Zusätzen (1; Caco-2 (+FCS) EVs), EVs aus konditioniertem Medium ohne Zusätze (2; Caco-2 (-FCS) EVs), sowie EVs aus unkonditioniertem Medium mit Zusätzen (3; DMEM (+FCS) EVs) unterschieden.

Für die Gewinnung von Zellkulturüberstanden zur Isolation von EVs aus konditioniertem Medium mit Zusätzen (1) wurden die Caco-2 Zellen in Zellkulturflaschen (75 cm²) ausgesät und das Medium regelmäßig gewechselt, bis die Zellen eine Konfluenz von etwa 90 % erreichten. Anschließend wurde das Zellkulturmedium (etwa 13 ml), welches seit ca. 72 h auf den Zellen war, abgenommen, in ein 15 ml Röhrchen überführt und für 4 min bei 300 x g abzentrifugiert, um die Zellen zu pelletieren. Der klare Überstand (ca. 11 bis 12 ml) wurde anschließend vorsichtig in ein neues 15 ml Röhrchen überführt und konnte dann bis zur weiteren Bearbeitung bei -80 °C gelagert werden. Für die Isolation von EVs aus konditioniertem Medium ohne Zusätze (2) wurden die Caco-2 Zellen wie zuvor beschrieben bis zu einer Konfluenz von etwa 90 % unter normalen Bedingungen kultiviert. Anschließend wurde das Zellkulturmedium abgenommen. Die Zellen wurden einmal mit 10 ml PBS gewaschen, bevor 13 ml DMEM ohne Zusätze auf die Zellen gegeben und diese für weitere 24 h bei 37 °C und 5 % CO_2 im Brutschrank kultiviert wurden. Am nächsten Tag wurde der Zellkulturüberstand wie oben beschrieben gesammelt, einmal abzentrifugiert und bei -80 °C gelagert. Anschließend wurden nochmals 13 ml DMEM ohne Zusätze zu den Caco-2 Zellen gegeben und ein weiteres Mal nach 24 h die Zellkulturüberstände gesammelt, bevor die Zellen dann verworfen wurden. Für die Isolation von EVs aus unkonditioniertem Medium mit Zusätzen (3) konnte das DMEM direkt nach der Zugabe von 10 % FCS und 1 % NEAA genutzt werden. Es handelte sich dabei um Medium, welches nicht mit den Caco-2 Zellen in Kontakt gekommen ist. Daher wurde auf den ersten Zentrifugationsschritt zum Pelletieren von Zellen verzichtet. Die weiteren beschriebenen Schritte wurden für die Medien aus allen drei Bedingungen

identisch durchgeführt. Alle Medien wurden im Folgenden nochmals für 20 min bei 3.000 x g und 4 °C abzentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand vorsichtig in Ultrazentrifugenröhrchen aus Polykarbonat mit einem Fassungsvolumen von 70 ml überführt und die EVs bei 100.000 x g und 4 °C für 2 h pelletiert. Je drei Pellets wurden dann in Abhängigkeit vom Verwendungszweck in einem Gesamtvolumen von 200 µl oder 400 µl 0,22 µm-filtriertem PBS resuspendiert. Die Pellets wurden anschließend bei -80 °C gelagert oder über Größenausschlusschromatographie (siehe **3.2.2.1**) weiter aufgereinigt.

3.2.1.2.4 Behandlung von eukaryotischen Zellen mit BEVs zur Analyse des Transkriptoms

In dieser Arbeit wurden die Caco-2 Zellen zur Beantwortung von verschiedenen Fragestellungen mit den BEVs behandelt. Zur Untersuchung von potenziellen Veränderungen in der Genexpression der Caco-2 Zellen nach Inkubation mit den BEVs unterschiedlichen Ursprungs wurden die Zellen zunächst mit einer Dichte von 1,2 x 10^5 Zellen pro Well in eine 48-Well Zellkulturplatte ausgesät und über Nacht bei 37 °C und 5 % CO_2 kultiviert. Am nächsten Tag wurde das Medium entfernt, 100 µl der zuvor isolierten und aufgereinigten BEVs mit 400 µl frischem Zellkulturmedium verdünnt auf die Zellen gegeben und diese wiederum bei 37 °C und 5 % CO_2 für unterschiedliche Zeiträume kultiviert. In **Tab. 3** sind die Konzentrationen der unterschiedlichen BEVs sowie die entsprechenden Inkubationszeiten angegeben.

Tabelle 3: Behandlungsbedingungen der Caco-2 Zellen mit BEVs.

Bakterium	BEVs/Well	BEVs/Zelle	Inkubationszeit
L. casei	1,5 x 10^{11}	9,40 x 10^5	10 h, 24 h und 48 h
E. faecalis	7,5 x 10^9	4,70 x 10^4	10 h und 24 h
P. mirabilis	6,0 x 10^9	3,75 x 10^4	10 h und 24 h

Als Kontrollen dienten im Rahmen dieses Versuches PBS, welches zum Verdünnen der BEVs genutzt wurde, sowie Lipopolysaccharid (LPS) von *P. mirabilis* in einer Konzentration von 0,2 ng/ml. Beides wurde ebenfalls vor Zugabe zu den Zellen 1:5 (v/v) mit frischem Zellkulturmedium verdünnt. Nach Ende der jeweiligen Inkubationszeit wurde das Medium entfernt, die Zellen einmal mit 500 µl PBS gewaschen und durch Zugabe von 700 µl Qiazol Lyse Reagenz (Qiagen) vom Boden der Zellkulturplatte abgelöst. Die abgelösten Caco-2 Zellen wurden anschließend in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt und bis zur RNA-Isolation bei -80 °C gelagert.

3.2.1.2.5 Chemische Transfektion von eukaryotischen Zellen mit BEV-RNA zur Analyse des Transkriptoms

Durch Transfektion lässt sich genetisches Material in eukaryotische Zellen einbringen. Es kann zwischen physikalischen, viralen und chemischen Methoden zur Transfektion unterschieden werden (T. K. Kim & Eberwine, 2010). Eine Art der chemischen Transfektion stellt die Lipofektion dar. Bei der Lipofektion wird genetisches Material über Liposomen in die Empfängerzelle eingeschleust. Die DNA oder RNA, welche auf diesem Weg in die Zellen transfiziert wird, kann nach Endozytose der Liposomen und Fusion mit der Endosomenmembran in die Zelle freigesetzt werden (Felgner et al., 1987; Malone et al., 1989; Y. Xu & Szoka, 1996).

In dieser Arbeit wurden die Caco-2 Zellen mit RNA aus BEVs zur Untersuchung einer Reihe von unterschiedlichen Fragestellungen transfiziert. Für die Transfektion selbst wurde das Lipofectamine™ 3000 Transfektionsreagenz der Firma Invitrogen™ verwendet. Der folgende Abschnitt fokussiert sich auf die Untersuchung des Effekts der BEV-RNA auf die Genexpression der Caco-2 Zellen. Dafür wurden die Zellen zunächst mit einer Dichte von 1,2 x 10^5 Zellen pro Well in eine 48-Well Zellkulturplatten ausgesät und über Nacht bei 37 °C und 5 % CO_2 kultiviert. Am folgenden Tag wurde das Medium entfernt und 475 µl frisches Zellkulturmedium auf die Zellen gegeben. Anschließend wurden die verschiedenen Transfektionsansätze vorbereitet. Dafür wurde entsprechend der Herstellerangaben zunächst das Lipofectamine™ 3000 und die zu transfizierende BEV-RNA in DMEM ohne Zusätze verdünnt. Weiterhin wurde zu der verdünnten BEV-RNA das P3000™ Verstärkerreagenz hinzugegeben, danach im Verhältnis 1:1 (v/v) mit dem verdünnten Lipofectamine™ 3000 gemischt und für 15 min Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die gesamten 25 µl Transfektionsansatz vorsichtig auf die Caco-2 Zellen gegeben und diese wiederum für die jeweiligen Zeiträume bei 37 °C und 5 % CO_2 kultiviert. Die Zusammensetzung der verschiedenen Transfektionsansätze kann **Tab. 4** entnommen werden.

Tabelle 4: Transfektionsbedingungen von Caco-2 Zellen mit BEV-RNA.

Bakterium	BEV-RNA (ng)	Lipofectamine™ 3000 (µl)	P3000™ (µl)	Inkubationszeit
L. casei	100	0,75	0,5	10 h, 24 h und 48 h
E. faecalis	5			10 h und 24 h
P. mirabilis	2			10 h und 24 h

Zusätzlich zu den angegebenen Ansätzen wurden weitere Kontrollen in jedem Versuch mitgeführt. Diese beinhalteten die AllStars *Negative Control* siRNA (ANC) zu 100 ng, 5 ng oder 2 ng, der Transfektionsmix ohne RNA, sondern lediglich mit Nuklease-freiem Wasser (Vehicle) sowie LPS von *P. mirabilis* in einer Konzentration von 1 ng/ml. Vom Nuklease-freien Wasser und LPS wurden jeweils 5 µl eingesetzt. Nach Ende der Inkubationszeit wurde das Medium, wie bereits in **3.2.1.2.4** beschrieben entfernt, die Zellen einmal mit 500 µl PBS gewaschen und durch Zugabe von 700 µl Qiazol Lyse Reagenz (Qiagen) vom Boden der Zellkulturplatte abgelöst. Die abgelösten Caco-2 Zellen wurden wiederum in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt und bis zur weiteren Bearbeitung bei -80 °C gelagert.

3.2.1.2.6 Viabilitäts- und Zytotoxizitätsassay

Um den generellen Effekt der Behandlung der Caco-2 Zellen mit den BEVs sowie der Transfektion mit der BEV-RNA zu analysieren und Aussagen zu maximalen Behandlungszeiträumen und -konzentrationen treffen zu können, wurde auch die Viabilität der Caco-2 Zellen untersucht. In dieser Arbeit wurde dafür der Lactatdehydrogenase Assay und der PrestoBlue™ Assay genutzt.

Zur Analyse von zytotoxischen Effekten wurde die Aktivität des Enzyms Laktatdehydrogenase (LDH) im Zellkulturüberstand gemessen. Dieses Enzym befindet sich normalerweise im Zytoplasma, kann jedoch nach der Schädigung der Zelle in das Zellkulturmedium freigesetzt werden (Kumar et al., 2018). Demzufolge kann durch die Messung der LDH-Aktivität im Zellkulturüberstand z. B. nach Behandlung mit einer zu untersuchenden Substanz darauf geschlossen werden, ob diese Substanz zu Nekrose, Apoptose oder einer anderen Form der Schädigung der Zelle geführt hat (Kumar et al., 2018). Der PrestoBlue™ Assay hingegen wird zur Untersuchung der Zellviabilität genutzt. Er basiert auf der Reduktionskraft von lebenden Zellen und dient der Messung der Zellproliferation. Da für den LDH Assay der Zellkulturüberstand und für den PrestoBlue™ Assay die Zellen selbst benötigt wurden, war es möglich, mit nur einem Ansatz beide Assays durchzuführen. Dafür wurden die Caco-2 Zellen zunächst mit einer Dichte von 7,5 x 10^4 Zellen pro Well in eine 96-Well Zellkulturplatte ausgesät und über Nacht bei 37 °C und 5 % CO_2 kultiviert. Am nächsten Tag wurden das Medium entfernt und die Zellen entsprechend der jeweiligen Untersuchung behandelt. Für die Analyse des Effekts der BEVs auf die Caco-2 Zellen wurden 100 µl frisches DMEM ohne Zusätze sowie 100 µl BEVs in unterschiedlichen Konzentrationen zu den Zellen gegeben. Um die Viabilität der Zellen nach Transfektion mit BEV-RNA zu untersuchen, wurden hingegen 175 µl frisches DMEM ohne Zusätze sowie 25 µl Transfektionsansatz zu den Zellen gegeben.

Die Transfektionsbedingungen entsprachen den in **Tab. 4** angegebenen Mengen und Volumina. Die Kontrollen wurden wie bereits in **3.2.1.2.4** und **3.2.1.2.5** beschrieben angesetzt. Als Totkontrolle dienten Caco-2 Zellen, die mit 1 % Triton X-100 behandelt wurden. Anschließend wurden die Zellen für weitere 24 h im Falle von *E. faecalis* MVs oder MV-RNA und *P. mirabilis* OMVs, OMV-RNA oder LPS oder 48 h bei *L. casei* MVs, MV-RNA oder ANC bei 37 °C und 5 % CO_2 kultiviert.

Nach Ende der Inkubationszeit wurden die verschiedenen Assays durchgeführt. Für den LDH Assay wurde das Cytotoxicity Detection Kit der Firma Roche genutzt. Entsprechend der Herstellerangaben wurden dafür 100 µl vom Zellkulturüberstand in eine neue 96-Well Zellkulturplatte überführt. Anschließend wurde dieser mit 100 µl der zuvor vorbereiteten Arbeitslösung, bestehend aus einem Katalysator und einer Farbstofflösung im Mischverhältnis 1:45 (v/v), für 5 min bei Raumtemperatur (RT) inkubiert und nachfolgend die Absorption bei 490 nm mit einem Plattenleser gemessen. Für den PrestoBlue™ Assay wurde zunächst das PrestoBlue™ Reagenz 1:10 (v/v) mit DMEM ohne Zusätze verdünnt. Anschließend wurde dann das restliche Medium von den Zellen entfernt, die Caco-2 Zellen vorsichtig mit 100 µl des verdünnten PrestoBlue™ Reagenz bedeckt und für 20 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde die Fluoreszenz (λEx/λEm 560/590 nm) gemessen.

3.2.2 Proteinbiochemische Methoden

3.2.2.1 Größenausschlusschromatographie

Die Größenausschlusschromatographie, kurz SEC für *Size-Exclusion Chromatography*, wird genutzt, um Moleküle in einer Lösung anhand ihrer Größe oder ihres Molekulargewichts aufzutrennen (Burgess, 2018). Die Methode wurde erstmals 1956 von Lathe und Ruthven beschrieben und in den darauffolgenden Jahren von verschiedenen Gruppen weiterentwickelt (Lathe & Ruthven, 1956; Moore, 1964; Porath & Flodin, 1959). In der Chromatographiesäule befindet sich ein feines, poröses Material aus z. B. Dextran, Agar, Agarose oder Polyacrylamid (Hjertén, 1964; Hjertén & Mosbach, 1962; Polson, 1961; Porath & Flodin, 1959). Das Prinzip besteht darin, dass kleine Moleküle in der Lage sind in die Poren des Säulenmaterials einzudringen, wodurch es zur Verlangsamung der Wanderung durch die Chromatographiesäule kommt. Große Moleküle sind nicht dazu in der Lage, in die Poren einzudringen und wandern daher schneller durch die Säule. Auf diese Weise kommt es zur Auftrennung der verschiedenen Moleküle in einer Lösung, die anschließend zeitversetzt aus der Säule eluieren (Burgess, 2018).

Für die Aufreinigung der bakteriellen als auch eukaryotischen EVs wurden Chromatographiesäulen genutzt, die mit etwa 40 ml Sepharose™ CL-2B (GE Healthcare) als Säulenmaterial gefüllt waren. Alle Schritte wurden unter aseptischen Bedingungen durchgeführt und für die unterschiedlichen EVs wurden jeweils separate Säulen genutzt, um Kreuzkontaminationen zu vermeiden. Vor der Aufreinigung der bakteriellen und eukaryotischen EVs wurde die entsprechende Säule zunächst mit 1,5 Volumen (ca. 60 ml) 0,22 µm-steril filtriertem PBS äquilibriert. Das aufzureinigende EV-Pellet (400 - 500 µl) wurde anschließend vorsichtig auf das Säulenmaterial pipettiert und gewartet, bis es in diese in die Sepharose eingedrungen war. Anschließend wurde nochmals das gleiche Volumen 0,22 µm-steril filtriertes PBS auf die Sepharose pipettiert. Wenn das PBS zur Hälfte in das Säulenmaterial eingedrungen war, wurde die Säule mit 1,5 Volumen 0,22 µm-steril filtriertem PBS aufgefüllt. Der Durchfluss aus der Chromatographiesäule wurde anschließend in 1,5 ml Reaktionsgefäßen zu je 1 ml aufgefangen. 1 ml aufgefangener Durchfluss entspricht im Folgenden einer Fraktion. Dies bedeutet, dass z. B. Fraktion 5 den fünften aufgefangenen Milliliter Durchfluss aus der Säule darstellt. Nachdem das gesamte PBS aus dem Reservoir durch die Säule gelaufen war, konnte das nächste EV-Pellet zur Aufreinigung auf die Säulenmatrix aufgetragen werden. Die aufgefangenen Fraktionen konnten bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert werden. Nach der letzten Aufreinigung wurde die Sepharose mit 1,5 Volumen 20 % Ethanol gewaschen und konnte bis zur nächsten Nutzung gelagert werden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die SEC genutzt, um die bakteriellen und eukaryotischen EVs sowie die freien Proteine, welche ebenfalls während der Ultrazentrifugation pelletiert sind, voneinander zu trennen. Weiterhin diente die SEC auch dem Entfernen von ungebundenen Fluoreszenzfarbstoffen nach dem Anfärben der bakteriellen und eukaryotischen EVs.

3.2.2.2 Isolation von Proteinen aus eukaryotischen Zellen

Zur Isolation von Proteinen aus Caco-2 Zellen wurden diese zunächst wie in **3.2.1.2.1** beschrieben vom Boden der Zellkulturflasche abgelöst und gezählt. Dreimal 2,0 x 10^6 Zellen wurden dann in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt, durch Zentrifugation bei 300 x g für 4 min pelletiert und zweimal mit 500 µl PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in 100 µl RIPA-Puffer mit Proteaseinhibitor resuspendiert zehnmal 2 Sekunden mit je 10 Sekunden Unterbrechung mit Ultraschall (10 %) aufgeschlossen und danach über Nacht bei 4 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Proben für 10 min bei 12.000 x g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand aller drei Ansätze wurde dann in einem neuen Reaktionsgefäß vereinigt. Die Konzentration der Proteine konnte anschließend mittels BCA Assay (siehe **3.2.2.3**) ermittelt werden. Die Proteine wurden danach bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

3.2.2.3 Bestimmung von Proteinkonzentrationen

Die Proteinkonzentration einer Lösung lässt sich mit verschiedenen Methoden bestimmen. Eine Methode ist der sogenannte Bicinchoninsäure-Assay, der erstmals 1985 von Smith et al. als Erweiterung des Lowry-Tests beschrieben wurde. Das Verfahren beruht auf der Reduktion von Cu^{2+} zu Cu^{1+} in Anwesenheit von Proteinen, wobei Cu^{1+} anschließend dazu in der Lage ist, mit Bicinchoninsäure (*Bicinchoninic acid*, BCA) zu reagieren. Dadurch kommt es zu einem Farbumschlag der Lösung, welcher durch Messung der Absorption bei einer Wellenlänge von 562 nm detektiert werden kann. Damit dient der Assay der quantitativen Bestimmung der Proteinkonzentration einer Lösung (P. K. Smith et al., 1985). Für die Durchführung des BCA Assays wurde das QuantiPro™ BCA Assay Kit der Firma Sigma-Aldrich nach Angaben der Hersteller verwendet. Dafür wurden zunächst 100 µl der zu untersuchenden Proben in eine 96-Well Mikrotiterplatte vorgelegt, mit 100 µl einer BCA/$CuSO_4$-Lösung für 1 h bei 60 °C inkubiert und dann die Absorption bei 562 nm gemessen. Um im Anschluss die Proteinkonzentration ermitteln zu können, wurde auf jeder Platte eine Verdünnungsreihe des Protein-Standards (1 mg/ml BSA) mitgeführt.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde der BCA Assay zur Untersuchung von verschiedenen Aspekten verwendet. Zum einen konnte die erfolgreiche Trennung von EVs und freien Proteinen nach der SEC untersucht als auch die Proteinkonzentration der EVs bestimmt werden. Außerdem wurde der Assay auch für die Bestimmung der Konzentration der aus den Caco-2 Zellen isolierten Proteine eingesetzt.

3.2.2.4 *Sodium Dodecyl Sulfate*-Polyacrylamidgelelektrophorese

Die *Sodium Dodecyl Sulfate*-Polyacrylamidgelektrophorese (SDS-PAGE) ist eine Methode zur gelelektrophoretischen Auftrennung von Proteinen entsprechend ihres Molekulargewichts. Dem SDS kommt dabei eine besondere Bedeutung zu, da es dazu in der Lage ist, die Eigenladung der Proteine zu überdecken, sodass diese aufgrund ihrer Größe und nicht ihrer Ladung in das Polyacrylamidgel einwandern. In Kombination mit denaturierenden Bedingungen unterstützt das SDS zudem die Dissoziation der Proteinuntereinheiten (Gallagher, 2006; Laemmli, 1970).

Für die SDS-PAGE wurden 15 µg Protein aus den Caco-2 Zellen sowie jeweils 30 µl EV-Fraktionen von Caco-2 (-FCS) EVs, Caco-2 (+FCS) EVs oder DMEM (+FCS) EVs mit der jeweils höchsten Protein- und Partikelkonzentration verwendet. Die EV-Proben wurden mit 20 µl und die Proteinextrakte aus den Caco-2 Zellen 1:1 (v/v) mit 2x Sample Buffer gemischt, dreimal für 3 Sekunden mittels Ultraschall (40 %) aufgeschlossen, für 5 min auf Eis und danach für weitere 10 min bei 99 °C inkubiert. Anschließend wurden die Proben für 10 min bei 14.000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand konnte dann für die SDS-PAGE verwendet werden. Der Aufschluss der Proteinextrakte aus den Caco-2 Zellen wurde trotz des in **3.2.2.2** beschriebenen, bereits erfolgten Aufschlusses nochmals durchgeführt, um eine gleiche Behandlung der Proben vor der SDS-PAGE sicherzustellen. Zur Auftrennung der Proteine wurden im Rahmen dieser Arbeit die Gradienten-Polyacrylamidgele (4–15%) mini-PROTEAN® TGX™ Precast Protein (Bio-Rad) verwendet. Die Auftrennung selbst erfolgte in einer mit 1x SDS-Laufpuffer befüllten Gelelektrophoresekammer für zunächst etwa 30 min bei 12 mA und anschließend für nochmals ca. 40 min bei 25 mA. Als Größenstandard diente der Precision Plus Protein™ Dual Color Standard (Bio-Rad).

3.2.2.5 Western Blot

Der Western Blot beschreibt eine Methode zum Transfer von zuvor elektrophoretisch aufgetrennten Proteinen auf einer Membran sowie ihrem anschließenden spezifischen Nachweis (Burnette, 1981; Towbin et al., 1979). Die im Rahmen dieser Arbeit zuvor mittels SDS-PAGE (siehe **3.2.2.4**) aufgetrennten Proteine wurden dafür im Anschluss auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Wie auch bei der SDS-PAGE erfolgt der Transfer der Proteine durch das Anlegen einer elektrischen Spannung. Für den Transfer wurde zunächst die Gelkassette des Western Blots in einer mit 1x Transferpuffer befüllten Wanne in dieser Reihenfolge vorbereitet: ein Schwammtuch, zwei Whatman® Filterpapiere, das Polyacrylamidgel, die Nitrozellulosemembran, zwei Whatman® Filterpapiere und ein Schwammtuch. Anschließend wurde die Gelkassette in eine mit 1x Transferpuffer befüllte Tankblot-Kammer eingesetzt, wobei das Polyacrylamidgel in Richtung Kathode und die Nitrozellulosemembran in Richtung Anode positioniert war. Der Transfer der Proteine, bei dem die durch das SDS negativ geladenen Proteine in Richtung Anode gezogen und somit auf die Nitrozellulosemembran übertragen werden, erfolgte bei einer Stromstärke von 400 mA für etwa 2 h. Zur Überprüfung des Proteintransfers wurde die Membran danach für 5 min in PonceauS™ gefärbt und dann mit A. dest abgespült. Zur Blockierung von unspezifischen Bindestellen wurde die Membran im Anschluss mit Blockingpuffer bestehend aus 5 % BSA in 1x TBST für 30 min unter Schütteln inkubiert. Anschließend wurden die Membran in ein 50 ml Röhrchen überführt und mit 10 ml des 1:800 (v/v) in Blockingpuffer verdünnten Primärantikörpers über Nacht bei 4 °C ebenfalls unter Schütteln inkubiert. Am folgenden Tag wurde die Membran dreimal für 15 min in 1x TBST unter Schütteln gewaschen und anschließend mit dem Meerrettichperoxidase (*Horseradish* peroxidas, HRP)-gekoppelten Sekundärantikörper, welcher zuvor 1:4.000 (v/v) in Blockingpuffer verdünnt wurde, für 1 h bei 4 °C unter Schütteln inkubiert. Um den ungebundenen Sekundärantikörper zu entfernen wurden, wurde die Membran danach nochmals dreimal für 15 min mit 1x TBST gewaschen. Im Anschluss erfolgte die Detektion der Antikörper-gebundenen Proteine. Dafür wurde das SignalFire™ Elite ECL Reagenz der Firma Cell Signaling Technology® verwendet. Entsprechend der Angaben der Hersteller wurde die Membran dafür zusammen mit dem ECL (*Enhanced chemiluminescence*) Reagenz inkubiert. Dabei kommt es zur Reaktion von Wasserstoffperoxid (H_2O_2) mit Luminol, welches durch die Meerrettichperoxidase katalysiert wird. Die dadurch freigesetzte Chemilumineszenz konnte im Anschluss mit dem ChemiDoc™ Touch Imaging System dokumentiert werden.

3.2.2.6 Bestimmung der Endotoxinkonzentration

Lipopolysaccharide (LPS), umgangssprachlich auch als Endotoxine bezeichnet, sind Bestandteile der äußeren Membran von Gram-negativen Bakterien, die von spezifischen Rezeptoren auf der eukaryotischen Zellmembran erkannt werden und so inflammatorische Reaktionen in den Zellen auslösen können (Heumann & Roger, 2002). Da in dieser Arbeit der Effekt von OMVs bzw. OMV-RNA des Gram-negativen Bakteriums *P. mirabilis* auf die Genexpression von Caco-2 Zellen untersucht wurde, sollte ebenfalls die Endotoxinkonzentration in diesen Proben bestimmt werden. Dies diente der darauffolgenden Auswahl von entsprechenden Konzentrationen, welche als Kontrollen in den jeweiligen Untersuchungen eingesetzt werden sollten. Zum Nachweis von Endotoxin in den jeweiligen Proben wurde das Pierce™ Chromogenic Endotoxin Quant Kit der Firma Thermo Scientific™ nach Angaben der Hersteller genutzt. Dieses basiert auf Grundlage der Limulus-Amöbozyten-Lysat (LAL)-Methode (Levin & Bang, 1964; Young et al., 1972). Während der Durchführung des Assays wird die zu untersuchende Probe zunächst mit LAL verdünnt. Ist in einer Probe LPS vorhanden, so kommt es zur Aktivierung der proteolytischen Aktivität des Proenzym Faktor C im LAL (Nakamura et al., 1986). Die Aktivität von Faktor C kann in einem zweiten Schritt durch Zugabe eines synthetischen Peptidsubstrates ermittelt werden. Dieses setzt nach der Proteolyse p-Nitroanilin (pNA) frei und erzeugt eine gelbe Färbung (Iwanaga et al., 1978; Nachum & Berzofsky, 1985), die bei einer Wellenlänge von 405 nm gemessen werden kann.
Für die Messung der Endotoxinkonzentration in den *P. mirabilis* OMVs wurden 50 µl der aufgereinigten OMVs mit der höchsten Protein- und Partikelkonzentration genutzt. Von der OMV-RNA wurde aufgrund des geringen Probenvolumens 1 µl eingesetzt und auf 50 µl mit Endotoxin-freiem Wasser aufgefüllt. Der Assay wurde anschließend nach Angaben der Hersteller durchgeführt und die gelbe Färbung durch Messung der optischen Dichte bei 405 nm im Plattenleser erfasst. Um letztendlich die Endotoxinkonzentration ermitteln zu können, wurde auf jeder Mikrotiterplatte, in der der Assay durchgeführt wurde, eine Verdünnungsreihe eines Endotoxin-Standards (10 EU/ml *E. coli*-Stamm O111 Endotoxin) mitgeführt. Die Ergebnisse lieferten die Endotoxinkonzentration in EU/ml, welche in ng/ml umgerechnet werden konnten (10 EU/ml = 1 ng/ml).

3.2.3 Bildgebende Methoden

3.2.3.1 Bestimmung von Partikelgröße und -konzentration

Die Nanopartikel-Tracking-Analyse (*Nanoparticle tracking analysis*, NTA) beschreibt eine Methode, mit der sich die Konzentration sowie die Größenverteilung von Partikeln in einer Lösung ermitteln lässt. Dabei wird ein Laserstrahl auf eine Messkammer mit der zu untersuchenden Partikelsuspension gerichtet. Trifft der Laserstrahl auf die Partikel, kommt es zur Streuung des Lichts, welches wiederum von einem Mikroskop sowie einer Kamera erfasst und visualisiert werden kann. Der Versuchsaufbau ist in **Abb. 3** schematisch dargestellt.

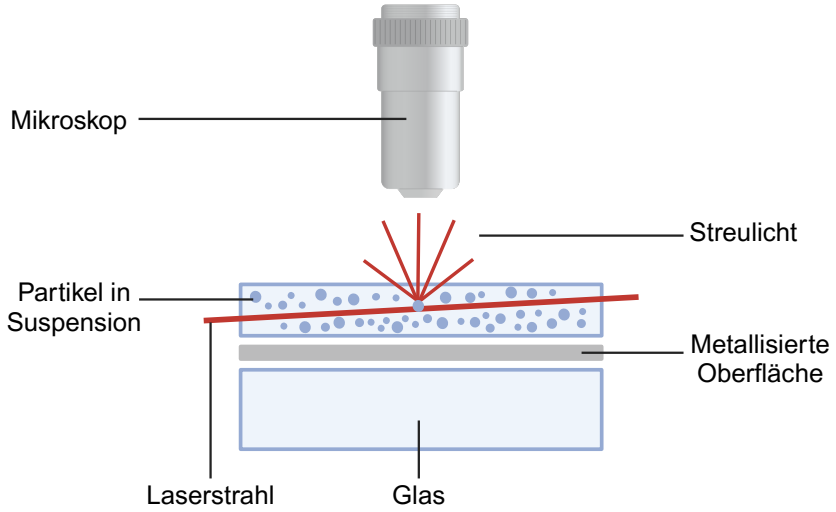

Abbildung 3: Schematischer Darstellung des Aufbaus eines NTA Systems.
(Modifiziert von Malvern Panalytical, Abbildung erstellt mit BioRender).

Das aufgenommene Video zeigt die Bewegung der Partikel, die der Brownschen Molekularbewegung unterliegt (R. Brown, 1828). Mit Hilfe der Stokes-Einstein-Gleichung lässt sich anschließend der Durchmesser der Partikel berechnen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde das NanoSight LM10 der Firma Malvern Panalytical verwendet. Für die Messung wurde die zu untersuchende Probe je nach Ausgangskonzentration zunächst 1:20 bis 1:2.000 (v/v) mit 0,22 µm-filtriertem PBS verdünnt, um eine Partikelkonzentration von 20 - 120 Partikeln pro Bild zu erreichen. Anschließend wurden 400 µl der Verdünnung in die Messkammer injiziert und mit einem Kameralevel von 15 dreimal ein jeweils 30 Sekunden langes Video aufgenommen. Die aufgenommenen Videos wurden anschließend automatisch mit der NTA 3.4 Software bei einem Detektionsschwellenwert von 5 ausgewertet.

3.2.3.2 Kryo-Transmissionselektronenmikroskopie

Die Kryo-Transmissionselektronenmikroskop (Kryo-TEM) ist eine spezielle Form der Transmissionselektronenmikroskopie, bei der die Proben bei extrem niedrigen Temperaturen untersucht werden. Gegenüber der herkömmlichen Elektronenmikroskopie hat dies den Vorteil, dass vor der Untersuchung nicht erst das Wasser aus den Proben entfernt werden muss, welches oftmals ein langer und zudem auch fehleranfälliger Prozess sein kann, durch den Artefakte verursacht werden können, die zu Fehlinterpretationen führen (Hurbain & Sachse, 2011).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Kryo-TEM genutzt, um die Präsenz und Morphologie von aufgereinigten bakteriellen und eukaryotischen EVs zu untersuchen. Die Analyse wurde von Dr. Marcus Koch am Leibniz-Institut für Neue Materialien (INM) am Campus der Universität des Saarlandes in Saarbrücken durchgeführt. Dafür wurden 2 µl der zu untersuchenden Probe auf einen Kohlelochfilm (Plano, Wetzlar, Deutschland, Typ S147-4) aufgetragen, 2 s lang geblottet und in unterkühltem flüssigem Ethan unter Verwendung eines Gatan (Pleasanton, Kalifornien, USA) CP3 Tauchgefrierapparat vitrifiziert. Die gefrorene Probe wurde anschließend unter flüssigem Stickstoff in einen Kryo-TEM-Probenhalter Modell 914 von Gatan überführt und mit einem JEM-2100 LaB6 TEM von JEOL (Akishima, Tokio, Japan) bei 200 kV Beschleunigungsspannung unter Niedrigdosisbedingungen abgebildet (CCD-Kamera Gatan Orius SC1000, 2 s Erfassungszeit).

3.2.3.3 Rasterelektronenmikroskopie

Das Rasterelektronenmikroskop, abgekürzt REM oder SEM für *Scanning electron microscope*, ist eine spezielle Art der Elektronenmikroskope, mit dem ein zu untersuchendes Objekt durch das Abrastern mit einem Elektronenstrahl dargestellt werden kann. Der Vorteil des SEM liegt in der besonders hohen Tiefenschärfe, wodurch die genaue Beschaffenheit der untersuchten Objekte abgebildet werden kann (Vernon-Parry, 2000).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die SEM genutzt, um die Morphologie von verschiedenen Bakterien zu verifizieren. Dafür wurde ausgehend von Übernachtkulturen zunächst Verdünnungen der entsprechenden Bakterienkulturen mit einer OD von 0,1 angesetzt. Anschließend wurden 2 ml der jeweiligen Verdünnung zusammen mit einem Aluminiumplättchen in eine 12-Well Zellkulturplatte überführt und bei 37 °C für 40 h (*L. casei*) oder 12 h (*E. faecalis*, *P. mirabilis*) kultiviert. Nach Ende der Inkubationszeit wurden die Bakterien mit 3 % (v/v) Glutardialdehyd für 2 h bei RT fixiert. Im nächsten Schritt wurde den Proben das Wasser entzogen. Dafür wurden die Bakterien für jeweils 10 min startend mit 30 % Ethanol in aufsteigenden Konzentrationen (40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %,

96 %, 100 %) gewaschen. Der letzte Waschschritt mit 100 % Ethanol wurde zweimal durchgeführt und das Ethanol dann für weitere 10 min gegen Hexamethyldisilazan (HMDS) ausgetauscht. Dieser Schritt war notwendig, da beim Trocknen der Proben nach dem letzten Waschschritt mit Ethanol durch die hohe Oberflächenspannung kleine Risse auf der der Oberfläche entstehen könnten (Chissoe et al., 1994). Dies kann durch das Austauschen von Ethanol gegen HMDS als letzten Waschschritt verhindert werden. Das HMDS wurde anschließend entfernt und die Proben unter dem Abzug für mehrere Stunden getrocknet. Das Aluminiumplättchen wurde nachfolgend auf dem SEM-Halter, auf dem ein klebriger Kohlenstofffilm befestigt wurde, fixiert und kurz vor der Analyse der Proben mit einer feinen Goldschicht überzogen (*Sputter coating*). Die Bilder wurden anschließend mit dem Evo HD 15 (Carl Zeiss Microscopy GmbH) bei 10.000x Vergrößerung aufgenommen und mit Hilfe der ZEISS SmartSEM Software (Carl Zeiss Microscopy GmbH) ausgewertet.

3.2.3.4 Visualisierung der Internalisierung von BEVs in eukaryotische Zellen

Um zu überprüfen, ob und in welchem Rahmen die BEVs von den eukaryotischen Zellen aufgenommen werden, wurde die Internalisierung zum einem mittels Durchflusszytometrie als auch mit Hilfe der konfokalen Laser-Scanning Mikroskopie (*Confocal laser scanning microscopy*, CLSM) untersucht.

Um die Aufnahme der BEVs analysieren zu können, wurden diese vor der Inkubation mit den Caco-2 Zellen mit Hilfe des Fluoreszenzfarbstoffes Vybrant™ DiI (1,1'-Dioctadecyl-3,3,3',3'-Tetramethyl-indocarbocyaninperchlorat) der Firma Invitrogen™ angefärbt. Es handelt sich dabei um einen lipophilen Membranfarbstoff, der bei Eintritt in die Membran orange-rot fluoresziert. Zum Anfärben der BEVs wurden die Pellets nach der Ultrazentrifugation, welche noch nicht über SEC aufgereinigt wurden, verwendet. Insgesamt wurden zu 500 µl BEV-Pellets entweder 2 µl (*L. casei* MV Pellet) oder 1 µl (*E. faecalis* MV Pellet oder *P. mirabilis* OMV Pellet) DiI gegeben, gemischt und anschließend für 30 min bei 37 °C inkubiert. Im Anschluss wurde die SEC wie in **3.2.2.1** beschrieben durchgeführt. Durch die SEC ließen sich neben freien Proteinen auch der ungebundene Farbstoff von den fluoreszenzmarkierten BEVs trennen. Nach der SEC wurden dann 50 µl der einzelnen aufgefangenen Fraktionen 9 bis 17 in eine schwarze 96-Well Mikrotiterplatte überführt und die Fluoreszenz (λEx/λEm 490/570 nm) gemessen. Die Fraktion, bei welcher die höchste Fluoreszenz gemessen werden konnte, wurde anschließend am selben Tag für die folgenden Untersuchungen verwendet.

3.2.3.4.1 Durchflusszytometrie von eukaryotischen Zellen

Für die Analyse der Aufnahme der BEVs mittels Durchflusszytometrie wurden in eine in 48-Well Zellkulturplatte 2,0 x 10^5 Caco-2 Zellen pro Well ausgesät und bei 37°C und 5 % CO_2 kultiviert. Nach 24 h wurde das Medium abgenommen, 400 µl frisches Zellkulturmedium sowie 100 µl DiI-gelabelte BEV oder 100 µl PBS als Kontrolle zu den Caco-2 Zellen gegeben und wiederum bei 37°C und 5 % CO_2 für entweder 4 h, 12 h, 24 h oder 48 h inkubiert. Nach Ende der Inkubationszeit wurde das Zellkulturmedium entfernt, die Zellen zweimal mit 500 µl PBS gewaschen, durch Zugabe von 100 µl 0,05 % Trypsin-EDTA von der Zellkulturplatte abgelöst und die Reaktion nach 5 min Inkubation der Zellen bei 37 °C und 5 % CO_2 durch Zugabe von 700 µl frischem Zellkulturmedium abgestoppt. Die Zellen von je 2 Wells mit der gleichen Behandlung wurden anschließend gepoolt und in ein 5 ml Röhrchen überführt. Im Anschluss wurde die Zellen durch Zentrifugation für 4 min bei 300 x g pelletiert, der Überstand entfernt und die Zellen durch Zugabe von 500 µl 4 % (v/v) Formaldehyd für 30 min bei RT fixiert. Nach der Fixierung wurden die Zellen nochmals pelletiert, einmal mit 500 µl PBS gewaschen und anschließend in 600 µl PBS resuspendiert. Die Analyse der Caco-2 Zellen erfolgte dann mit Hilfe des BD LSRFortessa™ Durchflusszytometer. Um die Zellen detektieren zu können, welche die DiI-gelabelten BEVs aufgenommen haben, wurde ein Laser bei einer Wellenlänge von 561 nm (Phycoerythrin, PE) genutzt. Von jeder Probe wurden insgesamt 10.000 Events mit Hilfe der BD FACSDiva™ Software erfasst und die aufgenommenen Signale mit FlowJo™ analysiert.

3.2.3.4.2 Konfokale Laser-Scanning Mikroskopie von eukaryotischen Zellen

Eine weitere Methode, um die Aufnahme der BEVs in die Caco-2 Zellen untersuchen und visualisieren zu können, ist die CLSM. Dafür wurden zunächst in einen 8-Well Kammerobjektträger 2,0 x 10^5 Caco-2 Zellen pro Well ausgesät und bei 37 °C und 5 % CO_2 kultiviert. Der Vorteil des Kammerobjektträgers besteht darin, dass durch die unterschiedlichen Wells mehrere Proben auf einem Objektträger vorbereitet werden können. Außerdem müssen die Zellen nicht nochmals abgelöst werden, sondern können direkt auf dem Objektträger fixiert und analysiert werden. Nach 24 h wurde wie bereits in **3.2.3.4.1** beschrieben, die DiI-gelabelten BEVs oder PBS als Kontrolle 1:5 (v/v) mit frischem Zellkulturmedium verdünnt und für 12 h, 24 h oder 48 h mit den Zellen bei 37 °C und 5 % CO_2 inkubiert. Nach Ende der entsprechenden Inkubationszeit wurden die Zellen zunächst zweimal mit 500 µl PBS gewaschen und dann für 20 min bei RT durch Zugabe von 500 µl 4 % (v/v) Formaldehyd fixiert. Ein Teil der Zellen wurde anschließend zweimal mit 500 µl PBS gewaschen, zuletzt nochmals mit 500 µl PBS bedeckt und bis zur Analyse bei 4 °C gelagert. Der andere Teil der Zellen

wurde im Folgenden für 20 min bei RT mit 500 µl einer Lösung aus 1 % (w/v) BSA und 0,05 % (w/v) Saponin in PBS inkubiert. Dieser Schritt diente der Permeabilisierung der Caco-2 Zellen sowie der Blockierung von unspezifischen Bindestellen für die anschließende Färbung. Als nächstes wurden das F-Aktin der Caco-2 Zellen mit 300 µl 1x Alexa Fluor™ 488 Phalloidin (1:1000 (v/v) in Blocking-/Permeabilisierungspuffer) und danach die Zellkerne durch Zugabe von 500 µl 0,5 µg/ml 4',6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI) für jeweils 20 min bei RT gefärbt. Zwischen den einzelnen Färbungen wurden die Zellen jeweils zweimal mit 500 µl PBS gewaschen, zuletzt nochmals mit 500 µl PBS bedeckt und bis zur Analyse bei 4 °C gelagert. Die Zellen wurden anschließend mit dem konfokalen Laser-Scanning Mikroskop System (Leica TCS SP8) analysiert. Die Fluoreszenz von DAPI und DiI wurden mit dem Hybrid Detektor (HyD) mit Emissionsfiltern zwischen 410 - 490 nm (405 nm, Diodenlaser) und 590 - 780 nm (561 nm, DPSS Laser) detektiert. Alexa Fluor 488™ Phalloidin wurde mit dem Photomultiplier (PMT) Detektor mit einem Emissionsfilter zwischen 500 - 590 nm (488 nm, Argonlaser) detektiert. Die Bilder wurden mit einer Auflösung von 4096 x 4096 mit Hilfe eines 25x Wasserimmersions-Objekts (Fluotar VISIR 25x/0.95) aufgenommen. Die aufgenommenen Bilder wurden anschließend mit der Leica Application Suite X (Las X) Software prozessiert. Die Aufnahmen zeigen die gelabelten BEVs (Rot), das F-Aktin (Grün) und die Zellkerne (Blau) sowohl als einzelne Bilder als auch als ein zusammengefügtes Bild.

3.2.3.5 Visualisierung der Internalisierung von eukaryotischen EVs und humanen miRNAs in Bakterien

Um die Interaktion von Bakterien mit eukaryotischen EVs sowie humanen miRNAs analysieren zu können, wurde in dieser Arbeit ebenfalls die Durchflusszytometrie sowie die CLSM genutzt. Zur Visualisierung der eukaryotischen EVs wurden diese zunächst mit PKH26 (Sigma-Aldrich) markiert. Dabei handelt es sich ähnlich wie bei dem DiI, welcher für die BEVs genutzt wurde, um einen rot-fluoreszierenden lipophilen Membranfarbstoff. Der Farbstoff wurde vor der Nutzung 1:125 (v/v) mit dem vom Hersteller bereitgestellten Puffer C verdünnt. Der verdünnte Farbstoff wurde dann 1:1 (v/v) mit 200 µl unaufgereinigtem EV-Pellet gemischt und für 10 min bei RT inkubiert. Zur Entfernung von ungebundenem Farbstoff sowie freien Proteinen wurde das EV-Pellet nachfolgend mittels SEC (siehe **3.2.2.1**) aufgereinigt. Im Anschluss wurden 50 µl der aufgefangenen Fraktionen 9 bis 17 in eine schwarze 96-Well Mikrotiterplatte überführt und die Fluoreszenz (λEx/λEm 490/570 nm) gemessen. Wie auch bei den DiI-gelabelten BEVs wurde für die PKH26-gelabelten EVs im Folgenden die Fraktion, bei welcher die höchste Fluoreszenz gemessen werden konnte, für die anschließenden Untersuchungen verwendet.

Zur Analyse der Interaktion von Bakterien mit humanen miRNAs wurden eine Cy3-gelabelte synthetische miR-192-5p, welche durch die Firma Eurofins Genomics (Ebersberg, Deutschland) synthetisiert wurde, genutzt. Wie auch beim DiI und PKH26 handelt es sich bei Cy3 um einen roten Fluoreszenzfarbstoff.

3.2.3.5.1 Durchflusszytometrie und Konfokale Laser-Scanning Mikroskopie von Bakterien

Um die Interaktion der Bakterien mit den eukaryotischen EVs visualisieren zu können, wurden die Bakterien zunächst wie in **3.2.1.1.4** beschrieben ausgehend von Übernachtkulturen auf eine OD von 0,01 mit ihrem entsprechenden Kulturmedium verdünnt und von dieser Verdünnung je 100 µl pro Well in eine 96-Well Zellkulturplatte vorgelegt. Anschließend wurden die Bakterien mit je 100 µl PKH26-gelabelten EVs oder 100 µl PBS als Kontrolle bei 37 °C inkubiert. Nach 8 h, 24 h und 48 h für *L. casei* oder 4 h, 8 h und 24 h für *E. faecalis* oder *P. mirabilis* wurden die Bakterienkulturen in neue 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt, für 5 min bei 9.500 x g pelletiert, in 500 µl PBS resuspendiert und mit 0,75 µl SYTO™ 9 für 10 min bei 37 °C angefärbt. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Bakterien nochmals für 5 min bei 9.500 x g pelletiert und durch Zugabe von 200 µl 4 % (v/v) Formaldehyd für 10 min bei 37 °C fixiert. Die Bakterien wurden anschließend einmal mit 500 µl PBS gewaschen und dann in 30 - 150 µl PBS resuspendiert. Im Anschluss wurden 5 µl Bakteriensuspension auf einen Objektträger aufgetragen. Nachdem die Bakteriensuspension vollständig getrocknet war, wurde ein Tropfen Dako Fluorescence Mounting Medium (Agilent Technologies) aufgetropft und ein Deckglas aufgesetzt. Die Objektträger wurden anschließend für mindestens 3 h bei 4 °C zum Aushärten gelagert. Die Bakterien wurden anschließend mit dem konfokalen Laser-Scanning Mikroskop System (Leica TCS SP8) analysiert. Die Fluoreszenz von PKH26 wurden mit dem Hybrid Detektor (HyD) mit einem Emissionsfilter zwischen 590 - 780 nm (561 nm, DPSS Laser) und SYTO™ 9 mit dem Photomultiplier (PMT) Detektor mit einem Emissionsfilter zwischen 500 - 590 nm (488 nm, Argonlaser) detektiert. Die Bilder wurden mit einer Auflösung von 2048 x 2048 mit Hilfe eines 63x Wasserimmersions-Objekts (HC PL APO CS2 63x/1.20) aufgenommen. Die aufgenommenen Bilder wurden anschließend mit der Las X Software prozessiert. Die Aufnahmen zeigen die gelabelten EVs und Bakterien sowohl als einzelne Bilder als auch als ein zusammengefügtes Bild. Zu besseren Sichtbarkeit wurden die EVs in Gelb und die Bakterien Blau dargestellt.

Zur Analyse der Internalisierung von synthetischer miR-192-5p wurden wie bereits beschrieben ausgehend von Übernachtkulturen Verdünnungen der jeweiligen Bakterien mit einer OD von 0,01 angesetzt und 100 µl in die Wells einer 96-Well Zellkulturplatte vorgelegt. Anschließend wurden die verschiedenen Bakterienkulturen zur Analyse der Internalisierung der freien miRNA mit 4 µM Cy3-markierter synthetischer miR-192-5p in PBS oder DMEM oder als Kontrolle 1 x siMAX Universal Buffer in PBS oder DMEM in einem Gesamtvolumen von 150 µl gemischt. Um die Aufnahme von in Liposomen verpackter miRNA zu untersuchen, wurden wie in **3.2.1.1.5** beschrieben verschiedene Transfektionsansätze vorbereitet, bei denen entweder 4 µM Cy3-gelabelte synthetische miR-192-5p in Liposomen verpackt oder 6 µl 1 x siMAX Universal Buffer mit dem Transfektionsreagenz vermischt wurden. Anschließend wurden die Bakterien wie oben beschrieben für unterschiedliche Zeiten mit der freien oder in Liposomen verpackten miRNA sowie den entsprechenden Kontrollen inkubiert. Nach Ende der Inkubationszeiten wurden die Bakterien wie beschrieben in neue Reaktionsgefäße überführt, mit SYTO™ 9 angefärbt, fixiert und in PBS resuspendiert. 5 µl der Bakteriensuspensionen wurde dann auf Objektträgern fixiert und im konfokalen Laser-Scanning Mikroskop System (Leica TCS SP8) analysiert. Die Fluoreszenz von Cy3 wurden mit dem Hybrid Detektor (HyD) mit einem Emissionsfilter zwischen 590 - 780 nm (561 nm, DPSS Laser) und SYTO™ 9 mit dem Photomultiplier (PMT) Detektor mit einem Emissionsfilter zwischen 500 - 590 nm (488 nm, Argonlaser) detektiert. Die Bilder wurden ebenfalls mit einer Auflösung von 2048 x 2048 mit Hilfe eines 63x Wasserimmersions-Objekts (HC PL APO CS2 63x/1.20) aufgenommen und anschließend mit der Las X Software prozessiert. Die Aufnahmen zeigen die gelabelte miR-192-5p und die Bakterien sowohl als einzelne Bilder als auch als ein zusammengefügtes Bild. Zu besseren Sichtbarkeit wurde die miR-192-5p in Gelb und die Bakterien Blau dargestellt.

Der restliche Teil der Bakteriensuspension wurde mit Hilfe des BD LSRFortessa Durchflusszytometers analysiert. Um die mit SYTO™ 9 angefärbten Bakterien detektieren zu können, wurde ein Laser bei einer Wellenlänge von 488 nm (Alexa Fluor 488) verwendet. Zur Detektion der Cy3-markierten synthetischen miR-192-5p wurde ein Laser bei einer Wellenlänge von 561 nm (PE) genutzt. Von *E. faecalis* wurden insgesamt 100.000 Events, von *L. casei* oder *P. mirabilis* je 200.000 Events mit Hilfe der BD FACSDiva™ Software erfasst und die aufgenommenen Signale mit FlowJo™ analysiert.

3.2.4 Molekularbiologische Methoden

3.2.4.1 Isolation von DNA aus Stuhl

Die Isolation der DNA aus den Stuhlproben, welche für die Analyse des Metagenoms genutzt wurden, erfolgte durch das Institut für Mikroökologie (Herborn, Deutschland) unter Verwendung des DNeasy PowerSoil Kit der Firma Qiagen nach Angaben der Hersteller. Die isolierte DNA wurde anschließend auf Trockeneis an das Institut für Humangenetik der Universität des Saarlandes am Universitätsklinikum des Saarlandes in Homburg (Saar) geschickt und dort bei -20 °C gelagert.

3.2.4.2 Isolation von RNA aus eukaryotischen Zellen

Um eine Veränderung der Genexpression nach Inkubation der Caco-2 Zellen mit den BEVs oder Transfektion der Zellen mit der BEV-RNA untersuchen zu können, wurde zunächst RNA aus den Caco-2 Zellen unter Verwendung des miRNeasy Micro Kits (Qiagen) isoliert. Die Grundlage dieses Kits bildet die Methode zu Extraktion von RNA mit Hilfe von Guanidiniumthiocyanat, Natriumacetat, Phenol sowie Chloroform unter sauren Bedingungen (Chomczynski & Sacchi, 1987, 2006).
Wie bereits in **3.2.1.2.4** und **3.2.1.2.5** beschrieben, wurden die Zellen, aus denen RNA isoliert werden sollte, durch Zugabe von 700 µl des Phenol/Guanidiniumthiocyanat-basierten QIAzol Lyse Reagenz vom Grund der Zellkulturplatte abgelöst und bei -80 °C bis zu weiteren Bearbeitung gelagert. Für die Isolation der RNA wurden die abgelöste Zellen zunächst wieder bei RT aufgetaut, durch vortexen gemischt und dann nochmals für 5 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden zu jeder Probe 140 µl Chloroform hinzugegeben, für etwa 15 s geschüttelt und die Suspension für weitere 2 - 3 min Inkubation bei RT inkubiert. Im nächsten Schritt wurden die Proben für 15 min bei 12.000 x g und 4 °C zentrifugiert. Während der Zentrifugation kommt es durch die Anwesenheit von Phenol und Chloroform zur Phasentrennung des Gemisches. Dadurch lassen sich die obere wässrige Phase, in der sich die RNA befindet sowie die untere organische Phase mit den Proteinen und die Interphase, in der die DNA lokalisiert ist, unterscheiden (Chomczynski & Sacchi, 1987, 2006; S. C. Tan & Yiap, 2009). Die wässrige Phase wurde anschließend in ein neues Reaktionsgefäß überführt und durch Zugabe von 1,5 Volumeneinheiten 100 % Ethanol ausgefällt. Anschließend wurde die gefällt RNA über eine Silikamembran-Säule gebunden und in mehreren Schritten aufgereinigt. Dafür wurde die an die Membran gebundene RNA mit verschiedenen Puffern sowie zweimal mit 80 % Ethanol gewaschen, bevor die Membran durch Zentrifugation getrocknet und die RNA letztendlich in 15 µl RNase-freiem H_2O eluiert wurde.

Anschließend wurde die Konzentration der RNA mit Hilfe des Nanodrop™ 2000 Spektralphotometer gemessen (siehe **3.2.4.5**) und die Proben dann bis zur weiteren Verwendung bei -70 °C gelagert.

3.2.4.3 Isolation von RNA aus bakteriellen und eukaryotischen EVs

Die Isolation der RNA aus den bakteriellen und eukaryotischen EVs erfolgte unter Verwendung des miRNeasy Serum/Plasma Kits (Qiagen). Das Kit verfolgt ein ähnliches Prinzip zur Isolation der RNA, wie bereits für das miRNeasy Micro Kit (siehe **3.2.4.2**) beschrieben wurde. Der Unterschied besteht jedoch darin, dass mit Hilfe des miRNeasy Serum/Plasma Kits die Extraktion von RNA aus flüssigen Proben mit größerem Volumen ermöglicht wird, ohne dass zu Beginn die darin enthaltenen Zellen oder Partikel noch ein weiteres Mal durch Zentrifugation pelletiert werden müssen.
Als Input dienten zweimal 200 µl der jeweiligen EV- oder BEV-Fraktion mit der höchsten Protein- und Partikelkonzentration. Wie bereits im vorherigen Abschnitt beschrieben erfolgte auch hier zunächst die Lyse der Proben durch Zugabe von 1 ml QIAzol Lyse Reagenz für 5 min bei RT. Anschließend wurden zu den Proben 200 µl Chloroform hinzugegeben, für etwa 15 s geschüttelt und die Suspension nach weiteren 2 - 3 min Inkubation bei RT für 15 min bei 12.000 x g und 4 °C zentrifugiert. Von der wässrigen Phase wurde anschließend 600 µl in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 1 µl für die Isolation von RNA aus den eukaryotischen EVs oder 2 µl für die Isolation von RNA aus den bakteriellen EVs, 20 µg/µl Glykogen (Invitrogen™) sowie 900 µl 100 % Ethanol gemischt. Das Glykogen präzipitiert gemeinsam mit der RNA in Ethanol und verbessert so die Ausbeute bei der Isolation, was besonders dann wichtig sein kann, wenn eine geringe RNA-Konzentration erwartet wird (Razak et al., 2022). Wie zu Beginn erwähnt, wurden als Input zweimal 200 µl der entsprechenden EV- oder BEV-Fraktionen genutzt. Beide Ansätze wurden im Folgenden jedoch über eine Säule aufgereinigt, um die Endkonzentration der RNA nach der Elution zu erhöhen. Die gefällt RNA der eukaryotischen EVs wurde anschließend entsprechend den Angaben der Hersteller über die Silikamembran-enthaltende Säule aufgereinigt. Die RNA der bakteriellen EVs hingegen wurde nach der Bindung an die Silikamembran zunächst mit RNase-freier DNase I (Qiagen) verdaut und im Verlauf wie vom Hersteller beschrieben weiter aufgereinigt. Zuletzt wurde die jeweilige RNA in 15 µl Nuklease-freiem Wasser eluiert und die RNA-Konzentration mit Hilfe des Qubit™ 4 Fluorometers gemessen (siehe **3.2.4.5**). Anschließend wurde die RNA bis zur weiteren Verwendung bei -70 °C gelagert.

3.2.4.4 Ethanolfällung von Nukleinsäuren

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die DNA, welche aus den Stuhlproben isoliert wurde, vor ihrer Verwendung für die jeweiligen Untersuchungen gefällt. Die Fällung von Nukleinsäuren findet in Anwesenheit von Salz und Ethanol bei niedrigen Temperaturen statt. Sie dient der Entfernung von überschüssigen Puffersalzen und der Aufkonzentrierung der Nukleinsäuren (Green & Sambrook, 2016).
Zunächst wurde das Volumen der DNA-Probe mit 1x TE-Puffer (pH 8,0) auf 100 µl aufgefüllt. Weiterhin wurden zu jedem Ansatz 10 µl 3 M Natriumacetat (pH 7,0) und 250 µl -20 °C-kaltes 100 % Ethanol hinzugefügt, durch Pipettieren gemischt und die Fällung über Nacht bei -20 °C durchgeführt. Am nächsten Tag wurden die Proben bei 14.000 rpm und 4 °C für 1 h zentrifugiert, der Überstand verworfen, das Pellet einmal mit -20 °C-kaltem 80 % Ethanol gewaschen und nochmals für 45 min bei 14.000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde ein weiteres Mal verworfen, das Pellet bei RT mit offenem Deckel getrocknet und zuletzt in 1x TE-Puffer (pH 8,0) resuspendiert. Die DNA-Konzentration wurde danach ein weiteres Mal im Nanodrop™ 2000 Spektralphotometer überprüft (siehe **3.2.4.5**) und die DNA dann bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert werden.

3.2.4.5 Bestimmung der Nukleinsäure-Konzentration

Die Konzentration von Nukleinsäuren lässt sich mit Hilfe verschiedener Methoden ermitteln. In der Regel wird die Konzentration durch die Messung der Lichtabsorption bestimmt. Im Rahmen dieser Arbeit wurde dafür das Nanodrop™ 2000 Spektralphotometer der Firma Thermo Fisher Scientific verwendet, welches das gesamte Absorptionsspektrum einer Probe in einem Wellenlängenbereich von 220 bis 350 nm misst. Zur Messung der Konzentration wurde 1 µl der jeweiligen Probe eingesetzt, wobei Nuklease-freies Wasser oder ein anderer entsprechender Puffer, in dem die Nukleinsäure gelöst war, als Referenz genutzt wurde. Die Konzentration von RNA und DNA errechnet sich aus der Absorption der Probe bei 260 nm, welches das Absorptionsmaximum von Nukleinsäuren darstellt, und der Absorptionseinheit A260 (40 ng RNA/µl oder 50 ng DNA/µl). Neben der Konzentration lässt sich mit dem Nanodrop™ 2000 Spektralphotometer auch die Reinheit der Nukleinsäuren durch Berechnung des Quotienten der Absorptionswerte von 260 nm mit 230 nm oder 280 nm bestimmen. Erhöhte Absorptionswerte bei 230 nm oder 280 nm deuten dabei auf Verunreinigungen z. B. mit Proteinen hin (Desjardins & Conklin, 2010).
Im Rahmen dieser Arbeit wurden mit Hilfe dieser Methode die Konzentration und Reinheit der DNA, welches aus dem Stuhl isoliert wurde, sowie der RNA, welche aus den Caco-2 Zellen und den eukaryotischen EVs isoliert wurde, gemessen.

Eine weitere Möglichkeit, um die Konzentration von Nukleinsäuren zu ermitteln, stellt die fluorometrische Messung dar. Der Nachweis erfolgt dabei über einen Fluoreszenzfarbstoff, welcher spezifisch für die jeweilige Nukleinsäure, z. B. doppelsträngige DNA (dsDNA), einzelsträngige DNA (ssDNA) oder RNA, ist (Jones et al., 1998; Rye et al., 1993; Schmidt & Ernst, 1995). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde für die fluorometrische Messung das Qubit™ 4 Fluorometer (Invitrogen™) verwendet. Die Messung wurde in einem Volumen von 200 µl, bestehend aus einer 1:200 (v/v) Verdünnung vom entsprechenden Fluoreszenzfarbstoff und einem Puffer sowie den jeweiligen internen Standards (10 µl) oder der zu untersuchenden Probe (1 µl oder 2 µl) durchgeführt. In dieser Arbeit wurde für die Konzentrationsbestimmung der verschiedenen Nukleinsäuren das Qubit™ 1x dsDNA HS Assay Kit, das Qubit™ ssDNA Assay Kit sowie das Qubit™ RNA HS Assay Kit jeweils nach Angaben der Hersteller genutzt. Mit diesen wurde die Konzentration der aus den BEVs isolierten RNA sowie im Rahmen der Sequenzierung die Konzentration der PCR-Produkte und Sequenzierbibliotheken überprüft.

3.2.4.5 Analyse von Nukleinsäure-Fragmenten

3.2.4.5.1 Agarosegelelektrophorese

Die Agarosegelelektrophorese ist eine Methode, mit der sich DNA aufgrund ihrer negativen Ladung in einem Gel mit Hilfe eines elektrischen Feldes auftrennen lässt (Aaij & Borst, 1972). Die Wanderungsgeschwindigkeit wird dabei durch verschiedene Faktoren wie der Konzentration der Agarose, aber auch der Länge der DNA-Moleküle bestimmt. Eine niedrigere Konzentration von Agarose führt beispielsweise zu größeren Poren im Gel, wodurch sich die aufzutrennenden Moleküle schneller durch das Gel bewegen können. Um die Auftrennung der DNA überprüfen zu können, wird in den meisten Fällen der DNA-interkalierende Fluoreszenzfarbstoff Ethidiumbromid genutzt, der anschließend mittels UV-Licht sichtbar gemacht werden kann (Aaij & Borst, 1972; Green & Sambrook, 2019; Lee et al., 2012).
Im Rahmen dieser Arbeit wurde mit Hilfe der Agarosegelelektrophorese die DNA, welche zuvor aus Stuhl isoliert wurde, hinsichtlich des Grades der Degradation untersucht. Zur Herstellung der Gele wurde zunächst 1 % (w/v) Agarose in 1x TAE-Puffer durch Aufkochen gelöst. Die Agaroselösung wurde anschließend unter Schütteln auf etwa 60 °C abgekühlt, mit Ethidiumbromid (Endkonzentration: 0,25 µg/ml) versetzt und im vorbereiteten Gelschlitten auspolymerisiert. Das auspolymerisierte Agarosegel wurde im nächsten Schritt in die Elektrophorese-Kammer eingesetzt und mit 1 x TAE-Puffer bedeckt. Die zu analysierende DNA wurden mit 10x Ladepuffer versetzt, auf das Gel aufgetragen und für etwa 1 h bei 120 V gelelektrophoretisch aufgetrennt. Als Größenstandard diente der DNA Molecular Weight

Marker III (Roche). Das Ethidiumbromid wurde anschließend mit Hilfe der DeVision DBOX (Decon Science Tec) unter UV-Licht bei einer Wellenlänge von 254 nm sichtbar gemacht und die Signale mit der DeVision G2.0 Software aufgenommen.

3.2.4.5.2 Analyse von Nukleinsäuren mittels Agilent 2100 Bioanalyzer

Mit Hilfe des Agilent 2100 Bioanalyzer ist es möglich, sowohl RNA als auch DNA ähnlich dem Prinzip einer klassischen Gelelektrophorese zu analysieren. Die Proben, welche im Bioanalyzer-Chip untersucht werden sollen, wandern während der Analyse in einen Trennkanal ein, in dem sich ein Gelpolymer befindet. Ähnlich der klassischen Gelelektrophorese werden die Nukleinsäuren durch Anlegen einer elektrischen Spannung in diesem Gelpolymer entsprechend ihrer Größe aufgetrennt. Die Detektion der Nukleinsäuren erfolgt auch hier anhand eines Fluoreszenzfarbstoffes, der sich an die RNA oder in die DNA einlagert. Das gemessene Signal wird dann in einem Elektropherogramm dargestellt und kann in ein Gel-ähnliches Bild übersetzt werden. Die Vorteile dieser Methode bestehen unter anderem darin, dass die Analysen in kürzerer Zeit und mit einem geringeren Probenvolumen durchgeführt werden können (Davies et al., 2016; Mueller et al., 2000).
Im Rahmen dieser Arbeit wurde zur Analyse der Nukleinsäure-Fragmente das Agilent RNA 6000 Nano Kit, Agilent RNA 6000 Pico Kit und das Agilent DNA 1000 Kit der Firma Agilent Technologies verwendet. Entsprechend der Angaben der Hersteller wurde der Chip zunächst mit dem Fluoreszenzfarbstoff enthaltenden Gelpolymer, dem Größenstandard, dem Marker und im Falle des Agilent RNA 6000 Pico Kits, einer Lösung zur Verbesserung der Einwanderung der RNA in das Gelpolymer beladen. Anschließend wurde 1 µl der zu analysierenden Proben in die entsprechenden Probenkammern pipettiert, der Chip für 1 min bei 2400 rpm gevortext und dann mit dem Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies) analysiert. Die Auswertung der Signale erfolgte mit Hilfe der Bioanalyzer 2100 Expert Software. Auf diese Weise ließen sich die Nukleinsäure-Fragmente der RNA aus den Caco-2 Zellen, den bakteriellen und eukaryotischen EVs sowie im Rahmen der Sequenzierung der PCR-Produkte untersuchen.

3.2.4.6 Sequenzierung von Nukleinsäuren

Die Sequenzierung beschreibt eine Methode zur Bestimmung der Abfolge von Nukleotiden in einer DNA-Sequenz. Die heute noch in Laboren genutzte und in den 1970er-Jahren entwickelte Sanger-Sequenzierung ist eine der ersten Methoden der DNA-Sequenzierung (Sanger et al., 1977). Die anfänglich noch sehr teuren und zeitaufwendigen Techniken wurden in den folgenden Jahren immer weiterentwickelt. Heute eingesetzten Methoden werden auch als Sequenzierung der nächsten Generation (*Next-Generation Sequencing*, NGS) bezeichnet. Sie haben den Vorteil, dass zeitgleich eine große Anzahl an Sequenzen generiert werden können (Satam et al., 2023). Heutzutage werden unterschiedlichen NGS Technologien zur Untersuchung einer ganzen Reihe von verschiedenen Fragestellungen eingesetzt. Im Rahmen dieser Arbeit wurden sowohl DNA aus Stuhl (Metagenom), RNA aus eukaryotischen Zellen (Transkriptom) als auch miRNAs aus eukaryotischen EVs (miRNom) sequenziert. Alle Kits und Reagenzien, welche für die Vorbereitung der Sequenzierbibliotheken (*Library preparation*) als auch die Durchführung der Sequenzierung selbst genutzt wurden, wurden von der Firma MGI Technologies bezogen. Für die Messung der dsDNA- oder ssDNA-Konzentrationen an den entsprechenden Stellen wurden das Qubit™ 1x dsDNA HS Assay Kit sowie das Qubit™ ssDNA Assay Kit (siehe **3.2.4.5**) verwendet.

3.2.4.6.1 Sequenzierung des Metagenom

Genau wie das gesamte Genom von Menschen heutzutage mittels Ganz-Genom Sequenzierung (*Whole-Genome Sequencing*, WGS) analysiert werden kann, lässt sich auch das Genom von Mikroorganismen, welches als Metagenom bezeichnet wird, mittels Sequenzierung untersuchen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde durch die Sequenzierung des Metagenoms die Zusammensetzung des Darmmikrobioms von Patienten mit M. Parkinson sowie gesunden Kontrollprobanden anhand von DNA, die zuvor aus den Stuhlproben der Probanden isoliert wurde, untersucht. Die Vorbereitung der Sequenzierbibliotheken erfolgte mit Hilfe des MGIEasy DNA Library Prep Kits. Entsprechend der Angaben der Hersteller wurde zunächst 1 µg der zu untersuchenden DNA mit Hilfe des Covaris® M220 Focused Ultrasonicator fragmentiert und die Fragmente mit einer Größe von 250 bp mit Hilfe von AMPure XP Beads (Beckman Coulter) aufgereinigt. Anschließend wurde die dsDNA-Konzentration gemessen und dann 50 ng fragmentierte DNA für das sogenannte *End-repair* und *A-tailing* eingesetzt. Dabei werden die während der Fragmentierung entstandenen ungleichen Überhänge (*Sticky ends*) an den Enden der DNA-Fragmente zunächst geglättet (*Blunt ends*) und anschließend ein Nukleotid am 3‘-Ende der DNA-Fragmente angefügt, um im nächsten Schritt die 3‘- und 5‘-Adaptoren an die Fragmente ligieren zu können.

Die Adaptoren tragen zudem die spezifischen Barcodes, mit denen während der Auswertung der Daten die einzelnen Proben zugeordnet werden können. Anschließend wurde die DNA in einer PCR mit 7 Zyklen amplifiziert und im Anschluss die Konzentration der amplifizierten dsDNA bestimmt und die Größe der amplifizierten Fragmente mittels Agilent DNA 1000 Kits (Agilent Technologies) überprüft (siehe **3.2.4.5.2**). Als nächstes wurden jeweils 16 Proben mit unterschiedlichen Barcodes in gleicher Menge gepoolt und die Zirkularisierung durchgeführt. Während der Zirkularisierung wurde die dsDNA zunächst denaturiert. Durch einen Primer, welcher teilweise komplementär zu den Sequenzen der 3‘ und 5‘-Adaptoren ist, kam es dann zur Ausbildung von zirkulären ssDNAs. In einem weiteren Schritt wurden alle noch linearen ssDNAs verdaut, die zirkulären ssDNAs mit Hilfe von DNA Clean Beads (MGI Technologies) entsprechend den Angaben der Hersteller aufgereinigt und die Konzentration gemessen. Die zirkuläre ssDNA, welche als Sequenzierbibliothek diente, konnte dann bei -20 °C gelagert werden. Für die Sequenzierung selbst wurden ausgehend von der Sequenzierbibliothek 40 fmol genutzt, um die *DNA Nanoballs* (DNBs) über *Rolling Circle Amplification* (RCA) zu generieren. Die Konzentration der DNBs wurde nochmal durch Messung der ssDNA-Konzentration überprüft und die DNBs anschließend auf eine *Flowcell* geladen und die *Paired-End* Sequenzierung unter Verwendung des BGISEQ-500RS High-throughput Sequencing Set für PE100 auf einem BGISEQ-500 durchgeführt.

3.2.4.6.2 Sequenzierung des Transkriptoms

Um die Veränderungen in der Genexpression der Caco-2 Zellen, die mit BEVs inkubiert oder BEV-RNA transfiziert wurden, analysieren zu können, wurde das Transkriptom der Zellen analysiert. Mit Hilfe des MGIEasy rRNA Depletion Kit (MGI Technologies) wurden im ersten Schritt die ribosomalen RNAs (rRNAs) verdaut. Dafür wurden von jeder Probe 200 ng RNA als Ausgangsmaterial genutzt, der rRNA-Verdau entsprechend der Herstellerangaben durchgeführt und die verbleibende RNA mit Hilfe von RNAClean XP Beads (Beckman Coulter) aufgereinigt. Die Vorbereitung der Sequenzierbibliotheken wurde mit dem automatischen Probenvorbereiter MGISP-960 unter Verwendung des MGIEasy RNA Library Prep Sets (MGI Technologies) durchgeführt. Dabei wurde die aufgereinigt RNA zunächst enzymatisch in etwa 150 bp große Fragmente fragmentiert und anschließend in doppelsträngige cDNA umgeschrieben. Wie auch in **3.2.4.6.1** beschrieben folgte in den nächsten Schritten das *End-repair* und *A-tailing* sowie die Ligation der Adaptoren. Die DNA wurde im Anschluss in einer PCR mit 14 Zyklen amplifiziert und die Konzentration der dsDNA überprüft. Anschließend wurden je 12 oder 16 Proben mit unterschiedlichen Barcodes in gleicher Menge gepoolt und die Zirkularisierung sowie Verdau (siehe **3.2.4.6.1**) wie beschrieben durchgeführt, um eine

zirkuläre ssDNA Sequenzierbibliothek herzustellen. Für die Sequenzierung wurden ausgehend von der Sequenzierbibliothek 40 fmol genutzt, um die DNBs zu generieren. Die Konzentration der DNBs wurde durch Messung der ssDNA-Konzentration überprüft, diese anschließend auf eine Flowcell geladen und die *Paired-End* Sequenzierung unter Verwendung des DNBSEQ-G400RS High-throughput Sequencing Reagent Set (MGI Technologies) für PE100 auf einem DNBSEQ-G400 durchgeführt.

3.2.4.6.3 Sequenzierung des miRNoms

Die miRNAs in Caco-2 (+FCS) EVs und DMEM (+FCS) EVs wurden im Rahmen dieser Arbeit mit Hilfe einer smallRNA-Sequenzierung analysiert. Zur Vorbereitung der Sequenzierbibliotheken wurde das MGIEasy smallRNA Library Prep Kit der Firma MGI Technologies entsprechend der Angaben der Hersteller genutzt. Von jeder zu analysierenden Probe wurden als Ausgangsmaterial 100 ng RNA eingesetzt. Zunächst wurde der 3‘-Adaptor und in einem anschließenden separaten Schritt der 5‘-Adaptor an die RNA ligiert. Anschließend wurde die RNA im Rahmen der Reversen Transkription zunächst in cDNA umgeschrieben und diese mittels PCR in 25 Zyklen amplifiziert. 50 µl der amplifizierte DNA wurden anschließend mit 10 µl Ladepuffer (MGI Technologies) gemischt und in einem 6 %-igen TBE Gel (Invitrogen™) in einer mit 1x TBE gefüllten Elektrophoresekammer für 30 min bei 185 V gelelektrophoretisch aufgetrennt. Als Größenstandard diente der 10 bp DNA Ladder (MGI Technologies). Anschließend wurden die Gele mit GelStar™ Nucleic Acid Stain (1:50 (v/v) in 1x TBE-Puffer) der Firma Lonza angefärbt und die aufgetrennte DNA mit Hilfe des ChemiDoc™ Touch Imaging Systems sichtbar gemacht. Die Bande bei etwa 110 bp wurde anschließend ausgeschnitten, das Gel zerkleinert und die DNA in 1x Tris-Natriumchlorid-EDTA (TNE)-Puffer (MGI Technologies) für ca. 3 h bei 650 rpm und 37 °C aus dem Gel eluiert. Die Lösung wurde zur Entfernung des Gels filtriert und durch Zugabe von -20 °C-kaltem 100 % Ethanol und 3 µl 5 mg/ml Glycogen (Invitrogen™) über Nacht bei -20 °C gefällt. Am nächsten Tag wurde die DNA durch Zentrifugation bei 14.000 rpm und 4 °C für 30 min pelletiert, einmal mit -20 °C-kaltem 80 %-igem Ethanol gewaschen, in 14 µl TE-Puffer resuspendiert und die dsDNA-Konzentration gemessen. Als nächstes wurden jeweils 12 Proben mit unterschiedlichen Barcodes in gleicher Menge gepoolt und die Zirkularisierung wie bereits in **3.2.4.6.1** beschrieben durchgeführt. Die *Single-End* Sequenzierung (SE50) der Bibliotheken wurde als Service bei der Firma BGI (Shenzhen, China) in Auftrag gegeben.

3.2.5 Datenverarbeitung und -auswertung

Die Verarbeitung der FASTQ-Dateien, die im Rahmen der Sequenzierung des Metagenoms, Transkriptoms und miRNoms generiert wurden, erfolgte in Kooperation mit dem Zentrum für klinische Bioinformatik (Arbeitsgruppenleiter: Prof. Dr. Andreas Keller) der Universität des Saarlandes in am Campus in Saarbrücken.

3.2.5.1 Auswertung der Metagenom-Sequenzierung

Im Rahmen der Prozessierung der Rohdaten wurde zunächst die Qualität der Sequenzen mit FastQC (Version 0.11.8) validiert und der Bericht mit MultiQC (Version 1.7) (Ewels et al., 2016) zusammengefasst. Weiterhin wurden die Sequenzdaten auf Kontamination mit Adaptersequenzen unter Zuhilfenahme des Minion Tools vom Kraken Package (Version 16.098) (M. P. A. Davis et al., 2013) überprüft. Das Trimmung, welches zur Entfernung von Basen, die mit geringer Qualität gelesen wurden, diente und die Entfernung von humanen Sequenzen wurden mit KneadData (Version 0.7.2) (https://huttenhower.sph.harvard.edu/kneaddata/) durchgeführt. Auf Basis der prozessierten Rohdaten wurden die Read-basierten Analysen mit Hilfe der Tools MetaPhlAn2 (Version 2.9.19) (Segata et al., 2012) und mOTUs2 (Version 2.5.0) (Milanese et al., 2019) durchgeführt. Das R-Package phyloseq (Version 1.28.0) (McMurdie & Holmes, 2013) wurde anschließend genutzt, um die relative Häufigkeit in jeder Probe auf unterschiedlichen taxonomischen Ebenen darzustellen. Die Alpha-Diversität wurde durch Berechnung des Shannon- und Simpson-Indexes und die Beta-Diversität mit Hilfe der Bray-Curtis Distanz ermittelt. Mit dem R-Package ALDEx2 (Version 1.14.1) (Fernandes et al., 2013) wurde im Anschluss die Häufigkeit der Taxa zwischen den Gruppen miteinander verglichen. Die Metagenom-Daten wurden im Zusammenhang mit der Publikation dieser Ergebnisse (Becker et al., 2022) im GSA (Genome Sequence Archive, https://ngdc.cncb.ac.cn/gsa-human/) hinterlegt und sind öffentlich zugänglich (BioProject: PRJCA004435).

3.2.5.2 Auswertung der Transkriptom-Sequenzierung

Die Prozessierung der Rohdaten erfolgte mit Hilfe der snakePipes Pipeline (Version 2.7.3) (Bhardwaj et al., 2019). Die initiale Qualitätskontrolle wurde mit Hilfe von MultiQC (Version 1.12) (Ewels et al., 2016) erstellt. Anschließend wurden die Sequenzen mit STAR (Version 2.7.10b) (Dobin et al., 2013) unter Verwendung der Standardeinstellungen gegen das humane Genom (*Genome Reference Consortium Human Build 38 Organism*: Homo sapiens, GRCh38)

abgeglichen. Zur Entfernung von Duplikaten wurde die *markdup* Funktion von Sambamda (Version 0.8.0) (Tarasov et al., 2015) verwendet. Um im Anschluss die mRNA *counts* zu quantifizieren, wurde das Programm FeatureCount (Version 2.0.1) (Y. Liao et al., 2014) unter Verwendung der Parameter -C -Q 10 --primary genutzt. Die prozessierten Daten wurden anschließend genutzt, um mit Hilfe von DESeq2 (Version 1.30.1) (Love et al., 2014) die differentielle Expressionsanalyse durchzuführen. Neben dem Fold Change wurde mit DESeq2 auch der Cohen's *d* ermittelt. Der Cohen's *d* stellt dabei ein Maß für die statistische Relevanz der beobachteten Effekte dar. Entsprechend Cohen steht ein *d* von 0,2 bis 0,5 für einen schwachen, ein *d* von 0,5 bis 0,8 für einen mittleren und ein *d* über 0,8 für einen starken Effekt (Cohen, 2013). Nachfolgend wurden diejenigen Gene mit einem Log2 Fold Change < -1 und Cohen's *d* > 0,8 oder Log2 Fold Change > 1 und Cohen's *d* > 0,8 betrachtet. Um die Veränderungen auf Genexpressionsebene funktionell analysieren zu können, wurde mit Hilfe von GeneTrail 3.2 eine Anreicherungsanalyse (*Over-representation analysis*, ORA) durchgeführt (Backes et al., 2007; Gerstner et al., 2020). Dafür wurden die entsprechend der oben angegebenen Kriterien differentiell exprimierten Gene in den jeweiligen untersuchten Bedingungen als Input verwendet. Als Referenz dienten alle von NCBI (National Center for Biotechnology Information) unterstützten Gene. Aufgrund von multiplen Testungen wurden die p-Werte im Anschluss nach Benjamini-Hochberg adjustiert. Die Ergebnisse wurden für die Termini der Gene Ontology (GO) Kategorie: „Biological Process" dargestellt.

3.2.5.3 Auswertung der miRNom-Sequenzierung

Für die Prozessierung der FASTQ-Dateien wurde die miRMaster 2.0 Pipeline (Fehlmann et al., 2021) verwendet und die Sequenzen mit der Datenbank miRBase (release 22.1) abgeglichen. Die Normalisierung erfolgte auf Grundlage der *reads per mapped million miRNAs* (rpmmm). Anschließend wurden verschiedene Filter angewandt, um miRNAs zu identifizieren, die in mindestens einer Probe aus den unterschiedlichen Gruppen sowie in jeweils 75 % der Gruppen exprimiert waren. Im Rahmen der differentiellen Expressionsanalyse wurde der Fold Change sowie die Signifikanz mit Hilfe des t-Test sowie nachfolgender Adjustierung des p-Wertes für multiple Testungen nach Benjamini-Hochberg (*False discovery rate*, FDR 10 %) kalkuliert.

4. Ergebnisse

Die im Rahmen dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse wurden teilweise in der Publikation „*Effects of Resistant Starch on Symptoms, Fecal Markers, and Gut Microbiota in Parkinson's Disease - The RESISTA-PD Trial*“ im Journal *Genomics, Proteomics & Bioinformatics* veröffentlicht (Becker et al., 2022). Weitere zentrale Ergebnisse werden aktuell in der Publikation „*Extracellular Vesicles and their RNA cargo facilitate bidirectional cross-kingdom communication between human and bacterial cells*“ für die Veröffentlichung vorbereitet.

Das grundlegende Ziel der vorliegenden Arbeit war, es die Kommunikation von Parkinson-assoziierten Bakterien mit humanen Darmepithelzellen über EVs zu untersuchen. Die Ergebnisse dieser Arbeit lassen sich in drei Abschnitte unterteilen. Die experimentelle Vorgehensweise ist schematisch in **Abb. 4** veranschaulicht. Im ersten Teil dieser Arbeit wurde die Zusammensetzung des Darmmikrobioms von Parkinson-Patienten sowie gesunden Kontrollprobanden im Rahmen einer Metagenom-Sequenzierung analysiert. Der zweite Teil fokussierte sich auf die BEVs von drei unterschiedlichen Bakterienspezies und dem Einfluss dieser sowie der mit ihnen assoziierten RNA, kurz BEV-RNA, auf die Genexpression von eukaryotischen Zellen. Dafür wurden zunächst BEVs sowie die BEV-RNA isoliert, aufgereinigt und charakterisiert. Anschließend wurde die Internalisierung der BEVs durch die Empfängerzellen sowie die Viabilität der eukaryotischen Zellen nach Inkubation mit den BEVs oder Transfektion mit der BEV-RNA untersucht, bevor im Anschluss die Effekte auf die Genexpression der eukaryotischen Zellen analysiert wurden. Der letzte Teil dieser Arbeit befasste sich mit der Interaktion von eukaryotischen EVs bzw. bestimmten humanen EV-miRNAs mit verschiedenen Bakterien. Dafür wurden zunächst EVs aus eukaryotischen Zellkulturüberstanden isoliert und charakterisiert. Anschließend wurde der Einfluss der EVs auf das Wachstum unterschiedlicher Bakterien und die Internalisierung der EVs in diese untersucht. Weiterhin wurde das miRNA-Expressionsprofil der eukaryotischen EVs untersucht, um die darin vorherrschenden miRNA-Spezies identifizieren zu können. Abschließend wurde dann der Effekt einer ausgewählten miRNA auf das Wachstum, die Viabilität sowie die Interaktion der Bakterien mit dieser miRNA untersucht.

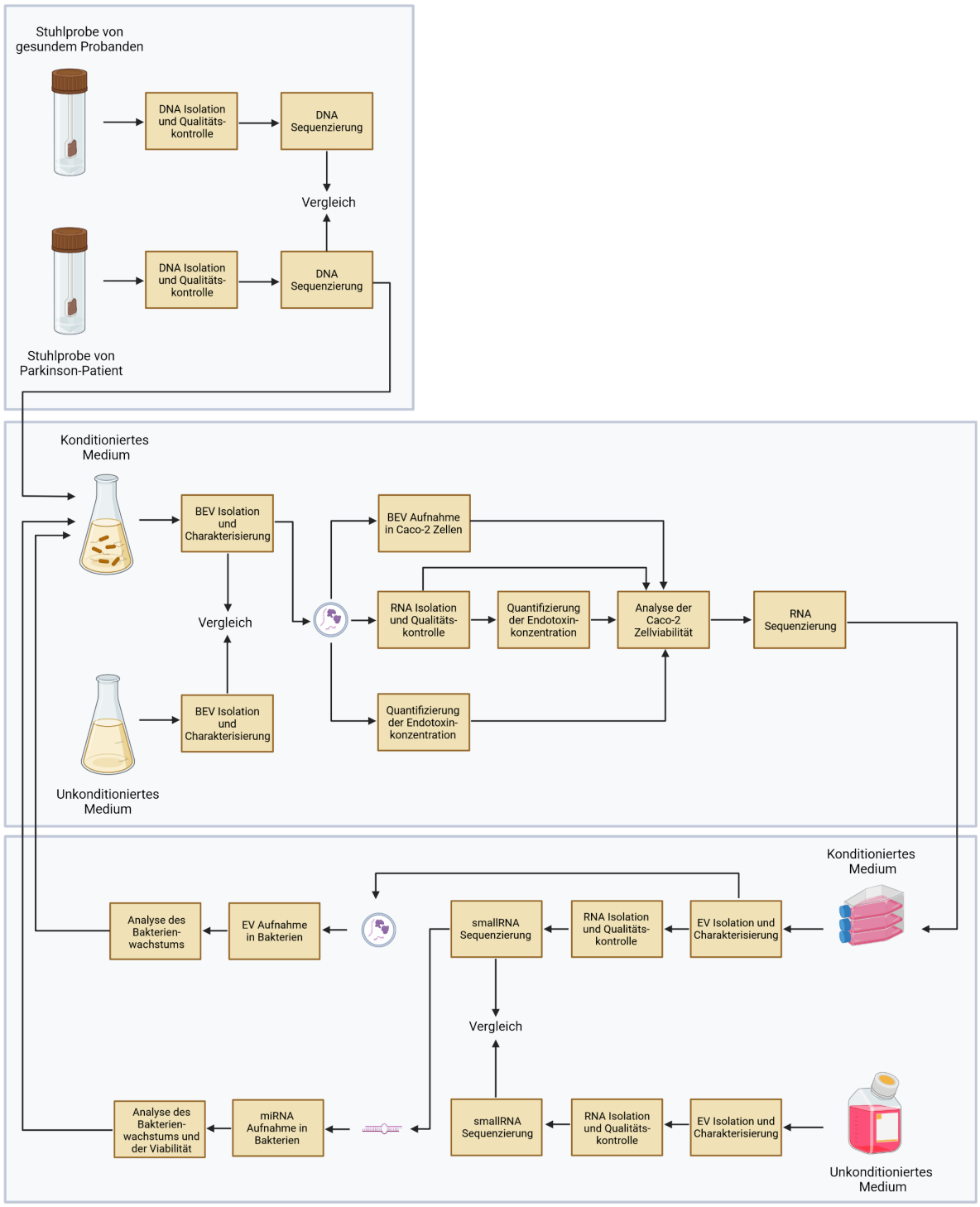

Abbildung 4: Schematische Übersicht zur experimentellen Vorgehensweise.
Dargestellt sind die unterschiedlichen thematischen Abschnitte, die im Rahmen dieser Doktorarbeit untersucht wurde. Der erste Abschnitt (**Oben**) beschäftigte sich mit der Analyse der Zusammensetzung des Darmmikrobioms von Parkinson-Patienten und gesunden Kontrollprobanden. Der zweite Abschnitt (**Mitte**) thematisierte den Effekt von BEVs und BEV-RNA auf die Genexpression von eukaryotischen Zellen. Der dritte und letzte Abschnitt (**Unten**) beschäftigte sich mit der Interaktion von Bakterien mit eukaryotischen EVs und spezifischen EV-miRNAs. (Abbildung erstellt mit BioRender)

Teil I: Analyse der Zusammensetzung des Darmmikrobioms von Parkinson-Patienten

Zur Untersuchung der Zusammensetzung des Darmmikrobioms bei Patienten mit M. Parkinson wurde in dieser Arbeit das Metagenom mit Hilfe von NGS analysiert. Für die Analyse standen insgesamt 77 Stuhlproben zur Verfügung, wobei von diesen wiederum 69 Proben für die finale Auswertung herangezogen wurden. **Tab. 5** gibt eine Zusammenfassung zu den Patientenkollektiven.

Tabelle 5: Patientenkollektiv für die Analyse der Zusammensetzung des Darmmikrobioms.
Angegeben ist die Anzahl der Proben in der Gruppe mit den Parkinson-Patienten (PD) und den Kontrollprobanden sowie das Alter der Patienten (MW ± STABW, Minimum und Maximum).

	Anzahl	Alter (Jahre)	Minimum	Maximum
PD	43	65,53 ± 9,32	46	84
Kontrollen	26	58,85 ± 8,96	40	76
Gesamt	**69**	**63,01 ± 9,68**	**40**	**84**

Im Anschluss an die Sequenzierung wurden im Rahmen der Datenanalyse verschiedene Methoden angewandt, um die bakterielle Zusammensetzung in den verschiedenen Gruppen zu ermitteln.

4.1 Analyse der Alpha- und Beta-Diversität

Um Veränderungen in der Zusammensetzung des Darmmikrobioms von Parkinson-Patienten und gesunden Probanden detektieren zu können, wurden zu Beginn der Analysen die Alpha- und Beta-Diversität ermittelt. Die Alpha-Diversität wurde durch Errechnen des Shannon- und Simpson-Indexes bestimmt. Die Alpha- auch α- oder auch Punktdiversität genannt, dient als Maß, um die Artenvielfalt innerhalb eines bestimmten Lebensraums oder einer Gemeinschaft zu beschreiben (Whittaker, 1972). **Abb. 5** zeigt die Alpha-Diversität für die Gruppe der Parkinson-Patienten (PD) sowie der Gruppe mit den gesunden Kontrollprobanden.

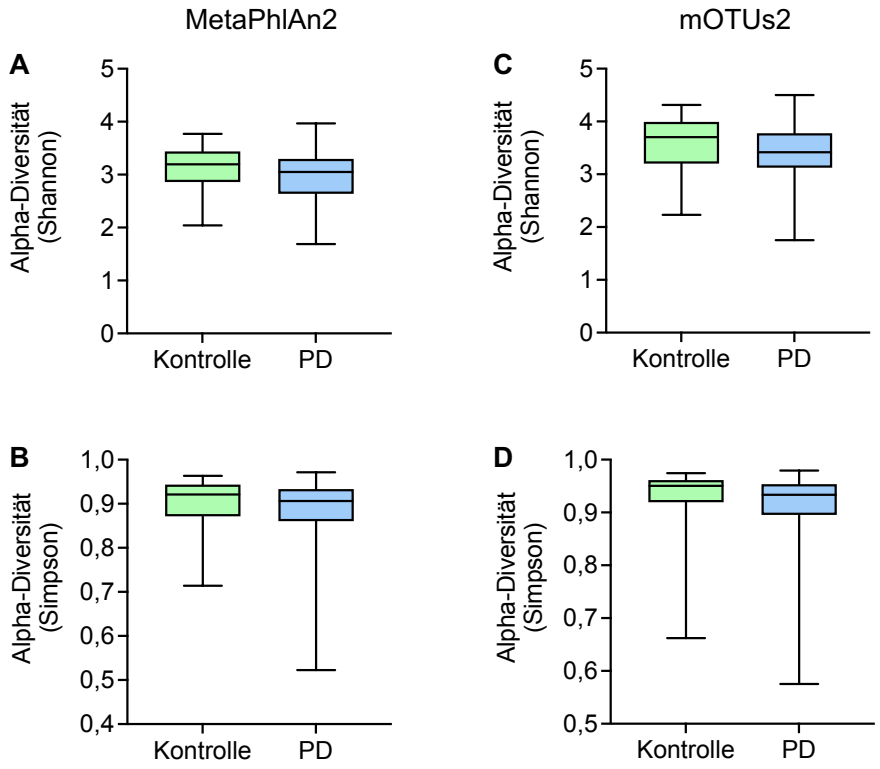

Abbildung 5: Analyse der Alpha-Diversität.
Dargestellt ist die Alpha-Diversität auf Basis des mit den MetaPhlAn2 (**A** und **B**) und mOTUs2 (**C** und **D**) Daten berechneten Shannon- und Simpson-Index in Box-Whisker-Plots. Die Boxen kennzeichnen das zweite und dritte Quartil, wobei die horizontale Linie in der Box den Median markiert. Oberer und untere Whisker geben jeweils Minimum und Maximum der Alpha-Diversität an.

Ein hoher Shannon oder Simpson-Index ist gleichbedeutend mit einer hohen Diversität, wohingegen ein niedriger Indexwert einer niedrigen Diversität entspricht. Die Ergebnisse haben gezeigt, dass kein signifikanter Unterschied zwischen der Alpha-Diversität der beiden Gruppen weder bei Kalkulation des Shannon- noch des Simpson-Indexes mit MetaPhlAn2 (**Abb. 5 A und B**) oder mOTUs2 (**Abb. 5 C und D**) gefunden werden konnte.

Neben der Alpha-Diversität wurde anschließend auch die Beta-Diversität (β-Diversität) analysiert (**Abb. 6**). Diese beschreibt dabei die Artenvielfalt zwischen verschiedenen Gemeinschaften (Whittaker, 1972), hier ausgedrückt durch die Gruppe der Parkinson-Patienten und den gesunden Kontrollprobanden.

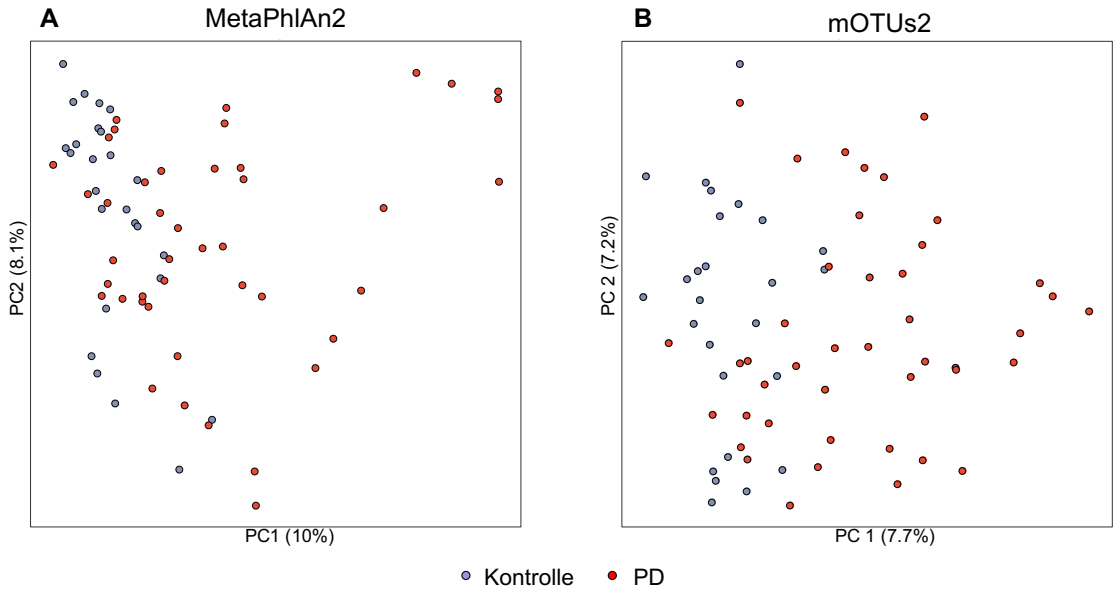

Abbildung 6: Analyse der Beta-Diversität.
Dargestellt ist die Beta-Diversität für alle untersuchten Proben durch einer Hauptkoordinatenanalyse (*principle coordinate analysis*, PCoA) auf Basis der mit den MetaPhlAn2 (**A**) und mOTUs2 (**B**) Daten berechneten Bray-Curtis Distanz.

Bei der Analyse der Beta-Diversität ließ sich im Vergleich zur Alpha-Diversität ein signifikanter Unterschied ($p < 0{,}001$) zwischen den beiden untersuchten Gruppen feststellen (**Abb. 6 A und B**). Die Zusammensetzung des Darmmikrobioms bei Patienten mit M. Parkinson zeigte dabei deutliche Unterschiede verglichen mit den Kontrollprobanden. Zudem war erkennbar, dass auch die Komposition des Darmmikrobioms innerhalb der Gruppe der Parkinson-Patienten größere Unterschiede aufwies.

4.2 Zusammensetzung des Darmmikrobioms auf verschiedenen taxonomischen Ebenen

Wie die Analyse der Beta-Diversität ergeben hat, wiesen das Darmmikrobiom der Parkinson-Patienten und gesunden Kontrollprobanden hinsichtlich der Zusammensetzung der Artengemeinschaft deutliche Unterschiede auf. Im Weiteren sollte daher die genaue Komposition des Darmmikrobioms auf verschiedenen taxonomischen Ebenen näher untersucht werden. **Abb. 7** zeigt den prozentualen Anteil der verschiedenen identifizierten Stämme in den beiden untersuchten Gruppen.

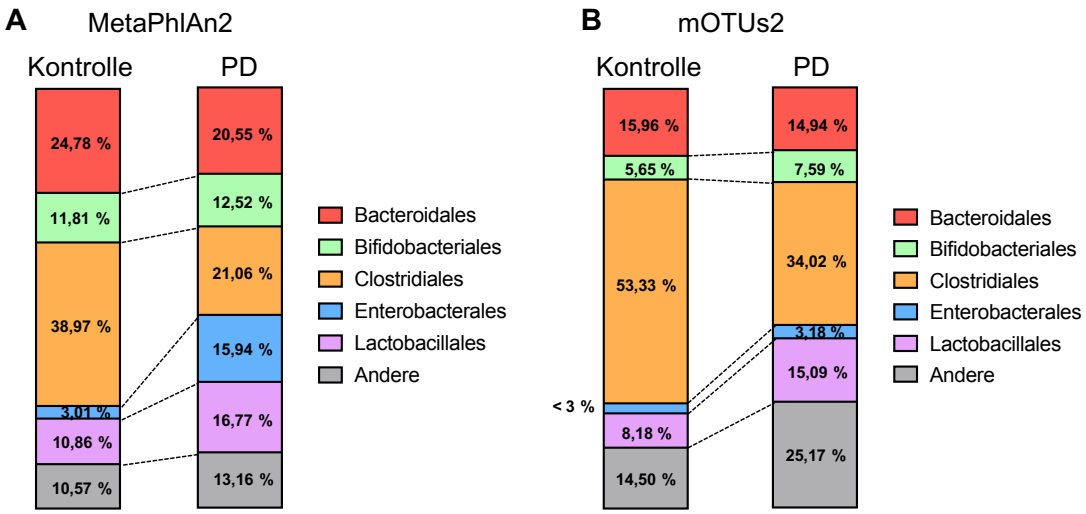

Abbildung 7: Zusammensetzung des Darmmikrobioms auf taxonomischer Ebene der Ordnung. Angegeben ist der prozentuale Anteil der jeweiligen Ordnungen im Darmmikrobiom von Patienten mit M. Parkinson (PD) und gesunden Kontrollprobanden, welche auf Basis der MetaPhlAn2 (**A**) oder mOTUs2 (**B**) Daten berechnet wurde.

Sowohl bei der Analyse der MetaPhlAn2 (**Abb. 7 A**) als auch der mOTUs2 (**Abb. 7 B**) Daten wurden in beiden Gruppen Bakterien detektiert, welche größtenteils fünf verschiedenen Ordnungen zugeordnet werden konnten. Bei der Gegenüberstellung der prozentualen Anteile der verschiedenen Ordnungen im Darmmikrobiom von Parkinson-Patienten und gesunden Kontrollprobanden ließen sich deutliche Unterschiede hinsichtlich der Abundanz der jeweiligen Ordnungen erkennen. Im Darmmikrobiom der Parkinson-Patienten konnten vermehrt die Ordnung Bifidobacteriales, Enterobacterales und Lactobacillales gefunden werden. Der Unterschied von Enterobacteriales mit 3,01 % zu 15,94 % (**Abb. 7 A**) und Lactobacillales mit 8,18 % zu 15,09 % (**Abb. 7 B**) bei den Parkinson-Patienten war dabei vergleichsweise am höchsten. Darüber hinaus konnten bei Patienten mit M. Parkinson weniger Bakterien der Ordnungen Bacteriodales und vor allem Clostridiales gefunden werden. Bei Clostridiales war der prozentuale Anteil im Vergleich zu den gesunden Probanden fast auf die Hälfte von 38,97 % auf 21,06 % (**Abb. 7 A**) und 53,33 % auf 34,02 % (**Abb. 7 B**) reduziert.

Auf taxonomischer Ebene der Familie ließen sich ebenfalls deutliche Unterschiede in der Zusammensetzung des Darmmikrobioms von Parkinson-Patienten und gesunden Kontrollprobanden erkennen (**Abb. 8**).

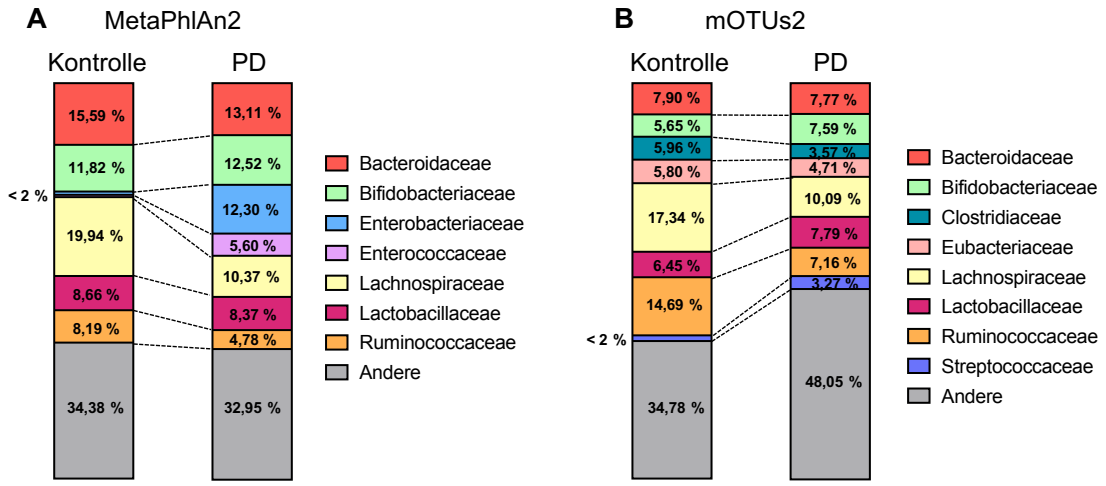

Abbildung 8: Zusammensetzung des Darmmikrobioms auf taxonomischer Ebene der Familie. Angegeben ist der prozentuale Anteil der jeweiligen Familien im Darmmikrobiom von Patienten mit M. Parkinson (PD) und gesunden Kontrollprobanden, welche auf Basis der MetaPhlAn2 (**A**) oder mOTUs2 (**B**) Daten berechnet wurde.

Bei der Analyse des prozentualen Anteils der verschiedenen Bakterienfamilie im Darmmikrobiom ist vor allem die erhöhte Abundanz von Enterobacteriaceae und Enterococcaceae sehr auffällig. In den Kontrollprobanden waren lediglich jeweils unter 1 % der detektierten Bakterien diesen Familien zuzuordnen, wohingegen sie in den Parkinson-Patienten 12,30 % bzw. 5,60 % der unterschiedlichen Familien im Darmmikrobiom ausmachten (**Abb. 8 A**). Das vermehrte Vorkommen der beiden Familien konnte jedoch lediglich in den MetaPhlAn2, nicht jedoch in den mOTUs2 Daten detektiert werden. Anders herum konnte in den mOTUs2 Daten ein verringertes Vorkommen der Familien Clostridiaceae und Eubacteriaceae sowie eine erhöhte Abundanz von Streptococcaceae detektiert werden, welche in den MetaPhlAn2 Daten nicht gefunden werden konnte (**Abb. 8 B**). Alle anderen Familien wurden mit Hilfe beider Tools identifiziert. Dabei zeigten die Daten einen leicht verringerten Anteil und die mOTUs2 Daten wiederum ein schwach vermehrtes Vorkommen der Familie Lactobacillaceae. Die anderen Familien zeigten jeweils eine ähnliche Richtung hinsichtlich der Abundanz im Darmmikrobiom von Patienten mit M. Parkinson und gesunden Kontrollprobanden. Diese umfasste das vermehrte Auftreten der Familie Bifidobacteriaceae sowie eine verminderte Abundanz von Bakterien aus den Familien Bacteroidaceae, Lachnospiraceae und Ruminococcaceae. Dabei ist vor allem die Reduktion des Anteils Lachnospiraceae von 19,94 % auf 10,37 % (**Abb. 8 A**) sowie von Ruminococcaceae von 14,69 % auf 7,16 % (**Abb. 8 B**) am stärksten.

Als letztes wurde untersucht, ob einzelne Bakterienspezies identifiziert werden können, deren Vorkommen sich signifikant zwischen beiden Gruppen unterscheidet. Tatsächlich konnten mit Hilfe von ALDEx2 die Taxa *Lachnospiraceae* species *incertae sedis* (mOTU_v25_12240, p = 0,017) and *Faecalibacterium prausnitzii* (mOTU_v25_06110, p = 0,019) identifiziert werden, deren Abundanz im Darmmikrobiom von Patienten mit M. Parkinson im Vergleich zu den Kontrollprobanden signifikant reduziert war. Die veränderte Zusammensetzung des Darmmikrobioms auf weiteren taxonomischen Ebenen wurde in **Abb. 9** nochmals zusammengefasst.

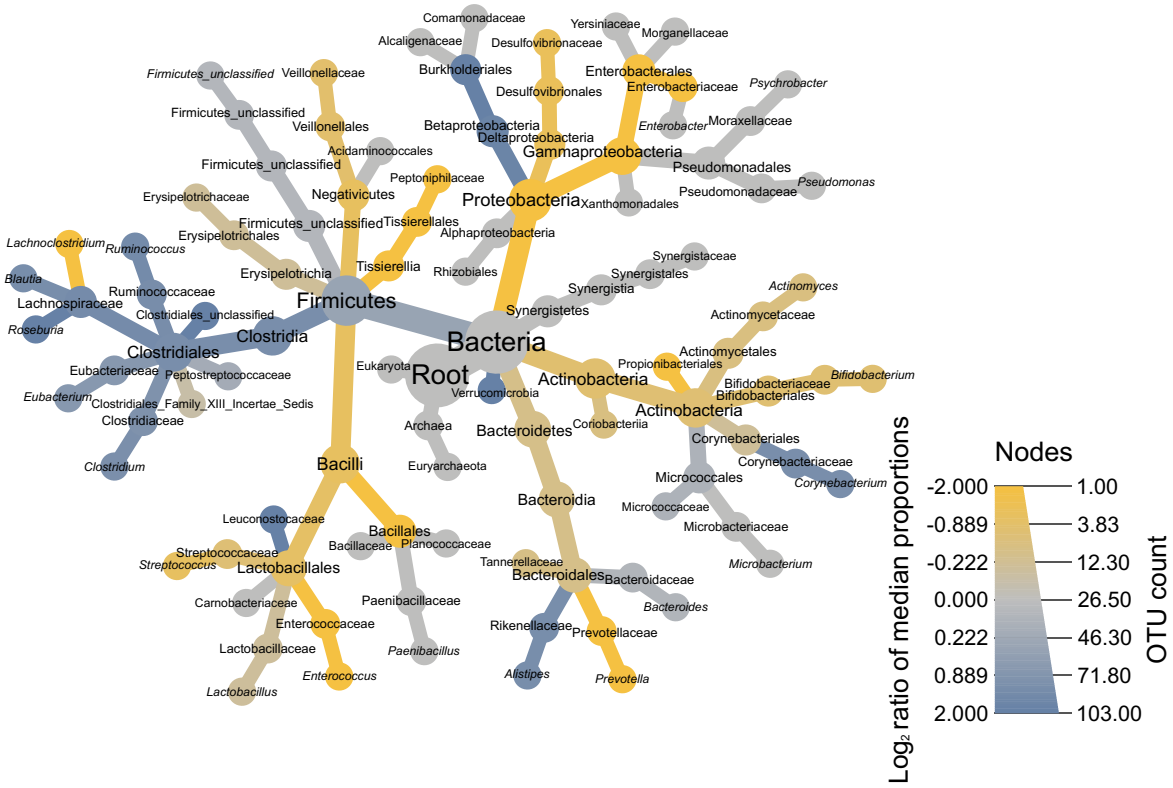

Abbildung 9: Taxonomischer Baum zur Visualisierung der Unterschiede im Darmmikrobiom von Parkinson-Patienten und gesunden Kontrollprobanden.
Dargestellt ist die Anzahl der operativen taxonomischen Einheiten (*operative taxonomic unit*, OTU) pro Taxon, sichtbar durch den Radius sowie der Unterschied sichtbar durch die Färbung, zwischen Parkinson-Patienten und gesunden Kontrollprobanden. Eine gelbe Färbung kennzeichnet eine erhöhte Abundanz der entsprechenden Taxa, eine blaue Färbung hingegen eine verringerte Abundanz der jeweiligen Taxa im Darmmikrobiom der Parkinson-Patienten. Eine graue Färbung weist auf keine gruppenspezifischen Unterschiede hin.

Die Ergebnisse haben gezeigt, dass sich das Darmmikrobiom von Parkinson-Patienten und gesunden Kontrollprobanden deutlich voneinander unterscheidet. Auf Basis dieser Ergebnisse sowie ähnlichen oder besonders bemerkenswerten Beobachtungen aus der Literatur wurden verschiedene Bakterien aus den Ordnungen Lactobacillales und Enterobacterales für die anschließenden Versuche ausgesucht. Der nächste Teil thematisiert daher im Folgenden die Bakterien *Lacticaseibacillus casei* (*L. casei*), *Enterococcus faecalis* (*E. faecalis*) und *Proteus mirabilis* (*P. mirabilis*).

Teil II: Einfluss von BEVs und BEV-RNA auf die Genexpression in eukaryotischen Zellen

4.3 Wachstumsverhalten von *L. casei*, *E. faecalis* und *P. mirabilis*

Um den Einfluss von BEVs sowie der mit ihnen assoziierten RNA, im Folgenden als BEV-RNA bezeichnet, auf eukaryotische Zellen untersuchen zu können, mussten zu Beginn BEVs aus den Überständen der jeweiligen bakteriellen Flüssigkulturen isoliert werden. Dafür wurde zunächst das *in vitro* Wachstumsverhalten von *L. casei*, *E. faecalis* und *P. mirabilis* unter stationären Bedingungen und bei 37 °C über einen Zeitraum von 48 h bzw. 72 h untersucht (**Abb. 10**). Das Wachstum wurde sowohl durch die Messung der OD bei einer Absorption von 600 nm als auch durch die Ermittlung der CFU/ml bestimmt. Ziel dieser Untersuchung war die Identifikation eines geeigneten Zeitpunkts, an dem die bakteriellen Flüssigkulturen für die Isolation von BEVs gesammelt werden sollten.

Es war zu erkennen, dass sich alle drei Bakterien hinsichtlich ihres Wachstums deutlich voneinander unterscheiden. Wie anhand der OD sichtbar ist, zeigten die *L. casei* Kulturen im Zeitraum von 6 h bis 24 h nach Animpfen eine Phase des exponentiellen Wachstums (**Abb. 10 A**). In der postexponetiellen Phase im Zeitraum von 24 h bis 30 h war nur noch ein leichter Zuwachs der OD zu verzeichnen. Ab 30 h nach dem Animpfen traten die Bakterien in die stationäre Phase ein, bei der bis zum Ende des Messzeitraums von 72 h kein weiterer Zuwachs der OD gemessen werden konnte. Auch bei der Messung des Wachstums durch Ermittlung der CFU/ml konnte ein exponentielles Wachstum bis etwa 24 h nach Animpfen gezeigt werden. Die CFU/ml zwischen 24 h und 72 h blieb mit nur leichten Schwankungen konstant. In der stationären Phase, etwa 40 h nach dem Animpfen, wurden rasterelektronenmikroskopische (REM) Aufnahmen der Bakterien gemacht, um die Morphologie der Bakterien zu verifizieren. Es ließ sich zu diesem Zeitpunkt besonders gut die stäbchenförmige Morphologie sowie die charakteristische Ausbildung von Ketten der *L. casei* Bakterien erkennen (**Abb. 10 B**).

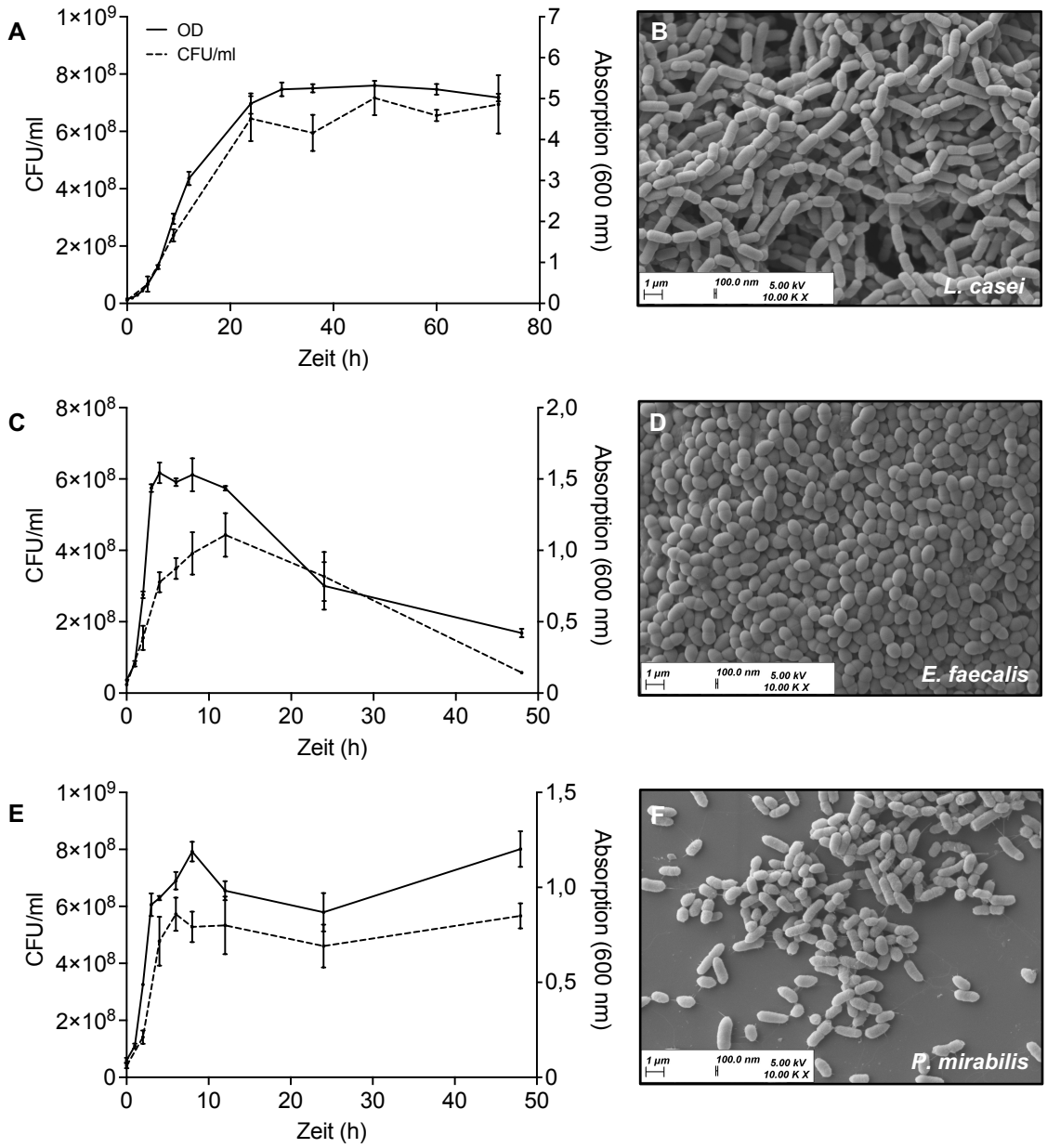

Abbildung 10: Wachstumsverhalten und rasterelektronenmikroskopische Aufnahme der Bakterien.
Dargestellt ist das Wachstumsverhalten von *L. casei* (**A**), *E. faecalis* (**C**) und *P. mirabilis* (**E**) über einen Zeitraum von 72 h bzw. 48 h. Das Wachstum wurde durch die Messung der Absorption bei 600 nm (OD) und die Bestimmung der CFU/ml an den gekennzeichneten Zeitpunkten ermittelt. Angegeben sind Mittelwerte sowie Standardabweichungen von 3-4 unabhängigen Experimenten. Für die rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen wurden die Bakterien für 40 h (*L. casei*, **B**) oder 12 h (*E. faecalis*, **D**; *P. mirabilis*, **F**) kultiviert. Die Bilder wurden bei 10.000x Vergrößerung aufgenommen. Größenstandard: 1 µm

Anders als bei den *L. casei* Kulturen zeigten die Kulturen von *E. faecalis* bereits im Zeitraum von 1 h bis 3 h nach dem Animpfen eine Phase exponentiellen Wachstums (**Abb. 10 C**). Im Zeitraum von 3 h bis 4 h war bei den *E. faecalis* Kulturen nur noch ein leichter Zuwachs der OD zu verzeichnen. Von 4 h bis etwa 12 h zeigten die Bakterien keinen weiteren Zuwachs und nur leichte Schwankungen in der OD. Nach 24 h bzw. 48 h war hingegen eine fortschreitende Verminderung der OD messbar, die darauf schließen ließ, dass die

Bakterien im Zeitraum zwischen 12 h und 24 h in die Absterbephase eingetreten sind. Bei der Bestimmung der CFU/ml zeigte sich ein ähnliches Muster. Lediglich im Zeitraum von 4 h bis 12 h konnte bei der Messung der CFU/ml noch eine geringe Zunahme des Bakterienwachstums verzeichnet werden. Allerdings war ab 24 h nach Animpfen ebenfalls eine Abnahme der CFU/ml messbar, welche den Eintritt der Bakterien in die Absterbephase bestätigt. Die REM Aufnahmen zeigten, die typische Morphologie der Kokken, die paarweise oder in Ketten angeordnet sein können (**Abb. 10 D**).

Wie *E. faecalis* zeigten auch die Kulturen von *P. mirabilis* im Zeitraum von 1 h bis 3 h nach dem Animpfen eine Phase des exponentielle Wachstums (**Abb. 10 E**). Im Zeitraum von 3 h bis 8 h war bei den Kulturen ein etwas geringerer Zuwachs der OD zu verzeichnen. Auffällig war zudem, dass zwischen 8 h bis 24 h nach Animpfen eine leichte Verminderung der OD und nach 48 h ein leichter Zuwachs der OD gemessen werden konnte. Im Vergleich dazu konnte bei der Untersuchung des Wachstumsverhaltens durch Ermittlung der CFU/ml ein verminderter Zuwachs der CFU/ml etwa 4 h bis 6 h nach Animpfen der *P. mirabilis* Kulturen beobachtet werden. Die CFU/ml blieb dann über den restlichen Messzeitraum bis 48 h relativ konstant, weswegen davon ausgegangen werden kann, dass sich die Bakterien in diesem Zeitraum in der stationären Phase des Wachstums befunden haben. Wie auch für *E. faecalis* wurden für *P. mirabilis* nach 12 h rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen der Bakterien gemacht. Die REM Aufnahmen zeigten dabei gut die stäbchenförmige Morphologie der Bakterien (**Abb. 10 F**).

Auf Basis des Wachstumsverhaltens wurde im Folgenden ein Kultivierungszeitraum für die drei Bakterien festgelegt, nach dem die Überstande für die Isolation der BEVs gesammelt wurden. Der Zeitpunkt sollte dabei zu Beginn der stationären Phase des Bakterienwachstums gewählt werden, um eine hohe Dichte an lebenden Bakterien zu erzielen. Anhand der Wachstumskurven ergaben sich daraus Kultivierungszeiträume von 40 h für *L. casei* Kulturen, 6 h für *E. faecalis* Kulturen und 9 h für *P. mirabilis* Kulturen.

4.4 Charakterisierung von BEVs

Ausgehend von den bakteriellen Flüssigkulturen, die entsprechend den oben festgelegten Zeiten gewachsen sind, wurden die Überstande wie in **3.2.1.1.3** beschrieben gesammelt, die BEVs über Ultrazentrifugation pelletiert und im Anschluss über SEC aufgereinigt. Dies war besonders wichtig, um bei der Ultrazentrifugation pelletierte freie Proteine von den BEVs zu trennen. Zur Überprüfung der erfolgreichen Trennung sowie der Bestimmung der Proteinkonzentration in den BEV-enthaltenden Fraktionen wurde im Anschluss ein BCA Assay durchgeführt.

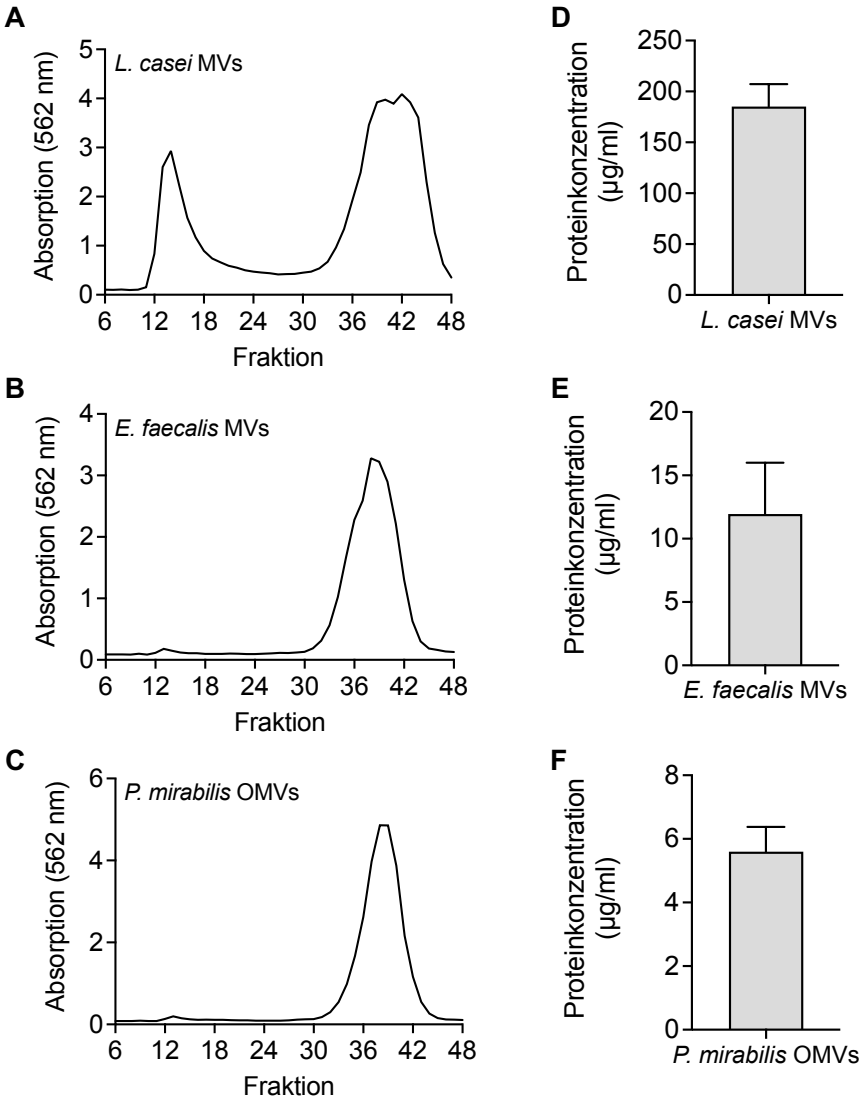

Abbildung 11: Chromatogramme und Proteinkonzentrationen von aufgereinigten BEVs.
Dargestellt ist exemplarisch das Chromatogramm für jedes der drei BEV-Pellets (*L. casei* MVs, **A**; *E. faecalis* MVs, **B**; *P. mirabilis* OMVs, **C**) nach SEC. Eine Fraktion entspricht einem Volumen von 1 ml, das während der SEC als Durchfluss aus der Chromatographiesäule aufgefangen wurde. (**D**,**E** und **F**) Die Proteinkonzentrationen wurden anhand der höchsten Absorptionswerte in den BEV-Fraktionen ermittelt. Angegeben sind Mittelwerte sowie Standardabweichungen von 6-8 unabhängigen Experimenten.

Abb. 11 A, **B** und **C** zeigen beispielhaft die Ergebnisse des BCA Assays als Chromatogramme, in denen die Absorptionswerte bei 562 nm in den entsprechenden aufgefangenen Fraktionen während der SEC dargestellt sind. In allen drei Chromatogrammen ließen sich zwei verschiedene Bereiche mit erhöhten Absorptionswerten identifizieren. Der erste Bereich befand sich zwischen Fraktion 12 bis 15 und der zweite war zwischen Fraktion 32 und 46 erkennbar. Die BEVs waren dabei im ersten Bereich lokalisiert, da sie größer sind und deshalb früher aus der Chromatographiesäule eluieren als die freien Proteine. Das Chromatogramm zeigte somit die erfolgreiche Trennung von BEVs und freien Proteinen aus dem Pellet nach Ultrazentrifugation. Weiterhin war sichtbar, dass die Absorptionswerte der aufgereinigten MVs von *L. casei* (**Abb. 11 A**) deutlich höher waren als die der *E. faecalis* MVs (**Abb. 11 B**)

oder *P. mirabilis* OMVs (**Abb. 11 C**). Entsprechend zeigten auch die korrespondierenden Proteinkonzentrationen, die sich anhand der Absorptionswerte im Rahmen des BCA Assays ermitteln ließen, große Unterschiede. Die Proteinkonzentration von *L. casei* MVs lag im Durchschnitt bei 185,22 ± 21,94 µg/ml (**Abb. 11 D**). MVs von *E. faecalis* wiesen hingegen eine Proteinkonzentration von 11,94 ± 4,05 µg/ml (**Abb. 11 E**) auf und die niedrigste Proteinkonzentration zeigten OMVs von *P. mirabilis* mit 5,60 ± 0,78 µg/ml (**Abb. 11 F**). Die Ergebnisse des BCA Assays ließen darauf schließen, dass sich auch die Konzentration der BEVs unterscheidet. Um dies zu überprüfen, wurde im Folgenden die Partikelkonzentration und -größe mittels NTA bestimmt (**Abb. 12 A, B und C**). Für die nachfolgenden Messungen wurden die BEV-Fraktionen mit den höchsten Proteinkonzentrationen, die mit Hilfe des BCA Assays ermittelt wurden, verwendet.

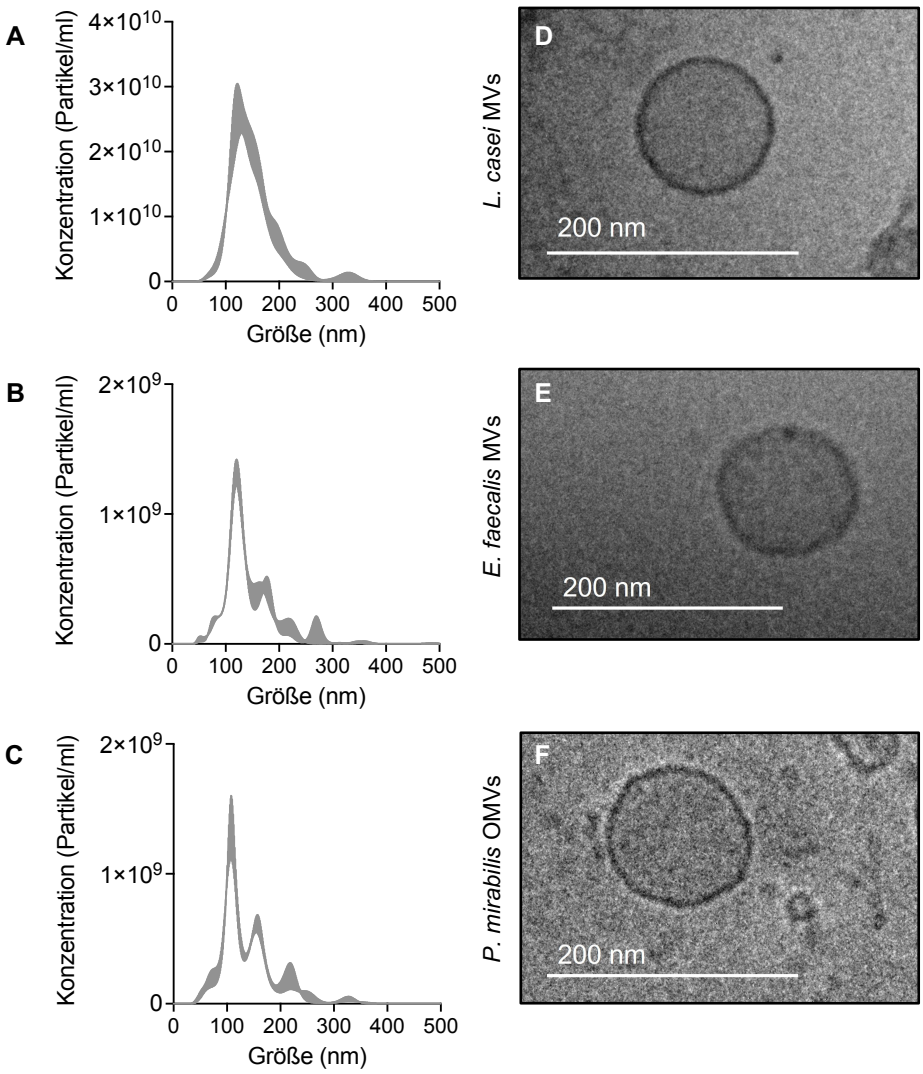

Abbildung 12: Größenverteilung und Kryo-TEM Aufnahmen von BEVs.
Dargestellt ist die Größenverteilung der aufgereinigten BEVs. Angegeben sind die Mittelwerte sowie Standarderror von drei Messungen einer exemplarischen Probe *L. casei* MVs (**A**), *E. faecalis* MVs (**B**) und *P. mirabilis* OMVs (**C**). (**D**, **E** und **F**) Die Kryo-TEM Aufnahmen zeigen beispielhaft die BEVs der verschiedenen Bakterien. Größenstandard: 200 nm

In **Abb. 12** ist exemplarisch die Größenverteilung der aufgereinigten *L. casei* MVs (**Abb. 12 A**), *E. faecalis* MVs (**Abb. 12 B**) und *P. mirabilis* OMVs (**Abb. 12 C**) dargestellt. In Übereinstimmung mit den Ergebnissen des BCA Assays zeigten *L. casei* MVs die höchste Partikelkonzentration. Weiterhin war zu erkennen, dass der Großteil der Partikel aller drei BEVs eine Größe von etwa 100 - 200 nm aufwies. Eine weitere Methode, um neben der Größe auch die Morphologie der BEVs zu untersuchen, ist die Kryo-Transmissionselektronenmikroskopie. Die Kryo-TEM Aufnahmen bestätigten eine ähnliche Größenverteilung von 100 - 200 nm und ließen zudem die charakteristischen runden Strukturen der BEVs erkennen (**Abb. 12 D**, **E** und **F**).

Wie bereits erwähnt, waren die Kultivierungszeiten der Bakterien vor Isolation der BEVs aus den Kulturüberständen sehr unterschiedlich und orientierten sich am jeweiligen ermittelten Wachstumsverhalten der Bakterien in ihrem entsprechenden Kulturmedium. Vor allem bei *E. faecalis* war die Kultivierungszeit mit nur 6 h relativ kurz. Um zu überprüfen, ob es sich bei den aufgereinigten BEVs tatsächlich um Vesikel bakteriellen Ursprungs handelt, wurde im Folgenden aus dem Kulturmedium der Bakterien ebenfalls Partikel über Ultrazentrifugation isoliert. Das Kulturmedium, welches für diese Untersuchung verwendet wurde, hatte keinen Kontakt zu den Bakterien und wird deshalb nachfolgend als unkonditioniertes Medium bezeichnet. Partikel aus dem unkonditionierten Medium wurden auf die gleiche Weise isoliert wie bereits für die bakteriellen Kulturüberstände, im Folgenden als konditioniertes Medium bezeichnet, beschrieben wurde. Nach der Aufreinigung über SEC wurden die bereits für die BEVs beschriebenen Assays zur Charakterisierung der Partikel aus dem unkonditionierten Medium durchgeführt (**Abb. 13**). In den Chromatogrammen war sichtbar, dass in allen unkonditionierten Medien Partikel vorhanden waren, die ebenfalls in den Fraktionen 12 bis 15 angereichert waren (**Abb. 13 A**, **B** und **C**). Gleichzeitig waren die Absorptionswerte jedoch deutlich niedriger als die der BEVs aus den konditionierten Medien, was auf eine niedrigere Konzentration der Partikel schließen ließ. Dies konnte auch bei der Messung der Partikelkonzentration mittels NTA bestätigt werden (**Abb. 13 D**, **E** und **F**).

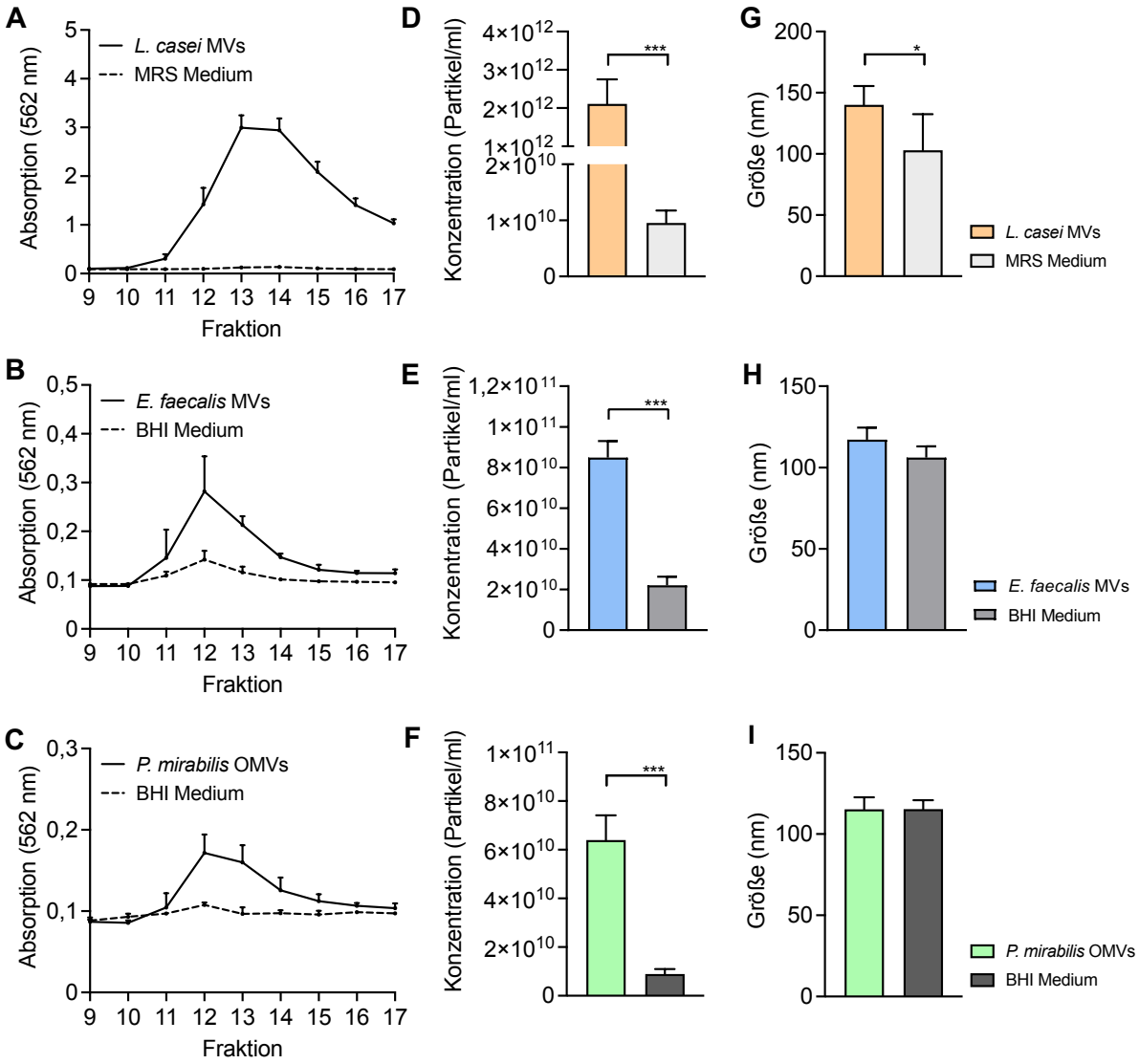

Abbildung 13: Chromatogramme, Konzentrationen und Größe von BEVs und ihrem korrespondierenden unkonditionierten Medium.
Dargestellt sind die Chromatogramme für die BEVs aus dem konditionierten Medium sowie die Partikel aus dem korrespondierenden unkonditionierten Medium (MRS und BHI Medium) nach SEC in den Fraktionen 9 bis 17 (**A**, **B** und **C**). Angegeben sind Mittelwerte und Standardabweichungen von 3-8 unabhängigen Experimenten. Die Partikelkonzentration (**D**, **E** und **F**) sowie -größe (**G**, **H** und **I**) wurden mittels NTA gemessen. Angegeben sind ebenfalls Mittelwerte sowie Standardabweichungen von 3-7 unabhängigen Experimenten. Zur Ermittlung von statistischen Signifikanzen wurden ein zweiseitiger ungepaarter t-Test durchgeführt ($p < 0,05$ *, $p < 0,001$ ***).

Für alle drei Bakterien konnte ein signifikanter Unterschied zwischen der Konzentration der BEVs aus dem konditionierten Medium verglichen mit den Partikeln aus dem unkonditionierten Medium beobachtet werden. Den größten Unterschied zeigten dabei *L. casei* MVs mit $2,11 \times 10^{12} \pm 6,40 \times 10^{11}$ Partikel/ml und die Partikel aus dem MRS Medium mit $9,54 \times 10^{9} \pm 2,21 \times 10^{9}$ Partikel/ml (**Abb. 13 D**). Somit konnten aus dem konditionierten Medium etwa 221,4-mal mehr Partikel isoliert werden als aus dem unkonditionierten Medium. Auch bei den BEVs von *E. faecalis* und *P. mirabilis* konnten signifikante Unterschiede hinsichtlich der Konzentration der Partikel aus dem konditionierten und unkonditionierten BHI Medium

verzeichnet werden. Die Konzentration von *E. faecalis* MVs betrug etwa $8,49 \times 10^{10} \pm 8,20 \times 10^{9}$ Partikel/ml, die aus dem unkonditionierten BHI Medium hingegen nur $2,20 \times 10^{10} \pm 4,30 \times 10^{9}$ Partikel/ml (**Abb. 13 E**). Die Partikelkonzentration unterschied sich damit um das 3,9-fache. Etwas höher war der Unterschied zwischen *P. mirabilis* OMVs und dem unkonditionierten BHI Medium. Dort betrug die Konzentration $6,40 \times 10^{10} \pm 1,02 \times 10^{10}$ Partikel/ml für die OMVs und $8,93 \times 10^{9} \pm 2,08 \times 10^{9}$ Partikel/ml für die Partikel aus dem unkonditionierten BHI Medium, was etwa 7,2-mal mehr Partikel im konditionierten Medium entsprach (**Abb. 13 F**). Hinsichtlich der Partikelgröße zeigten die meisten *L. casei* MVs eine Größe von durchschnittlich 140,03 ± 15,51 nm. Die Partikel aus dem unkonditionierten MRS Medium waren mit 102,97 ± 29,56 nm dagegen signifikant kleiner (**Abb. 13 G**). Anders als bei den *L. casei* MVs war die Größe der *E. faecalis* MVs mit 117,09 ± 7,50 nm im Vergleich zu den Partikeln aus dem unkonditionierten BHI Medium mit 106,10 ± 6,88 nm nicht signifikant unterschiedlich (**Abb. 13 H**). Die Größe von *P. mirabilis* OMVs (115,24 ± 7,36 nm) und den korrespondieren Partikeln aus dem unkonditionierten BHI Medium (115,33 ± 5,54 nm) zeigten ebenfalls keine signifikanten Unterschiede (**Abb. 13 I**).
Zusammenfassend kann aus diesen Daten geschlossen werden, dass ein Teil der Partikel, die aus den konditionierten Medien isoliert und aufgereinigt wurden, ursprünglich Partikel aus dem Kulturmedium waren und damit nicht bakteriellen Ursprungs sind. Allerdings liegt deren Konzentration signifikant unter der der aufgereinigten BEVs. Es ist also davon auszugehen, dass potenzielle Effekte, welche im Folgenden beschrieben werden, mit hoher Wahrscheinlichkeit von den BEVs ausgelöst wurden.

4.5 Internalisierung von BEVs in Caco-2 Zellen

Eine Grundvoraussetzung für die Beeinflussung der Genexpression von eukaryotischen Zellen durch BEVs ist, dass sie mit ihren Empfängerzellen interagieren bzw. von diesen aufgenommen werden. Daher wurde im Folgenden die Internalisierung der drei unterschiedlichen BEVs durch die eukaryotischen Caco-2 Zellen mit Hilfe von zwei verschiedenen Methoden untersucht. Um die Aufnahme der Vesikel in die Zellen sichtbar zu machen, wurde der Fluoreszenzfarbstoff DiI verwendet, der sich in die Lipidmembran der BEVs einlagert. Auf diese Weise war es im Anschluss möglich, die Aufnahme der BEVs in die Caco-2 Zellen zu analysieren. Eine quantitative Aussage zur Interaktion bzw. Internalisierung wurde mit Hilfe der Durchflusszytometrie getroffen. Die Ergebnisse sind in **Abb. 14** dargestellt.

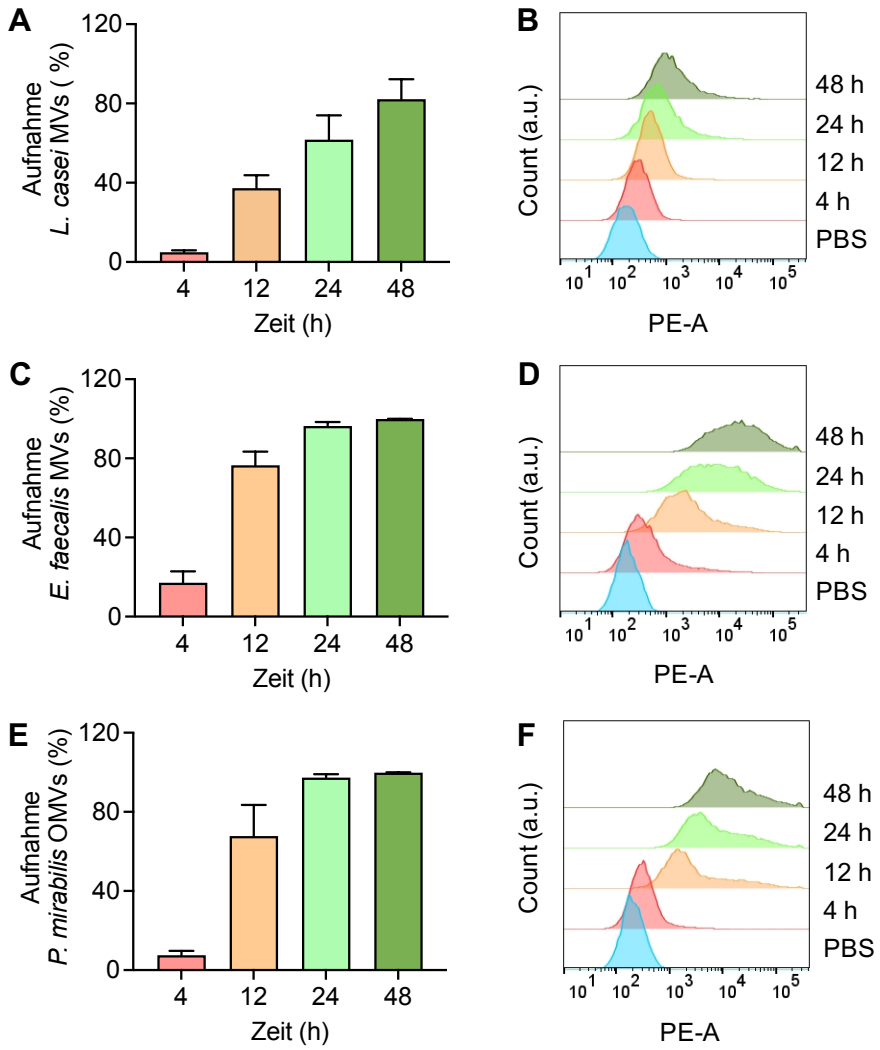

Abbildung 14: Durchflusszytometrische Analyse der Aufnahme von Fluoreszenz-gelabelten BEVs in Caco-2 Zellen.
Die Zellen wurden für 4 h, 12 h, 24 h oder 48 h mit den DiI-gelabelten BEVs inkubiert. Nach Ende der Inkubationszeit wurden die Zellen gewaschen und fixiert. Zur Detektion der DiI-gelabelten BEVs wurde ein Laser bei 561 nm (Phycoerythrin, PE) verwendet. Dargestellt ist der prozentuale Anteil der PE-positiven Zellen nach Inkubation mit den DiI-gelabelten BEVs von *L. casei* (**A**), *E. faecalis* (**C**) oder *P. mirabilis* (**E**). Angegeben sind die Mittelwerte sowie Standardabweichung von 3-4 unabhängigen Experimenten. (**B, D** und **F**) Die repräsentativen Histogramme zeigen die Fluoreszenz der Zellen, die mit den gelabelten BEVs behandelt wurden, im Vergleich zu Zellen, die als Kontrolle mit PBS inkubiert wurden.

Bei einer Konzentration von 6 x 10^5 Partikel/Zelle konnten nach 12 h in 37,3 %, nach 24 h in 61,7 % und nach 48 h in 82,1 % der Zellen ein positives Signal für die DiI-gelabelten MVs von *L. casei* detektiert werden (**Abb. 14 A**). Im Histogramm ist der Anstieg der Fluoreszenz der behandelten Zellen sichtbar, welche auf eine Internalisierung der DiI-gelabelten *L. casei* MVs durch die Caco-2 Zellen schließen lässt (**Abb. 14 B**). Ebenso konnte für die MVs von *E. faecalis* und OMVs von *P. mirabilis* die Internalisierung durch die Caco-2 Zellen detektiert werden. Da die Konzentration der BEVs dieser Bakterien deutlich geringer waren als die von *L. casei*, war auch das Verhältnis von BEVs/Zelle in diesen Fällen geringer. Im Vergleich zu *L. casei* MVs konnten jedoch mehr Caco-2 Zellen detektiert werden, die die MVs von

E. faecalis (4,5 x 10^4 Partikel/Zelle) aufgenommen haben. Hier konnten nach 4 h bereits 17,2 % DiI-positive Caco-2 Zellen gemessen werden. Nach 12 h Inkubation mit den gelabelten MVs zeigten dann 76,5 % und nach 24 h 96,3 % der Zellen ein positives Signal für die DiI-gelabelten MVs von *E. faecalis* (**Abb. 14 C**). Auch im Histogramm ist der starke Anstieg der Fluoreszenz der Caco-2 Zellen zu erkennen (**Abb. 14 D**). Nach Behandlung der Caco-2 Zellen mit den OMVs von *P. mirabilis* (2,5 x 10^4 Partikel/Zelle) zeigten diese nach 4 h und 12 h eine etwas geringere Aufnahme im Vergleich zu *E. faecalis* MVs. Allerdings konnte nach 24 h ebenfalls in 97,3 % der Caco-2 Zellen ein positives Signal für die gelabelten OMVs detektiert werden (**Abb. 14 E und F**). Trotz der Tatsache, dass unterschiedliche Mengen der einzelnen BEVs für die einzelnen Analysen genutzt wurden, wiesen die Ergebnisse darauf hin, dass es Unterschiede hinsichtlich der Geschwindigkeit der Internalisierung von BEVs unterschiedlicher Bakterienspezies geben könnte.

Um im Folgenden die Frage zu klären, ob die Aufnahme der BEVs in die Caco-2 Zellen abhängig von der Konzentration der eingesetzten BEVs ist, wurden die Zellen für 24 h oder 48 h mit unterschiedlichen Verdünnungen gelabelter BEVs inkubiert und die Internalisierung mittels Durchflusszytometrie quantifiziert. Die Ergebnisse zeigen, dass es bei allen drei getesteten BEVs mit steigender Verdünnung zu einer Abnahme der DiI-positiven Caco-2 Zellen kam (**Abb. 15**). Dies bedeutet, dass je höher die Konzentration von BEVs pro Zelle war, desto mehr BEVs konnten von den Caco-2 Zellen aufgenommen werden und umso höher war der Anteil DiI-positiven Zellen. Ein inhibitorischer Effekt auf die Aufnahme durch ein hohes Verhältnis von BEVs pro Zelle konnte bei den getesteten Konzentrationen nicht beobachtet werden.

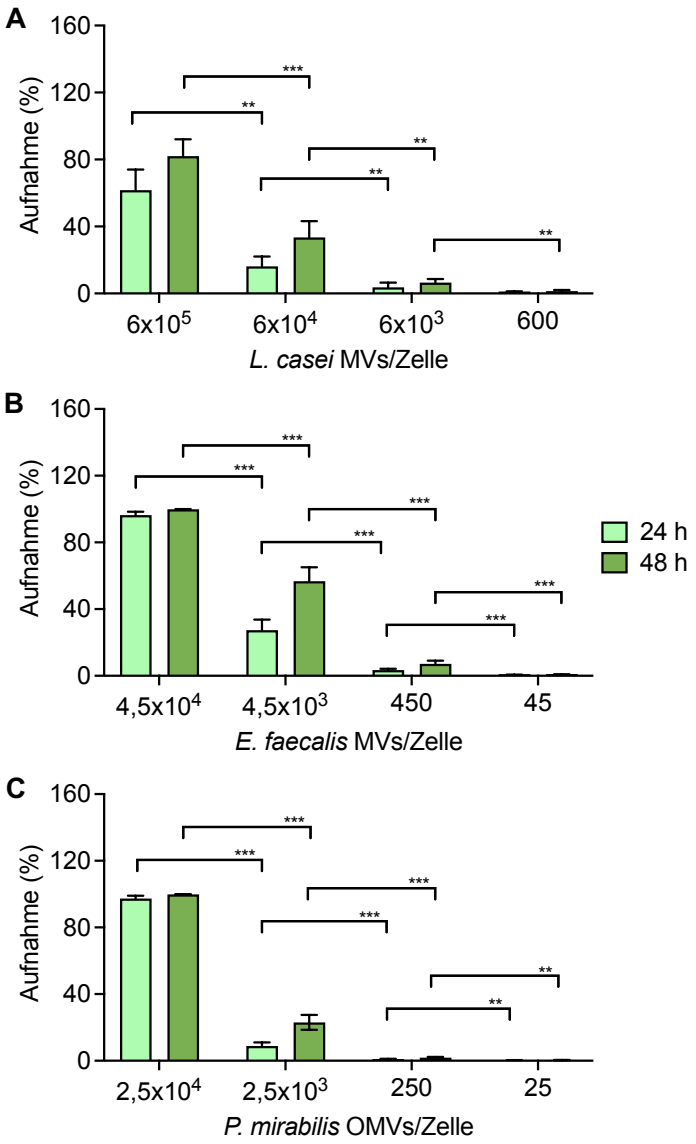

Abbildung 15: Durchflusszytometrische Analyse der Aufnahme von unterschiedlichen Konzentrationen Fluoreszenz-gelabelter BEVs in Caco-2 Zellen.
Die Zellen wurden für 24 h oder 48 h mit unterschiedlichen Konzentrationen DiI-gelabelter BEVs inkubiert. Nach Ende der Inkubationszeit wurden die Zellen gewaschen und fixiert. Zur Detektion der DiI-gelabelten BEVs wurde ein Laser bei 561 nm (Phycoerythrin, PE) verwendet. Dargestellt ist der prozentuale Anteil der PE-positiven Zellen nach Inkubation mit den DiI-gelabelten BEVs von *L. casei* (**A**), *E. faecalis* (**B**) oder *P. mirabilis* (**C**). Angegeben sind die Mittelwerte sowie Standardabweichung von 3-4 unabhängigen Experimenten. Zur Ermittlung von statistischen Signifikanzen wurden ein zweiseitiger ungepaarter t-Test durchgeführt ($p < 0,01$ **, $p < 0,001$ ***).

Die Internalisierung der Fluoreszenz-gelabelten BEVs konnte zudem mit Hilfe der konfokalen Laser-Scanning Mikroskopie (CLSM) verifiziert werden. Dabei bestätigte sich ebenfalls, dass sowohl nach 24 h als auch nach 48 h deutlich weniger DiI-gelabelte *L. casei* MVs (**Abb. 16 A**) als gelabelte *E. faecalis* MVs (**Abb. 17 A**) oder *P. mirabilis* OMVs (**Abb. 18 A**) von den Zellen aufgenommen wurden. Bei der Analyse der Aufnahme von *L. casei* MVs in die Caco-2 Zellen konnten im Durchflusszytometer nach 12 h etwa 37,3 % positive Zellen detektiert werden. Im Gegensatz dazu waren in den CLSM-Aufnahmen nur vereinzelte Stellen sichtbar, an denen ein Signal für die DiI-gelabelten MVs detektiert werden konnte (**Abb. 16 A, Pfeil**).

Dies könnte mit der deutlich höheren Sensitivität des Durchflusszytometers im Vergleich zum CLSM zusammenhängen, sodass ersteres deutlich besser Zellen mit schwacher Fluoreszenz detektieren kann. Im CLSM hingegen sind akkumulierte Signale besser detektierbar. Ein weiterer Grund für die Diskrepanz der Ergebnisse beider Methoden könnte im Prozess der Probenvorbereitung liegen. Die Proben für das CLSM wurden nach der Fixierung für die Färbungen mit Saponin permeabilisiert sowie unspezifische Bindestellen mit BSA blockiert. Zwischen den Fixier- und Färbeschritten lagen zudem mehrere Waschschritte mit PBS. Bei jedem dieser Waschschritte könnte es somit zum Verlust von Signalen wie denen der Fluoreszenz-gelabelten BEVs gekommen sein. Daher wurde zusätzlich untersucht, inwiefern die Probenvorbereitung einen Einfluss auf die Stärke der aufgenommenen Fluoreszenzsignale hatte. Dafür wurden die Caco-2 Zellen direkt nach dem Fixieren im CLSM analysiert. Tatsächlich konnte hier vor allem für die Zellen, die mit *L. casei* oder *E. faecalis* MVs inkubiert wurden, bereits nach 12 h mehr Signal für die DiI-gelabelten BEVs detektiert werden (**Abb. 16 B** und **Abb. 17 B**). In den mit gelabelten *P. mirabilis* OMVs behandelten Zellen konnte unabhängig von der Probenvorbereitung eine optisch ähnliche Signalstärke für das DiI beobachtet werden (**Abb. 18**). Dies könnte darauf hindeuten, dass sich zu den Zeitpunkten möglicherweise bereits mehr *P. mirabilis* OMVs in den Zellen befunden haben, die somit nicht mehr durch die folgenden Waschschritte hätten entfernt werden können. Die BEVs von *L. casei* und *E. faecalis* hingegen könnten vermehrt auf der Außenseite der Plasmamembran gebunden haben, aber noch nicht internalisiert worden sein, wodurch diese eher während der Waschschritte entfernt worden sein könnten. Für alle drei untersuchten BEVs zeigte sich jedoch mit steigender Inkubationszeit deutlich die Akkumulation des Fluoreszenzsignals von DiI in den Zellen und um den Zellkern. Die Spezifität der Signale wurde durch die Negativkontrolle mit PBS gezeigt, die keinerlei Fluoreszenzsignal im entsprechenden Kanal zeigte. (**Abb. 19**).

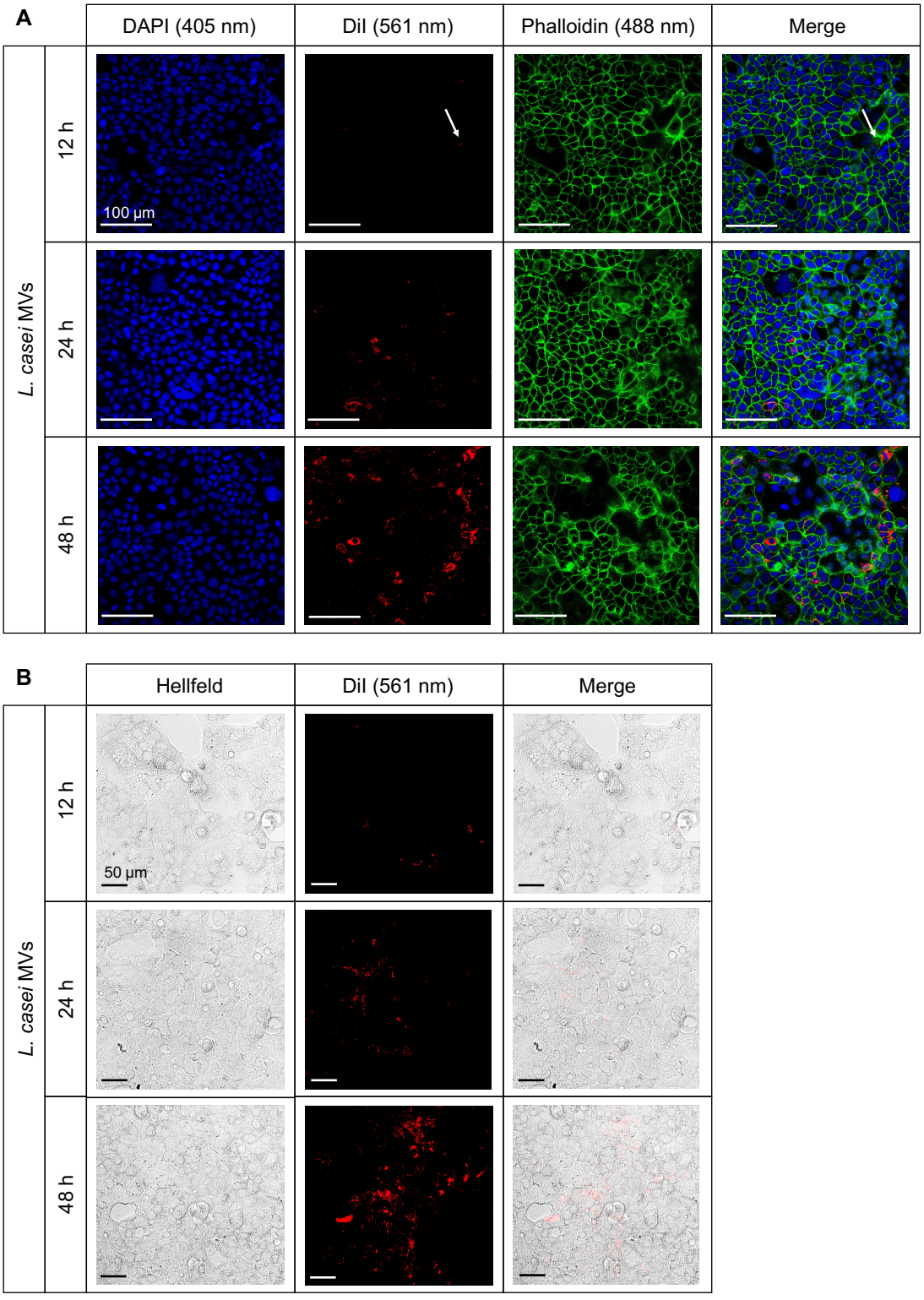

Abbildung 16: Visualisierung der Internalisierung von *L. casei* MVs in Caco-2 Zellen.
Die Zellen wurden für 12 h, 24 h oder 48 h mit DiI-gelabelten MVs von *L. casei* inkubiert. (**A**) Nach Ende der Inkubationszeit wurden die Zellen gewaschen, fixiert und permeabilisiert. Das F-Aktin wurde mit Alexa Fluor™ 488 Phalloidin und die Zellkerne mit DAPI angefärbt. DAPI wurde mit einem Diodenlaser bei 405 nm (Blau), Alexa Fluor™ 488 Phalloidin mit einem Argonlaser bei 488 nm (Grün) und DiI mit einem DPSS Laser bei 561 nm (Rot) sichtbar gemacht. Der weiße Pfeil kennzeichnet einen Bereich, in dem schwache Signale für die DiI-gelabelten MVs detektiert werden konnten. Größenstandard: 100 µm. (**B**) Nach Ende der Inkubationszeit wurde die Zellen gewaschen und fixiert. Die Zellen wurden anschließend im Hellfeld und das DiI mit einem DPSS Laser bei 561 nm (Rot) sichtbar gemacht. Größenstandard: 50 µm

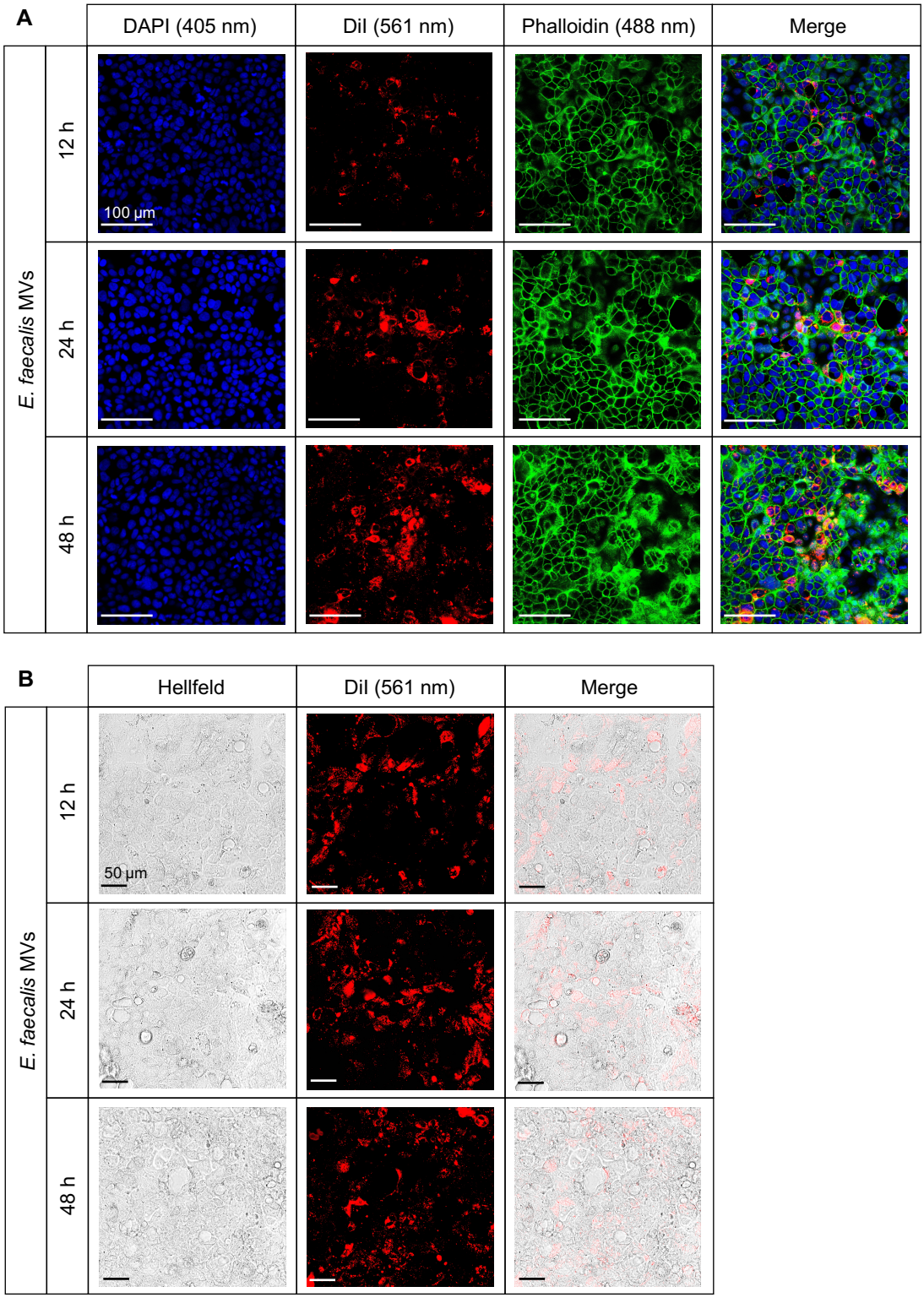

Abbildung 17: Visualisierung der Internalisierung von *E. faecalis* MVs in Caco-2 Zellen.
Die Zellen wurden für 12 h, 24 h oder 48 h mit DiI-gelabelten MVs von *E. faecalis* inkubiert. (**A**) Nach Ende der Inkubationszeit wurden die Zellen gewaschen, fixiert und permeabilisiert. Das F-Aktin wurde mit Alexa Fluor™ 488 Phalloidin und die Zellkerne mit DAPI angefärbt. DAPI wurde mit einem Diodenlaser bei 405 nm (Blau), Alexa Fluor™ 488 Phalloidin mit einem Argonlaser bei 488 nm (Grün) und DiI mit einem DPSS Laser bei 561 nm (Rot) sichtbar gemacht. Größenstandard: 100 µm. (**B**) Nach Ende der Inkubationszeit wurde die Zellen gewaschen und fixiert. Die Zellen wurden anschließend im Hellfeld und das DiI mit einem DPSS Laser bei 561 nm (Rot) sichtbar gemacht. Größenstandard: 50 µm

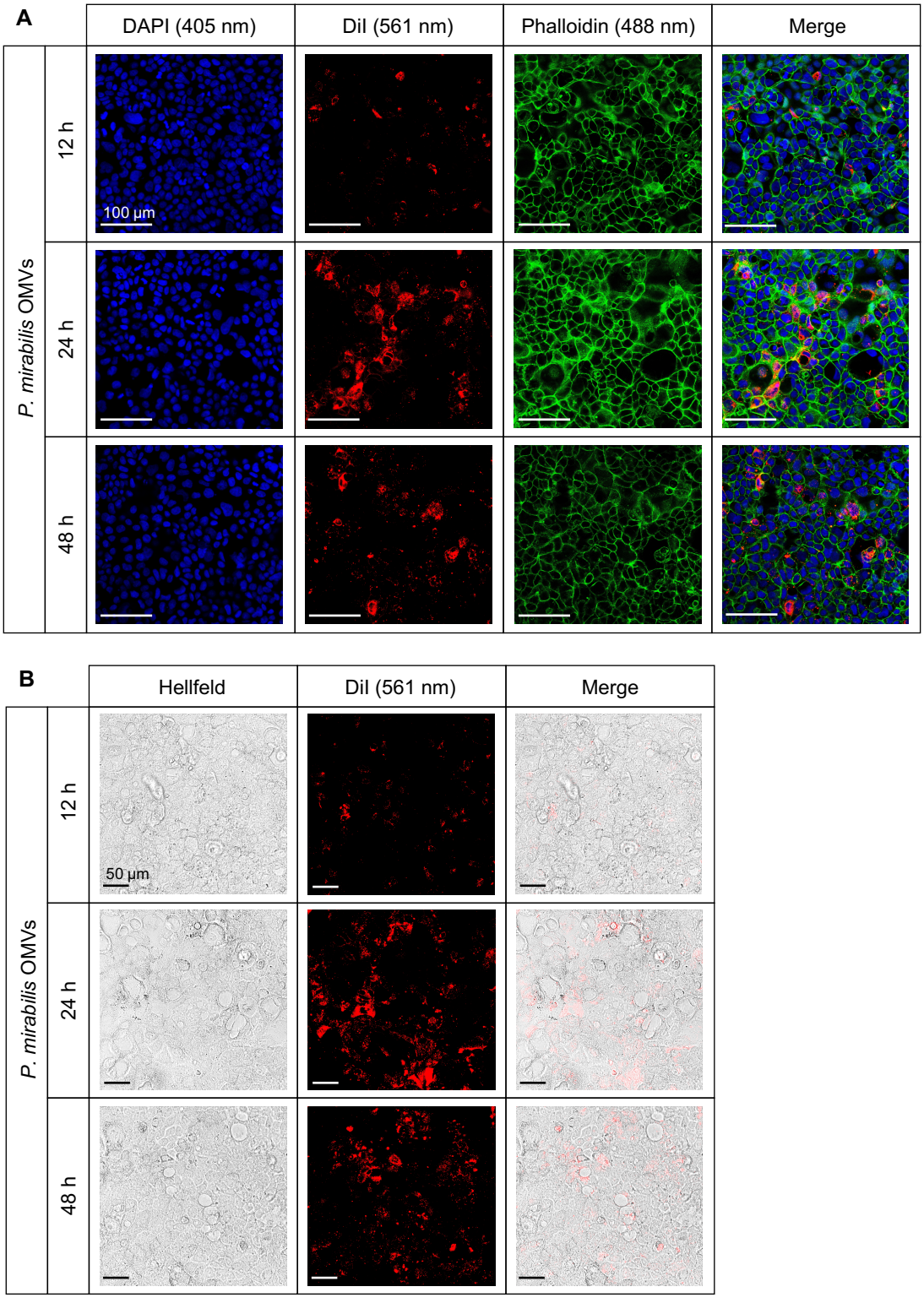

Abbildung 18: Visualisierung der Internalisierung von *P. mirabilis* OMVs in Caco-2 Zellen. Die Zellen wurden für 12 h, 24 h oder 48 h mit DiI-gelabelten OMVs von *P. mirabilis* inkubiert. (**A**) Nach Ende der Inkubationszeit wurden die Zellen gewaschen, fixiert und permeabilisiert. Das F-Aktin wurde mit Alexa Fluor™ 488 Phalloidin und die Zellkerne mit DAPI angefärbt. DAPI wurde mit einem Diodenlaser bei 405 nm (Blau), Alexa Fluor™ 488 Phalloidin mit einem Argonlaser bei 488 nm (Grün) und DiI mit einem DPSS Laser bei 561 nm (Rot) sichtbar gemacht. Größenstandard: 100 µm. (**B**) Nach Ende der Inkubationszeit wurde die Zellen gewaschen und fixiert. Die Zellen wurden anschließend im Hellfeld und das DiI mit einem DPSS Laser bei 561 nm (Rot) sichtbar gemacht. Größenstandard: 50 µm

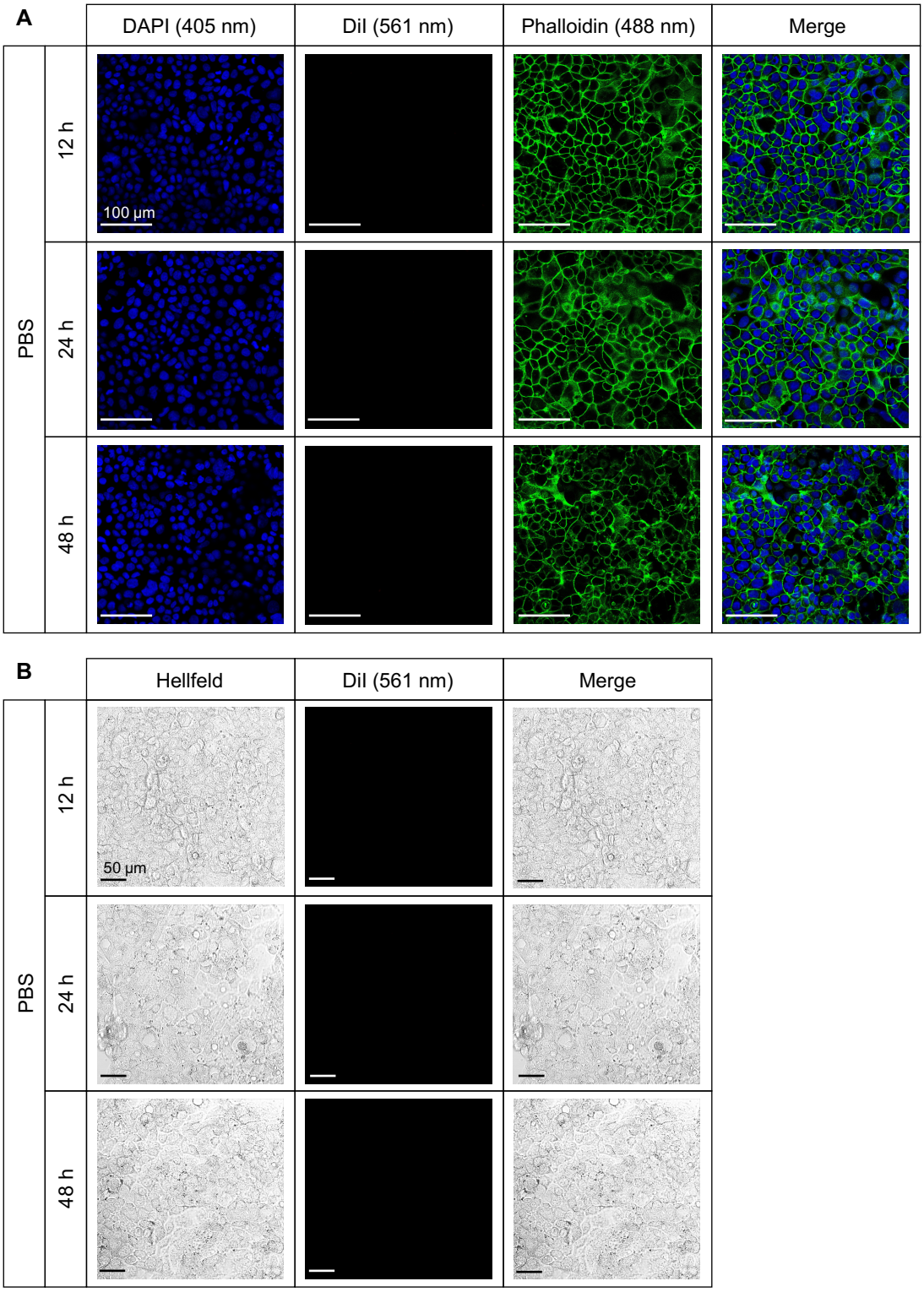

Abbildung 19: Negativkontrolle zum Nachweis der Spezifität der Internalisierungssignale durch Behandlung der Caco-2 Zellen mit PBS.
Die Caco-2 Zellen wurden für 12 h, 24 h oder 48 h mit PBS inkubiert. (**A**) Nach Ende der Inkubationszeit wurden die Zellen gewaschen, fixiert und permeabilisiert. Das F-Aktin wurde mit Alexa Fluor™ 488 Phalloidin und die Zellkerne mit DAPI angefärbt. DAPI wurde mit einem Diodenlaser bei 405 nm (Blau), Alexa Fluor™ 488 Phalloidin mit einem Argonlaser bei 488 nm (Grün) und DiI mit einem DPSS Laser bei 561 nm (Rot) sichtbar gemacht. Größenstandard: 100 µm. (**B**) Nach Ende der Inkubationszeit wurde die Zellen gewaschen und fixiert. Die Zellen wurden anschließend im Hellfeld und das DiI mit einem DPSS Laser bei 561 nm (Rot) sichtbar gemacht. Größenstandard: 50 µm

Die Ergebnisse hinsichtlich der Analyse der Internalisierung von BEVs in Caco-2 Zellen mittels Durchflusszytometrie und CLSM haben gezeigt, dass alle untersuchten BEVs von den Zellen erfolgreich aufgenommen wurden. Die Aufnahme hing dabei sowohl von der Inkubationszeit als auch der Menge der BEVs pro Zelle ab. Hinzu kam zudem, dass auch zwischen den untersuchten Bakterien Unterschiede hinsichtlich der Aufnahme beobachtet werden konnten. Dabei zeigte sich, dass die *L. casei* MVs langsamer von den Caco-2 Zellen aufgenommen wurden als die MVs von *E. faecalis* oder die OMVs von *P. mirabilis*. Aufgrund dieser Resultate wurde eine Inkubationszeit von 48 h bei *L. casei* MVs und 24 h bei *E. faecalis* MVs bzw. *P. mirabilis* OMVs für die folgenden Versuche festgelegt. Diese Zeiträume sollten sicherstellen, dass eine ausreichende Anzahl an Zellen die BEVs aufgenommen hatten, um mögliche transkriptionelle Veränderungen in den Zellen detektieren zu können.

4.6 Einfluss von BEVs auf die Viabilität von Caco-2 Zellen

Im Rahmen der Untersuchung des Effekts von BEVs auf die Genexpression von Caco-2 Zellen wurden zunächst generelle Effekte der BEVs auf die Zellviabilität untersucht. Dies sollte zudem sicherstellen, dass für die Analyse der Genexpression keine für die Zellen toxischen Konzentrationen eingesetzt werden. In dieser Arbeit wurde der Effekt der BEVs auf die Zellen mit zwei verschiedenen Assays untersucht. Zytotoxische Effekte, wie etwa die verstärkte Lyse der Zellen, konnten mit Hilfe des LDH Assays durch Messung der Laktatdehydrogenase-Aktivität detektiert werden. Der PrestoBlue™ Assay, bei dem die Reduktionskraft von lebenden Zellen untersucht wird, diente der Bestimmung der Zellviabilität.

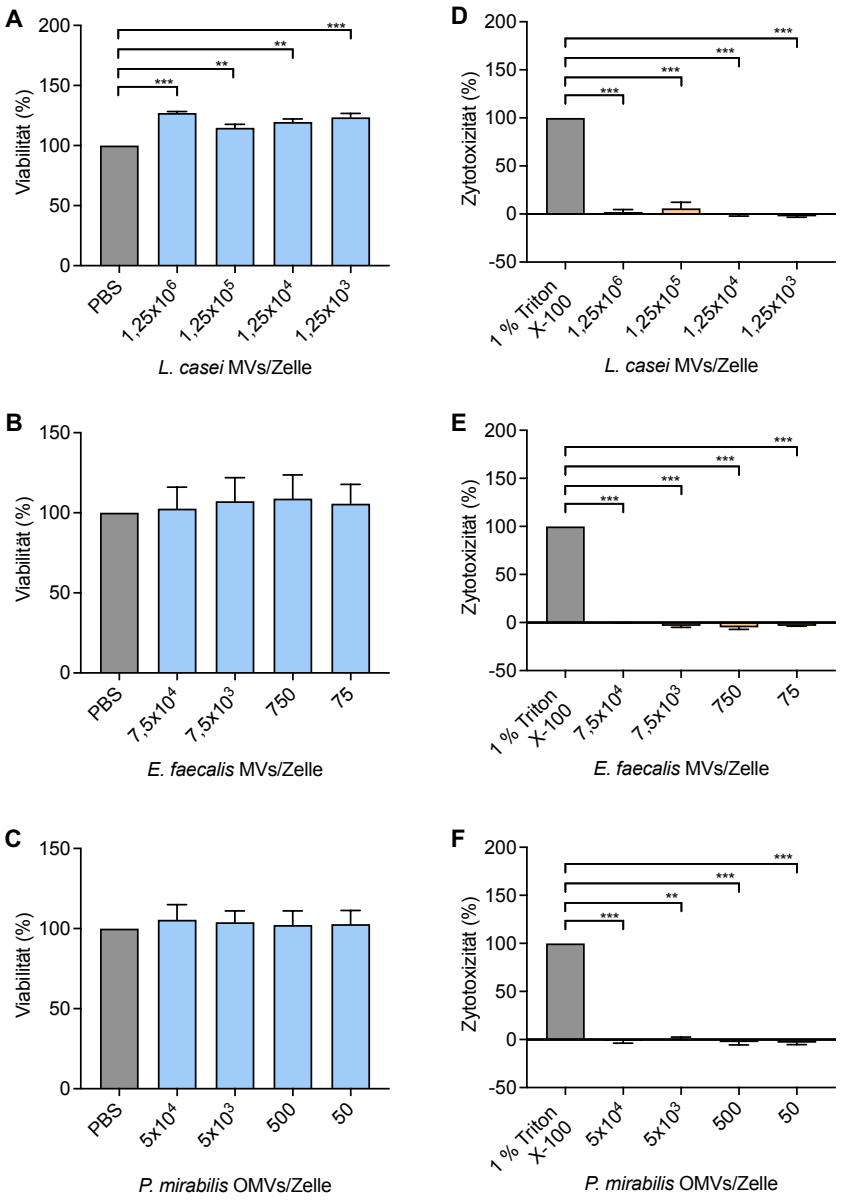

Abbildung 20: Zellviabilität und Zytotoxizität nach Inkubation von Caco-2 Zellen mit BEVs.
Die Zellen wurden für 24 h (*E. faecalis* MVs und *P. mirabilis* OMVs) oder 48 h (*L. casei* MVs) mit unterschiedlichen Konzentrationen BEVs inkubiert. Dargestellt sind die Viabilität der Caco-2 Zellen sowie die Zytotoxizität nach Inkubation mit *L. casei* MVs (**A** und **D**), *E. faecalis* MVs (**B** und **E**) oder *P. mirabilis* OMVs (**C** und **F**). Angegeben sind die Mittelwerte und Standardabweichung von 3-4 unabhängigen Experimenten. Zur Ermittlung von statistischen Signifikanzen wurden ein zweiseitiger ungepaarter t-Test durchgeführt ($p < 0,01$ **, $p < 0,001$ ***).

Wie in **Abb. 20** zu erkennen ist, zeigte keine der getesteten BEV Konzentrationen einen negativen Effekt auf die Viabilität der Zellen (**Abb. 20 A, B und C**) oder einen verstärkte Zelllyse (**Abb. 20 D, E und F**). Tatsächlich konnte nach der Inkubation der Caco-2 Zellen mit MVs von *L. casei* ein Anstieg der Viabilität der Zellen gemessen werden (**Abb. 20 A**). Dieser Effekt blieb bei der Inkubation der Zellen mit *E. faecalis* MVs oder *P. mirabilis* OMVs hingegen aus. Die Ergebnisse zeigen damit, dass die Caco-2 Zellen durch die Inkubation mit den BEVs nicht negativ beeinflusst werden.

4.7 Quantitative und qualitative Analyse von RNA aus BEVs

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit stellte die Untersuchung des Effekts der RNA, welche mit den unterschiedlichen BEVs assoziiert ist, auf die Caco-2 Zellen dar. Dafür wurde zunächst RNA aus den aufgereinigten BEVs isoliert und hinsichtlich ihrer Quantität und Qualität analysiert. In **Abb. 21** ist die RNA-Konzentration in ng/µl sowie die RNA Menge bezogen auf 5 x 10^{10} Partikel dargestellt.

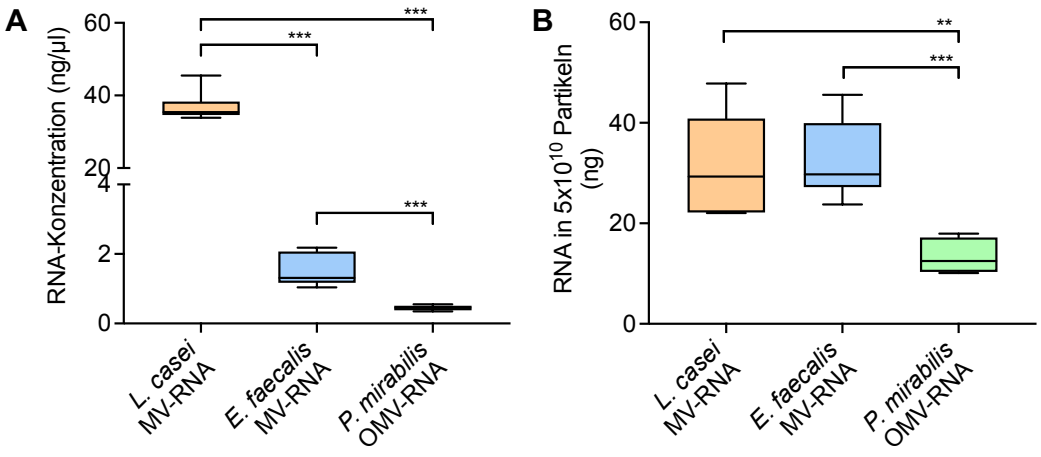

Abbildung 21: Quantitative Analyse der BEV-RNA.
Dargestellt ist die Konzentration der aus den BEVs isolierten RNA (**A**) sowie die RNA-Menge in 5 x 10^{10} Partikeln (**B**) in Box-Whisker-Plots. Die Boxen kennzeichnen das zweite und dritte Quartil der RNA-Konzentration oder -Menge, wobei die horizontale Linie in der Box den Median markiert. Oberer und untere Whisker geben jeweils Minimum und Maximum der RNA-Konzentration oder -Menge aus den jeweiligen BEVs an. Dargestellt sind die Ergebnisse von 6-7 unabhängigen Experimenten. Zur Ermittlung von statistischen Signifikanzen wurden ein zweiseitiger ungepaarter t-Test durchgeführt ($p < 0,01$ **, $p < 0,001$ ***).

Die Konzentration der isolierten RNA aus den *L. casei* MVs lag bei etwa 36,85 ± 3,92 ng/µl und war damit signifikant höher als die Konzentration der RNA aus den *E. faecalis* MVs mit 1,49 ± 0,42 ng/µl oder der *P. mirabilis* OMV-RNA mit 0,45 ± 0,07 ng/µl (**Abb. 21 A**). Ein Grund dafür lag mit großer Wahrscheinlichkeit an der höheren Partikelkonzentration der *L. casei* MVs. Da die RNA immer aus einem definierten Volumen und nicht einer bestimmten Partikelzahl isoliert wurde, könnte dies die großen Unterschiede hinsichtlich der RNA-Konzentration erklären. Um die RNA-Mengen besser miteinander vergleichen zu können, wurde im Anschluss die Menge der isolierten RNA in 5 x 10^{10} Partikel berechnet. Die RNA-Menge, die aus *L. casei* MVs und *E. faecalis* MVs isoliert werden konnte, war dabei sehr ähnlich. Sie lag im Durchschnitt bei etwa 31,55 ± 10,86 ng RNA für *L. casei* MVs und 32,57 ± 7,65 ng RNA für *E. faecalis* MVs in 5 x 10^{10} Partikeln. Die RNA-Menge in der gleichen Anzahl von *P. mirabilis* OMVs war hingegen signifikant niedriger. Dort waren in 5 x 10^{10} Partikeln lediglich etwa 13,41 ± 3,38 ng RNA (**Abb. 21 B**).

Weiterhin wurde auch die Qualität der RNA näher untersucht, um die Größe der unterschiedlichen RNA-Fragmente in der BEV-RNA analysieren zu können. Die Analyse zeigte, dass sich die drei BEVs hinsichtlich der Größe der RNA-Fragmente, die aus ihnen isoliert werden konnten, deutlich unterscheiden. Bei der *L. casei* MV-RNA konnte neben smallRNAs im Bereich bis 200 nt auch weitere RNA-Fragmente mit einer Größe bis zu 2000 nt detektiert werden. Verglichen damit konnten in *P. mirabilis* OMVs lediglich smallRNAs unter einer Länge von 200 nt gefunden werden. Wie bei der *L. casei* MV-RNA konnte auch in der RNA aus *E. faecalis* MVs ein großer Anteil smallRNAs sowie weitere größere RNA-Fragmente detektiert werden. Zusätzlich zeigte die *E. faecalis* MV-RNA zwei charakteristische Peaks im Bereich zwischen 1000-2000 nt und 2000-4000 nt. Es ist davon auszugehen, dass es sich bei diesen Peaks um bakterielle ribosomale RNAs (16S- und 23S-rRNAs) handelt (**Abb. 22 A und B**).

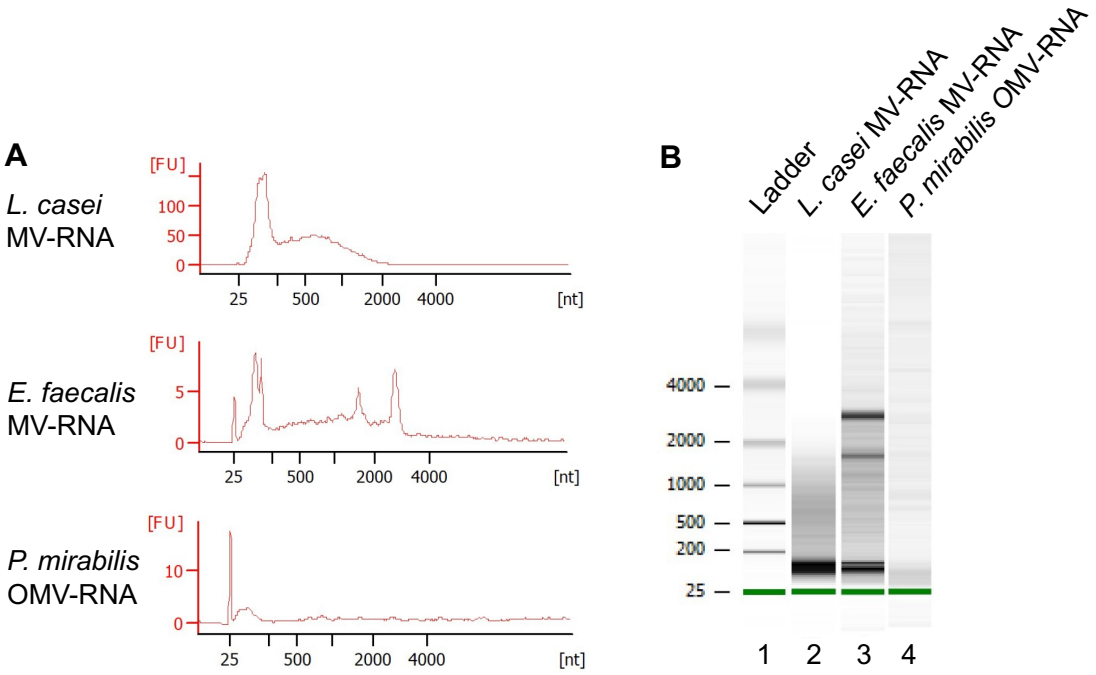

Abbildung 22: Auswertung eines Agilent RNA 6000 Pico Chips für BEV-RNA.
(**A**) Dargestellt sind die Elektropherogramme einer exemplarischen Probe RNA, die aus *L. casei* MVs, *E. faecalis* MVs oder *P. mirabilis* OMVs isoliert wurde. (**B**) Im Gel-ähnlichen Bild ist die Auftrennung der RNA-Fragmente entsprechend ihrer Größe zu sehen. In Spur 1 ist der Größenstandard (Ladder) aufgetragen. Spur 2 – 4 zeigen die jeweiligen BEV-RNA Proben. Der Marker ist in jeder Spur als eine grüne Bande gekennzeichnet.

4.8 Einfluss der Transfektion von BEV-RNA auf die Viabilität von Caco-2 Zellen

Im Folgenden wurde der Effekt der Transfektion der BEV-RNA auf die Viabilität der Caco-2 Zellen untersucht. Wie bereits für die BEVs beschrieben, wurde auch im Rahmen dieser Untersuchung sowohl der LDH Assay zur Analyse zytotoxischer Effekte als auch der PrestoBlue™ Assays zur Überprüfung der Zellviabilität angewandt. Für die Transfektion der BEV-RNA wurde das Transfektionsreagenz Lipofectamine™ 3000 (Invitrogen) gewählt, da es die zu transfizierende Nukleinsäuren über Lipid-Nanopartikel in die Empfängerzellen einbringt und damit EVs im Allgemeinen sehr ähnelt.

Die Auswahl der zu testenden BEV-RNA Mengen, die für die Transfektion eingesetzt wurden, berücksichtigte die Menge der BEVs, die für die nachfolgenden Untersuchungen maximal eingesetzt werden konnten, sowie damit einhergehend der maximalen Menge BEV-RNA, die theoretisch mit den BEVs von den Caco-2 Zellen aufgenommen werden könnte. Darauf folgend wurden für *L. casei* MV-RNA 100 ng, für *E. faecalis* MV-RNA 5 ng und für *P. mirabilis* OMV-RNA 2 ng als maximale zu transfizierende Menge BEV-RNA ausgewählt. Als Kontrolle wurde das Transfektionsreagenz ohne RNA dafür mit Nuklease-freien H_2O, in den nachfolgenden Abbildungen als Vehicle bezeichnet, eingesetzt. Wie für die BEVs bereits beschrieben wurden auch in diesem Versuch die Inkubationszeiten von 24 h für die Transfektion mit *E. faecalis* MV-RNA oder *P. mirabilis* OMV-RNA und 48 h für die Transfektion der Caco-2 Zellen mit *L. casei* MV-RNA eingehalten.

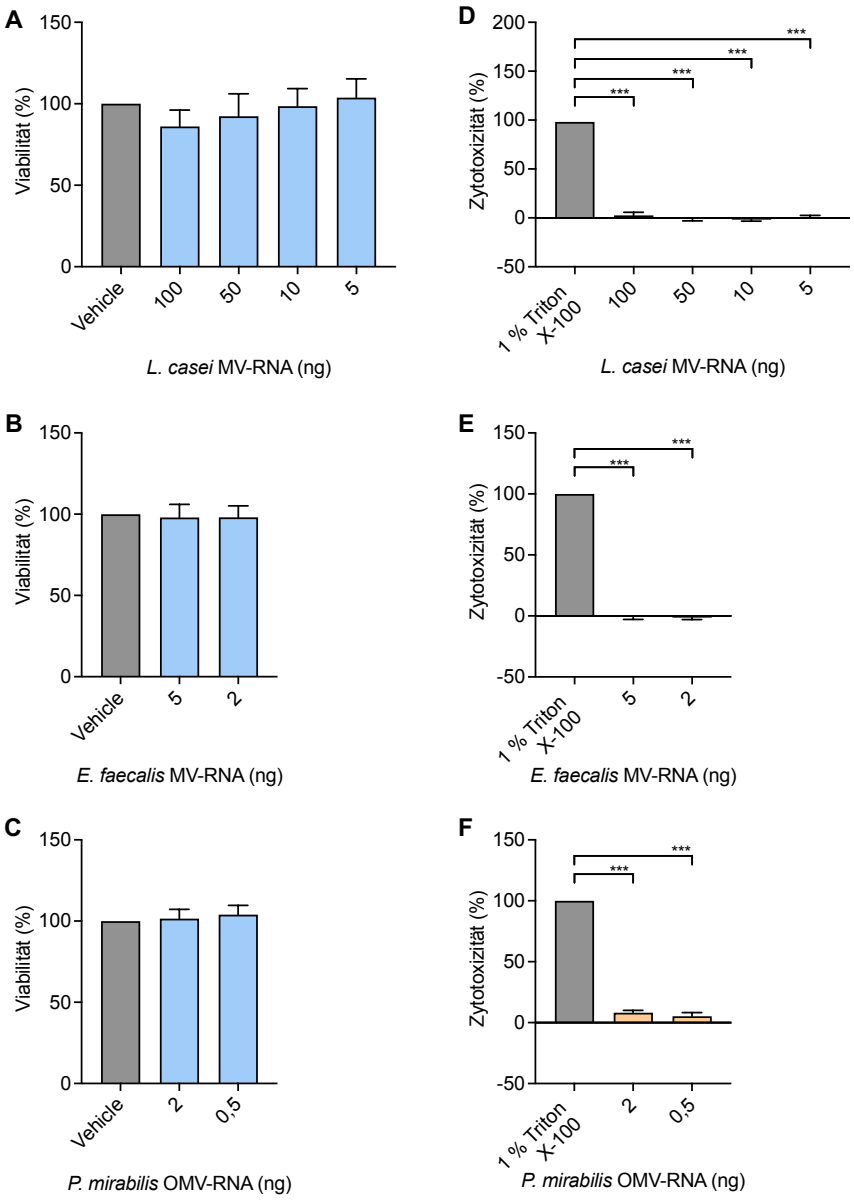

Abbildung 23: Zellviabilität und Zytotoxizität nach Transfektion von Caco-2 Zellen mit BEV-RNA. Die Zellen wurden für 24 h (*E. faecalis* MV-RNA und *P. mirabilis* OMV-RNA) oder 48 h (*L. casei* MV-RNA) mit unterschiedlichen Mengen BEV-RNA transfiziert. Dargestellt sind die Viabilität der Caco-2 Zellen sowie die Zytotoxizität nach Transfektion mit *L. casei* MV-RNA (**A** und **D**), *E. faecalis* MV-RNA (**B** und **E**) oder *P. mirabilis* OMV-RNA (**C** und **F**). Angegeben sind die Mittelwerte und Standardabweichung von 3-4 unabhängigen Experimenten. Zur Ermittlung von statistischen Signifikanzen wurden ein zweiseitiger ungepaarter t-Test durchgeführt ($p < 0{,}001$ ***)

Die Ergebnisse des LDH und PrestoBlue™ Assays zeigen, dass bei keiner der getesteten BEV-RNA Mengen nach Transfektion eine verringerte Zellviabilität (**Abb. 23 A, B und C**) oder eine verstärkte Zelllyse (**Abb. 23 D, E und F**) detektiert werden konnte. Somit kann davon ausgegangen werden, dass die Transfektion der BEV-RNA keinen negativen Einfluss auf die Lebensfähigkeit der Zellen ausübt. Im Folgenden wurde daher beschlossen, dass die jeweils höchste getestete Menge BEV-RNA für die Analyse des Effekts auf das Transkriptom der Caco-2 Zellen eingesetzt werden sollte.

Um verlässlich aussagen zu können, dass eine mögliche Veränderung in der Genexpression der Caco-2 Zellen spezifisch auf die Transfektion der jeweiligen BEV-RNA und nicht auf die Transfektion von RNA im Allgemeinen zurückzuführen ist, wurde als zusätzliche Kontrolle die AllStars *Negative Control* siRNA (ANC) von der Firma Qiagen genutzt. Es handelt sich dabei um eine kleine interferierende RNA (*Small interfering RNA*, siRNA), welche keine Sequenzhomologie zu bekannten humanen Genen aufweist und damit keine direkten Zielgene in humanen Zellen besitzt. Um zunächst sicherzustellen, dass auch die Transfektion der ANC ebenfalls keine Auswirkung auf die Viabilität der Caco-2 Zellen hatte, wurden wiederum der LDH und PrestoBlue™ Assay durchgeführt. Dabei ließ sich erkennen, dass die Transfektion der ANC keinen negativen Effekt auf die Zellviabilität (**Abb. 24 A**) oder eine erhöhte Lyse der Zellen (**Abb. 24 B**) zur Folge hatte. Aufgrund dessen wurde beschlossen, dass die ANC als Kontrolle bei der Analyse des Effekts von BEV-RNA auf die Genexpression von Caco-2 Zellen mit herangezogen werden konnte.

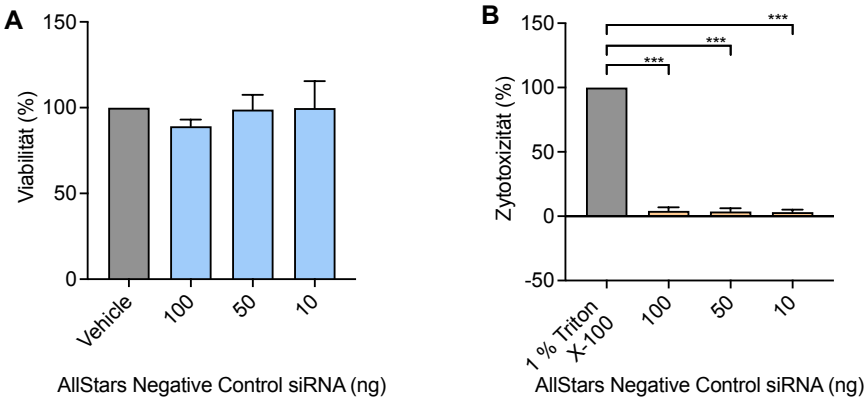

Abbildung 24: Zellviabilität und Zytotoxizität nach Transfektion von Caco-2 Zellen mit AllStars *Negative Control* siRNA.
Die Zellen wurden für 48 h mit unterschiedlichen Mengen ANC transfiziert. Dargestellt sind die Viabilität der Caco-2 Zellen sowie die Zytotoxizität der Transfektion mit der ANC (**A** und **B**). Angegeben sind die Mittelwerte und Standardabweichung von 3-4 unabhängigen Experimenten. Zur Ermittlung von statistischen Signifikanzen wurden ein zweiseitiger ungepaarter t-Test durchgeführt ($p < 0{,}001$ ***)

4.9 Quantifizierung der Endotoxinkonzentration in BEVs und BEV-RNA sowie dessen Einfluss auf die Viabilität von Caco-2 Zellen

Lipopolysaccharide (LPS) sind Bestandteile der äußeren Membran von Gram-negative Bakterien. Sie können von spezifischen Rezeptoren auf der eukaryotischen Zellmembran erkannt werden und so zur Aktivierung von intrazellulären Signalwegen führen (Heumann & Roger, 2002). Da im Rahmen dieser Arbeit mit den OMVs des Gram-negativen Bakteriums *P. mirabilis* gearbeitet wurde, wurde im Folgenden die Endotoxinkonzentration in den OMVs sowie in der aus den OMVs isolierten RNA mit Hilfe des Pierce™ Chromogenic Endotoxin Quant Kit der Firma Thermo Scientific™ gemessen.

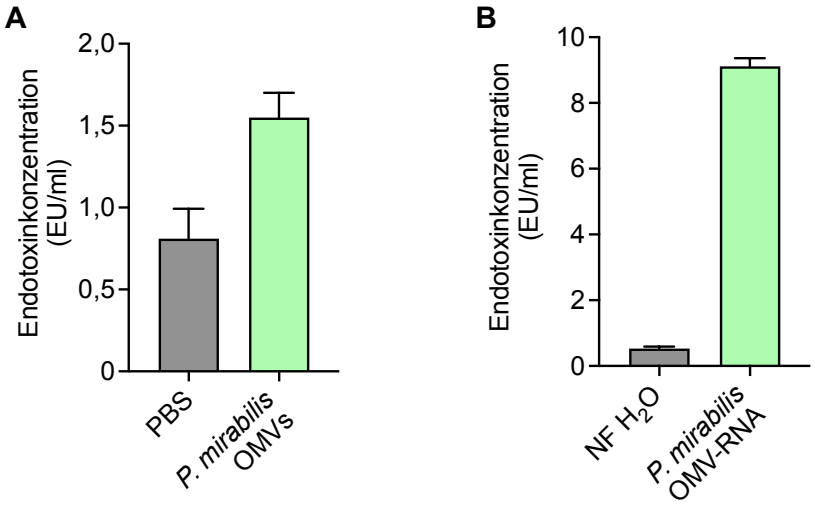

Abbildung 25: Chromogene Messung der Endotoxinkonzentration.
Dargestellt ist die Endotoxinkonzentration in EU/ml in aufgereinigten *P. mirabilis* OMVs (**A**) sowie der OMV-RNA (**B**) im Vergleich zu PBS oder NF H_2O (Nuklease-freies Wasser). Angegeben sind die Mittelwerte und Standardabweichung von 3-4 unabhängigen Experimenten.

Im Vergleich zur PBS-Kontrolle mit 0,81 ± 0,18 EU/ml konnte in den OMVs von *P. mirabilis* eine etwa doppelt so hohe Endotoxinkonzentration von 1,55 ± 0,15 EU/ml gemessen werden (**Abb. 25 A**). Im Gegensatz dazu wurde in der RNA, die aus *P. mirabilis* OMVs isoliert wurde, eine deutlich höhere Endotoxinkonzentration gemessen. Im Vergleich zum Nuklease-freien Wasser (NF H_2O) mit einem Wert von 0,53 ± 0,06 EU/ml war die Endotoxinkonzentration in der *P. mirabilis* OMV-RNA mit 9,11 ± 0,25 EU/ml etwa 17,1-fach höher (**Abb. 25 B**). Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass das LPS während der RNA-Isolation mit aufgereinigt und dadurch aufkonzentriert wurde.

Im Anschluss wurden die Endotoxinkonzentrationen von EU/ml in ng/ml umgerechnet. Damit ergaben sich für die OMVs von *P. mirabilis* eine Endotoxinkonzentration von ca. 0,2 ng/ml und der OMV-RNA von ca. 1 ng/ml. Da nicht ausgeschlossen werden kann, dass das LPS in den OMVs oder der OMV-RNA ebenfalls einen Einfluss auf die Genexpression der Caco-2 Zellen hat, wurde im Zuge dessen aufgereinigtes LPS von *P. mirabilis* (Sigma-Aldrich) als weitere

Kontrolle mit herangezogen. Um sicherzustellen, dass die für den Versuch verwendeten Mengen LPS nicht toxisch für die Caco-2 Zellen sind, wurde wiederum ein LDH und PrestoBlue™ Assay durchgeführt. Dafür wurden zunächst Verdünnungen vom *P. mirabilis* LPS angefertigt und von diesen Verdünnungen entweder 100 µl (0,2 ng/ml) oder 5 µl (1 ng/ml) für die Assays eingesetzt. Damit sollten die entsprechenden Volumina der Proben simuliert werden, die im Rahmen der Inkubation der Caco-2 Zellen mit *P. mirabilis* OMVs (100 µl) oder Transfektion mit *P. mirabilis* OMV-RNA (5 µl) eingesetzt wurden.

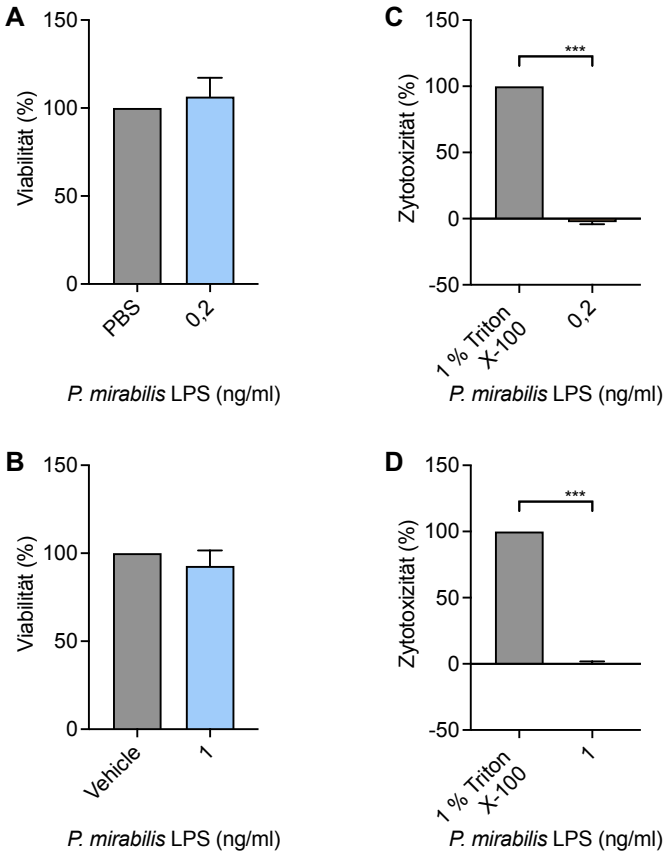

Abbildung 26: Zellviabilität und Zytotoxizität nach Inkubation oder Transfektion von Caco-2 Zellen mit *P. mirabilis* LPS.
Die Zellen wurden für 24 h mit unterschiedlichen Konzentrationen *P. mirabilis* LPS inkubiert oder transfiziert. Dargestellt sind die Viabilität der Caco-2 Zellen sowie die Zytotoxizität der Inkubation (**A** und **C**) oder Transfektion (**B** und **D**) mit *P. mirabilis* LPS. Angegeben sind die Mittelwerte und Standardabweichung von 3-4 unabhängigen Experimenten. Zur Ermittlung von statistischen Signifikanzen wurden ein zweiseitiger ungepaarter t-Test durchgeführt ($p < 0{,}001$ ***).

Im Rahmen der Untersuchung ließ sich keine verringerte Viabilität der Caco-2 Zellen weder nach der Inkubation noch der Transfektion von *P. mirabilis* LPS detektieren (**Abb. 26 A und B**). Darüber hinaus konnte ebenfalls keine erhöhte Lyse der Zellen festgestellt werden (**Abb. 26 C und D**). Das *P. mirabilis* LPS zeigte somit keine generellen negativen Effekte auf die Lebensfähigkeit der Caco-2 Zellen und konnte somit als weitere Kontrolle in den folgenden Versuch mit einbezogen werden.

4.10 Analyse des Transkriptoms von Caco-2 Zellen nach Inkubation mit BEVs oder Transfektion mit BEV-RNA

4.10.1 Auswahl der Bedingungen

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war es, die Auswirkung der Inkubation mit den BEVs oder der Transfektion mit der BEV-RNA auf die Genexpression der Caco-2 Zellen zu untersuchen. Anhand der vorangegangenen Versuche wurden im Anschluss die Bedingungen der Behandlungen festgelegt. Die Genexpression der Zellen wurde sowohl nach 10 h, 24 h und nach Behandlung oder Transfektion mit *L. casei* MVs oder MV-RNA zusätzlich auch nach 48 h untersucht. Diese Entscheidung wurde auf Basis der Ergebnisse der Durchflusszytometrie und CLSM getroffen, welche gezeigt haben, dass *L. casei* MVs von den Caco-2 Zellen deutlich langsamer aufgenommen werden als die anderen getesteten BEVs. Weiterhin wurde darauf geachtet, dass die für die Behandlung der Caco-2 Zellen ausgewählten Mengen BEVs mit der entsprechenden Menge BEV-RNA, welche potenziell in dieser Anzahl BEVs transportiert worden ist, aufeinander abgestimmt wurden. **Tabelle 6** gibt einen Überblick über die eingesetzten Mengen BEVs und BEV-RNA.

Tabelle 6: Bedingungen für die Behandlung der Caco-2 Zellen.
Angegeben sind die Anzahl der BEVs, die Menge der BEV-RNA sowie das Verhältnis von Partikel/Zelle für die BEVs aller drei Bakterien.

Bakterien	BEVs (Partikel)	BEV-RNA (ng)	Verhältnis Partikel/Zelle
L. casei	$1{,}5 \times 10^{11}$	100	$9{,}40 \times 10^{5}$
E. faecalis	$7{,}5 \times 10^{9}$	5	$4{,}70 \times 10^{4}$
P. mirabilis	$6{,}0 \times 10^{9}$	2	$3{,}75 \times 10^{4}$

Das Verhältnis von Partikel/Zelle wurde so gewählt, dass es nicht höher lag als die getesteten Verhältnisse bei den Viabilitätsassays aber dennoch etwas höher als das Verhältnis bei der Untersuchung der Internalisierung der BEVs in die Zellen. Dies sollte sicherstellen, dass eine genügend hohe Anzahl der BEVs in den entsprechenden Zeiträumen von den Zellen internalisiert worden ist, ohne dass die ausgewählte Menge potenziell die Viabilität der Zellen beeinträchtigte. Um weiterhin sicherzustellen, dass die beobachtete Effekte durch die Inkubation der Zellen mit den BEVs oder die Transfektion mit der BEV-RNA hervorgerufen wurden, war die Auswahl von geeigneten Kontrollen essenziell. Diese schlossen zum einen die Behandlung von Zellen mit PBS als Kontrolle für die Inkubation der Zellen mit den BEVs ein. Weiterhin wurde als Kontrolle für die Inkubation der Zellen mit den OMVs von *P. mirabilis* zusätzlich *P. mirabilis* LPS (0,2 ng/ml) genutzt. Die Kontrollen für die Transfektion der Caco-2

Zellen mit BEV-RNA schlossen die Transfektion der Caco-2 Zellen mit ANC ein. Dabei wurde die Menge der ANC ebenfalls auf die jeweilige Menge der transfizierten BEV-RNA angepasst. Dies bedeutet, dass z. B. für die Transfektion mit 100 ng *L. casei* MV-RNA als Kontrolle 100 ng ANC eingesetzt wurden. Zusätzlich wurde speziell für *P. mirabilis* auch wieder eine LPS-Kontrolle in der Untersuchung mitgeführt. Dafür wurden die Caco-2 Zellen mit LPS von *P. mirabilis* (1 ng/ml) unter Verwendung des Lipofectamine™ 3000 Transfektionsreagenz transfiziert. Der Versuch wurde für alle drei verschiedenen BEVs und ihre korrespondierende BEV-RNA für jeden Zeitpunkt in vier biologischen Replikaten durchgeführt. Es ist zusätzlich wichtig zu erwähnen, dass darauf geachtet wurde, dass die BEV-RNA, welche für die Transfektion verwendet wurde, aus denselben BEVs stammte, die ebenfalls für die Behandlung der Caco-2 Zellen eingesetzt wurde. Insgesamt standen für die finale Analyse der Effekte der Behandlung der Caco-2 Zellen mit BEVs und Transfektion mit BEV-RNA auf das Transkriptom 105 Proben, bestehend aus 51 Behandlungen und 54 Kontrollen, zur Verfügung. Im Rahmen der differentiellen Expressionsanalyse wurden anschließend diejenigen Transkripte identifiziert, welche eine mindestens um das zwei-fache erhöhte (Log2 Fold Change > 1) oder verringerte (Log2 Fold Change < -1) Expression und einen großen Effekt (Cohen's d > 0,8) in den jeweiligen untersuchten Vergleichen aufwiesen. Die weitere Datenanalyse erfolgte auf Grundlage der entsprechend dieser Kriterien ausgewählten Gene. Diese umfassten dabei sowohl Gene, welche für Proteine kodieren, als auch Pseudogene oder Gene von nicht-kodierenden RNAs, wie z. B. miRNAs. Um im Anschluss eine Aussage darüber treffen zu können, in welche biologischen Prozessen die differentiell exprimierten Gene involviert sind, wurde eine Anreicherungsanalyse (*Over-representation analysis*, ORA) durchgeführt. Dabei wurde besonderer Fokus auf biologische Prozesse und Gene gelegt, welche in Zusammenhang mit dem Auslösen von Entzündungsreaktionen oder der veränderten Permeabilität der Darmbarriere stehen.

4.10.2 Veränderung der Genexpression durch *L. casei* MVs und MV-RNA

In Caco-2 Zellen, die mit *L. casei* MVs inkubiert wurden, konnten vor allem nach 24 h eine große Anzahl an differentiell exprimierten Genen detektiert werden. Dabei zeigten die meisten der Gene eine erhöhte Expression im Gegensatz zur PBS Kontrolle (**Abb. 27 A**). Eine ähnliche Tendenz ließ sich auch bei den Zellen erkennen, die mit der *L. casei* MV-RNA transfiziert wurde. Diese zeigten ebenfalls nach 24 h die größte Anzahl differentiell exprimierter Gene im Vergleich zur Kontrolle, wobei der größere Anteil der Gene auch eine erhöhte Expression aufwies (**Abb. 27 B**). Nach 10 h und 48 h zeigten sowohl nach Inkubation der Caco-2 Zellen mit den MVs als auch nach Transfektion mit der MV-RNA ein geringerer Anteil der Gene eine veränderte Expression.

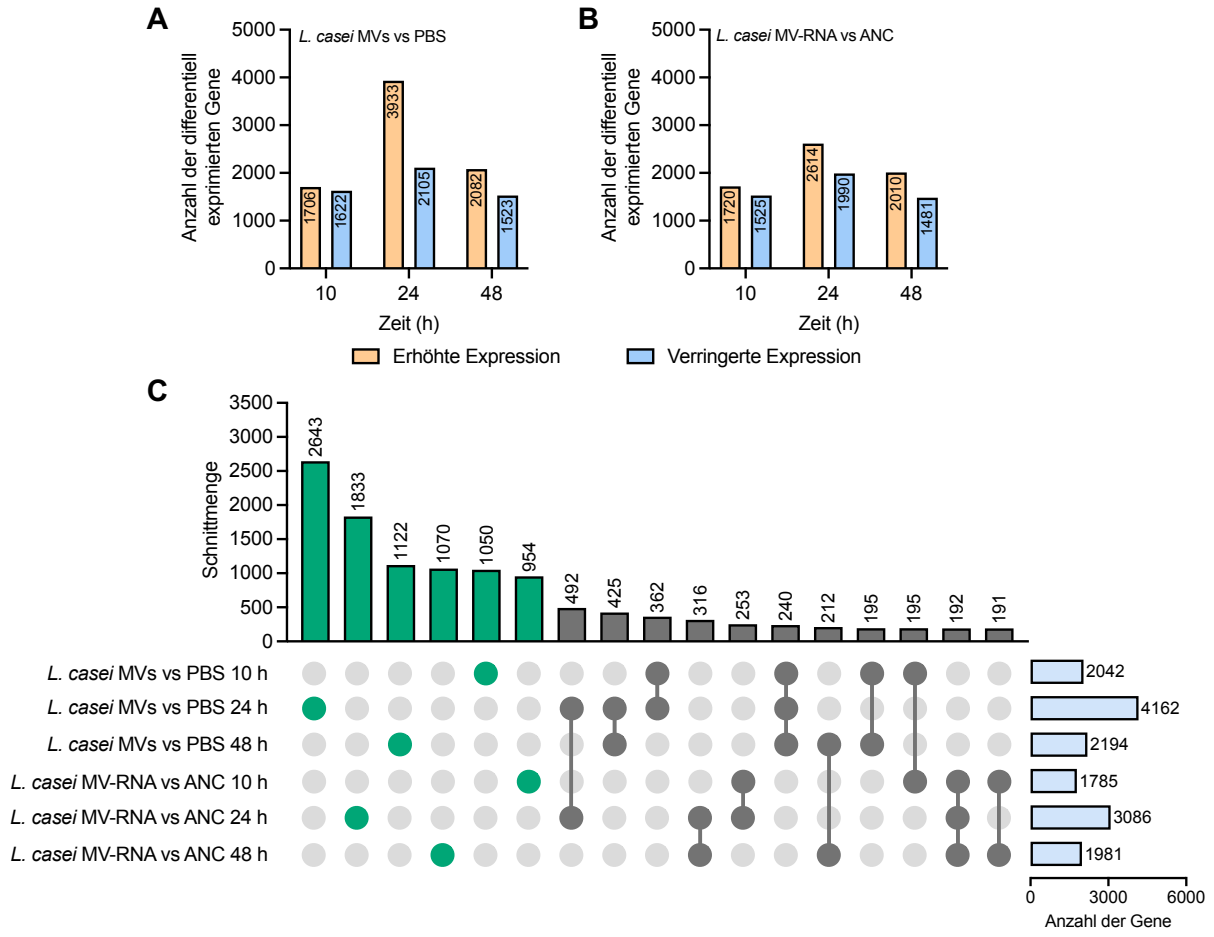

Abbildung 27: Differentiell exprimierte Gene nach Inkubation der Caco-2 Zellen mit *L. casei* MVs oder Transfektion von *L. casei* MV-RNA.
Dargestellt ist die jeweilige Anzahl der differentiell exprimierten Gene, welche nach Inkubation der Zellen mit *L. casei* MVs (**A**) oder Transfektion mit *L. casei* MV-RNA (**B**) für 10 h, 24 h oder 48 h eine erhöhte oder verringerte Expression zeigten. (**C**) Im Upset Plot ist zusätzlich die Anzahl der differentiell exprimierten Gene angegeben, die in jeweils einem oder mehreren der angegebenen Vergleiche detektiert wurden. Eine grüne Färbung kennzeichnet dabei die Gene, die lediglich in einem der jeweiligen Vergleiche detektiert wurden und eine graue Färbung diejenigen Gene, welche in mindestens zwei Vergleichen gefunden werden konnten.

Der überwiegende Anteil der Gene zeigte Veränderungen entweder zu einem der analysierten Zeitpunkte oder nach Inkubation mit dem MVs bzw. Transfektion mit der MV-RNA. Dennoch konnten auch eine ganze Reihe von Genen identifiziert werden, deren Expression in zwei oder drei Zeitpunkten sowie nach Inkubation mit den MVs als auch nach Transfektion mit der MV-RNA verändert war (**Abb. 27 C**).

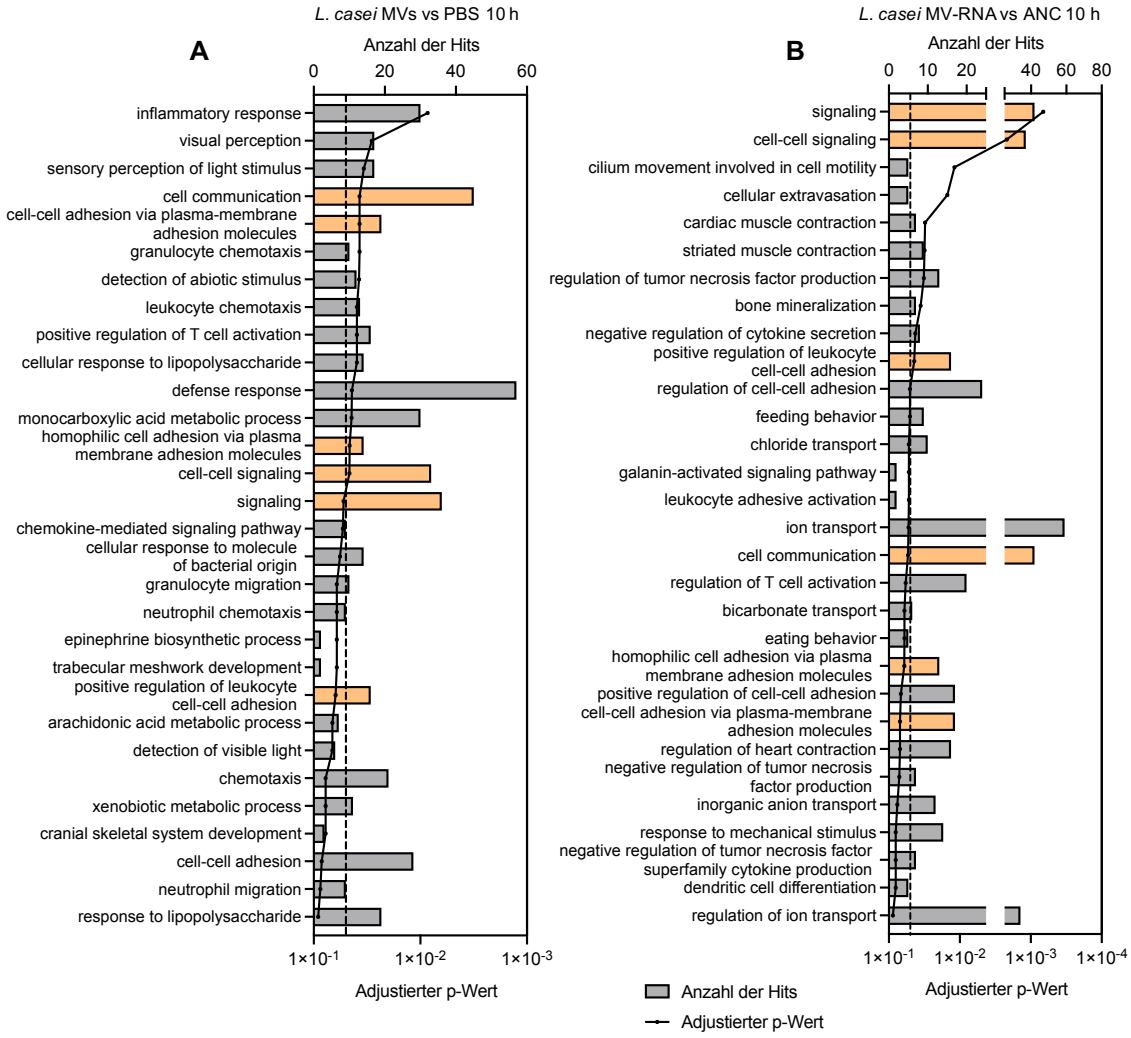

Abbildung 28: Anreicherungsanalyse von differentiell exprimierten Genen nach Inkubation der Caco-2 Zellen mit *L. casei* MVs oder Transfektion mit *L. casei* MV-RNA für 10 h.
Zur Einordnung der Veränderungen in den Caco-2 Zellen in biologische Prozesse wurden auf Grundlage der differentiell exprimierten Gene nach Inkubation mit *L. casei* MVs (**A**) oder Transfektion mit *L. casei* MV-RNA (**B**) eine Anreicherungsanalyse (*Over-representation analysis*, ORA) mit GeneTrail 3.2 durchgeführt. Dargestellt sind die ersten 30 biologischen Prozesse (Termini der Gene Ontology Kategorie: „Biological Process“) in denen die differentiell exprimierten Gene entsprechend ihres Benjamini-Hochberg-adjustierten p-Wertes signifikant angereichert waren. Die gestrichelte Linie kennzeichnet das Signifikanzniveau von p = 0,05. Biologische Prozesse, die sowohl nach Inkubation der Caco-2 Zellen mit den *L. casei* MVs als auch nach Transfektion mit der *L. casei* MV-RNA für 10 h angereichert waren, sind in Orange gekennzeichnet.

Anschließend wurde auf Basis der differentiell exprimierten Gene eine Anreicherungsanalyse durchgeführt, um die Veränderungen in biologische Prozesse einordnen zu können. Bereits nach 10 h Inkubation der Caco-2 Zellen mit den MVs von *L. casei* konnten Veränderungen in

der Expression von Genen beobachtet werden, die vermehrt in Prozessen wie z. B. „*inflammatory response*“, „*defense response*“, „*cell-cell signaling*“, „*granulocyte chemotaxis*“ oder „*leukocyte chemotaxis*“ angereichert waren. Darunter zeigten Gene von verschiedenen Chemokinen wie etwa *CCL15*, *CCL2*, *CCL22*, *CXCL11*, *CXCL5*, *CXCL8* oder Interleukinen wie z. B. *IL-37* eine erhöhte Expression nach Inkubation mit den MVs. Darüber hinaus war die Expression von *CLDN10,* welches mit dem Prozess „*cell-cell adhesion via plasma-membrane adhesion molecules*“ assoziiert war, erhöht (**Abb. 28 A, Anhang Tabelle 14**). Interessanterweise konnten nach Transfektion der *L. casei* MV-RNA ähnliche Prozesse identifiziert werden, bei denen eine Anreicherung der differentiell exprimierten Gene beobachtet werden konnte. Zu diesen gehörten z. B. „*cell-cell signaling*“. Weiterhin waren auch Gene nach Transfektion mit der *L. casei* MV-RNA verändert, die signifkant in Prozessen wie „*regulation of tumor necrosis factor production*“ oder „*positive regulation of leukocyte cell-cell adhesion*” angereichert waren (**Abb. 28 B**). Darunter zeigten Gene wie z. B. *CCL15* oder *IL-4* eine erhöhte Expression. Die Expression von z. B. *CCL2* war hingegen verringert (**Anhang Tabelle 14**).

Wie bereits die Anzahl der differentiell exprimierten Gene erahnen ließ, konnten nach 24 h Inkubation der Caco-2 Zellen mit den *L. casei* MVs oder Transfektion mit der *L. casei* MV-RNA, die größte Anzahl signifikant angereicherten biologischen Prozesse detektiert werden. Wie bereits nach 10 h zeigten auch nach 24 h Inkubation mit den MVs Gene Veränderungen, welche auf das Auslösen einer Entzündungsreaktion durch die MVs bakteriellen Ursprungs hindeutete. So waren z. B. Gene verändert, die signifikant in Prozessen wie „*chemotaxis*“, „*response to bacterium*“, „*inflammatory response*“, „*cell-cell signaling*“ oder „*cell adhesion*“ angereichert waren, wobei „*inflammatory response*“ nicht unter der ersten 30 angereicherten Signalwegen entsprechend ihres p-Wertes lag. Weitere biologische Prozesse, die ebenfalls signifikant angereichert waren, sind im Anhang in **Tabelle 15** aufgeführt. Unter den Genen, die eine erhöhte Expression nach Inkubation mit den *L. casei* MVs zeigten, waren u. a. *CCL20*, *CCL22*, *CXCL8*, *IL-37* oder *IL-6*. Auf der anderen Seite zeigten Gene wie *CXCL11*, *IL-1B*, *TLR6* oder verschiedene Mitglieder der Claudine wie *CLDN11*, *CLDN18* und *CLDN6* eine verringerte Expression (**Anhang Tabelle 14**). Weiterhin konnten ebenfalls Veränderungen in der Expression von Genen, die mit Prozessen wie z. B. „*ion transport*“ oder „*anion transport*“ assoziiert waren, detektiert werden (**Abb. 29 A**). Interessanterweise zeigten Caco-2 Zellen nach Transfektion mit der *L. casei* MV-RNA Veränderungen in Genen, die ebenfalls signifikant mit einer Vielzahl von Prozessen assoziiert waren, welche bereits nach Inkubation mit den MVs angereichert waren. Zu diesen gehörten z. B. „*chemotaxis*“, „*cell-cell signaling*“ oder „*cell adhesion*“ (**Abb. 29 B**). Dabei zeigten u. a. die Gene *CCL20* oder auch *CXCL11* eine verringerte Expression. Im Gegensatz dazu waren Gene, die mit „*cell adhesion*“ assoziiert waren, wie z. B. *CLDN14* und *CLDN6* erhöht exprimiert (**Anhang Tabelle 14**).

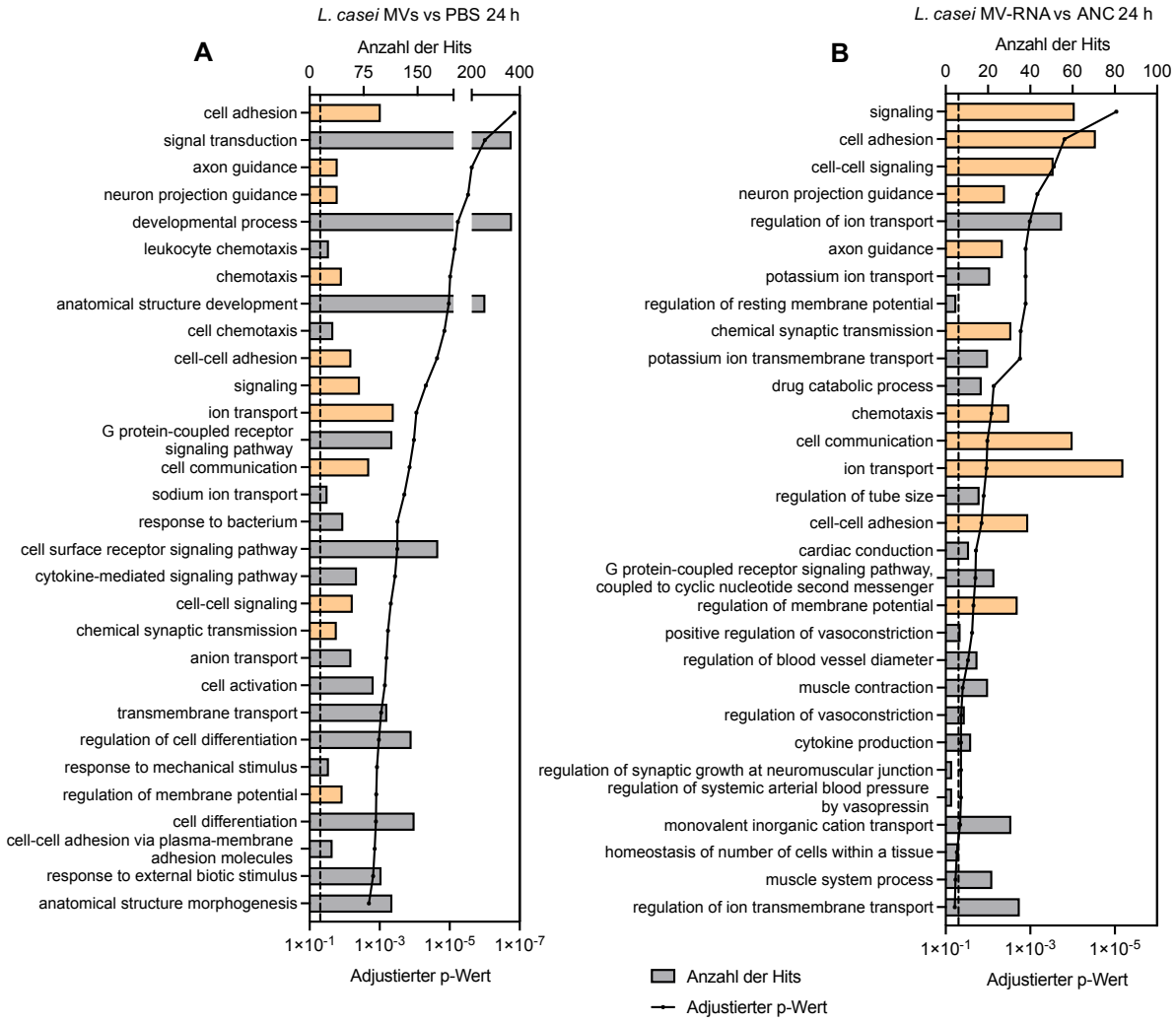

Abbildung 29: Anreicherungsanalyse von differentiell exprimierten Genen nach Inkubation der Caco-2 Zellen mit *L. casei* MVs oder Transfektion mit *L. casei* MV-RNA für 24 h.
Zur Einordnung der Veränderungen in den Caco-2 Zellen in biologische Prozesse wurden auf Grundlage der differentiell exprimierten Gene nach Inkubation mit *L. casei* MVs (**A**) oder Transfektion mit *L. casei* MV-RNA (**B**) eine Anreicherungsanalyse (*Over-representation analysis*, ORA) mit GeneTrail 3.2 durchgeführt. Dargestellt sind die ersten 30 biologischen Prozesse (Termini der Gene Ontology Kategorie: „Biological Process“) in denen die differentiell exprimierten Gene entsprechend ihres Benjamini-Hochberg-adjustierten p-Wertes signifikant angereichert waren. Die gestrichelte Linie kennzeichnet das Signifikanzniveau von p = 0,05. Biologische Prozesse, die sowohl nach Inkubation der Caco-2 Zellen mit den *L. casei* MVs als auch nach Transfektion mit der *L. casei* MV-RNA für 24 h angereichert waren, sind in Orange gekennzeichnet. Weitere biologische Prozesse, bei denen eine signifikante Anreicherung der differentiell exprimierten Gene beobachtet werden konnte, können **Tabelle 15** im Anhang entnommen werden.

Nach 48 h Inkubation der Caco-2 Zellen mit den *L. casei* MVs konnte wiederum eine geringere Anzahl biologischer Prozesse identifiziert werden, in denen die differentiell exprimierten Gene signifikant angereichert waren. Unter diesen befanden sich jedoch ähnliche Prozesse, wie etwa „*inflammatory response*“ oder auch „*cell adhesion*“, bei denen auch bereits nach 10 h und 24 h eine Anreicherung der Gene beobachtet werden konnte (**Abb. 30 A**). Zu den Genen, die eine erhöhte Expression zeigten, zählten z. B. *CCL20* und *IL-1B*, während *CLDN14* eine verringerte Expression aufwies (**Anhang Tabelle 14**).

Im Vergleich zu den Caco-2 Zellen, die für 48 h mit der *L. casei* MV-RNA transfiziert wurden, konnten jedoch weniger Gemeinsamkeiten bei den Prozessen, in denen die differentiell exprimierten Genen angereichert waren, detektiert werden (**Abb. 30 B, Anhang Tabelle 14**).

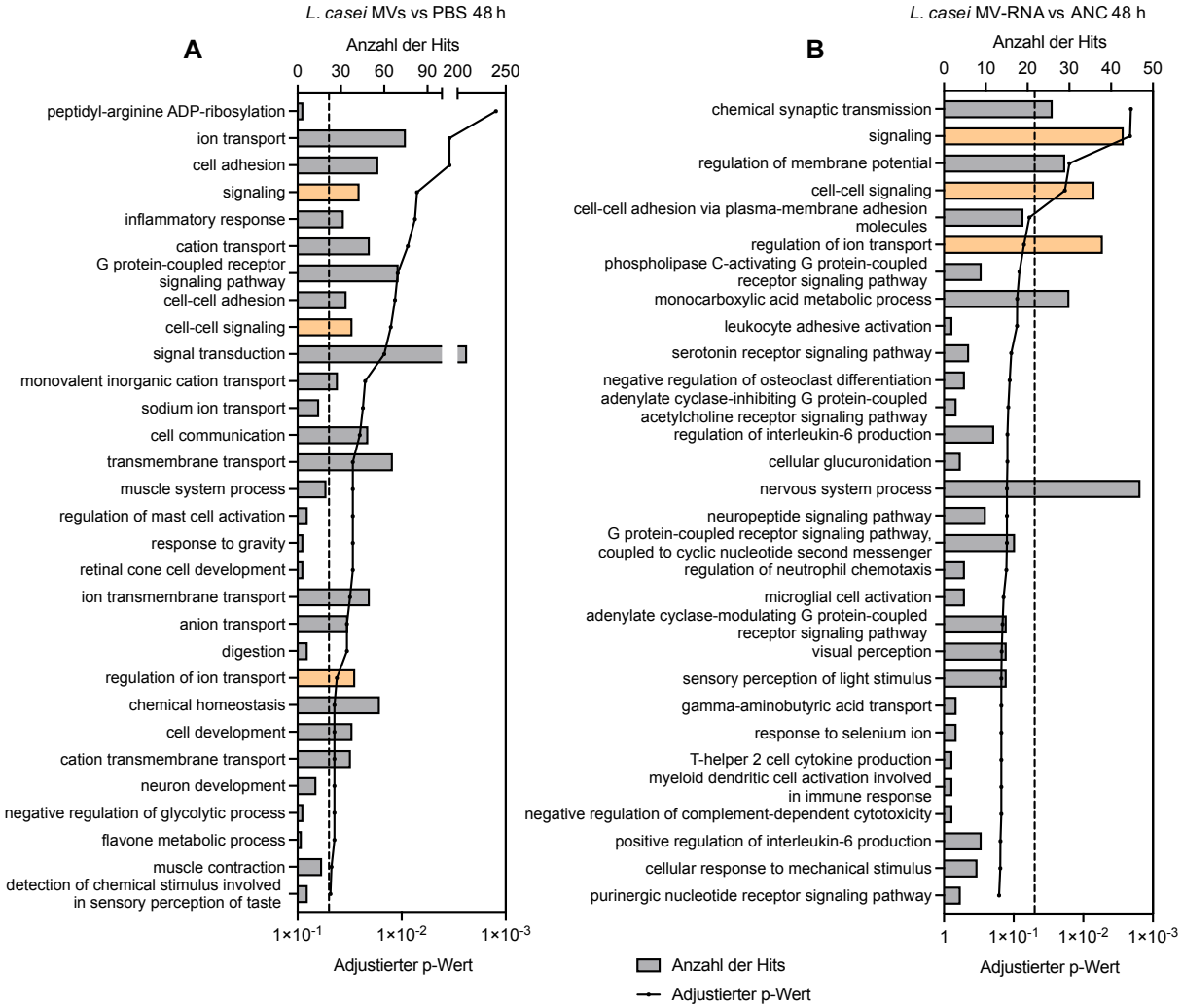

Abbildung 30: Anreicherungsanalyse von differentiell exprimierten Genen nach Inkubation der Caco-2 Zellen mit *L. casei* MVs oder Transfektion mit *L. casei* MV-RNA für 48 h.
Zur Einordnung der Veränderungen in den Caco-2 Zellen in biologische Prozesse wurden auf Grundlage der differentiell exprimierten Gene nach Inkubation mit *L. casei* MVs (**A**) oder Transfektion mit *L. casei* MV-RNA (**B**) eine Anreicherungsanalyse (*Over-representation analysis*, ORA) mit GeneTrail 3.2 durchgeführt. Dargestellt sind die ersten 30 biologischen Prozesse (Termini der Gene Ontology Kategorie: „Biological Process“), in denen die differentiell exprimierten Gene entsprechend ihres Benjamini-Hochberg-adjustierten p-Wertes signifikant angereichert waren. Die gestrichelte Linie kennzeichnet das Signifikanzniveau von p = 0,05. Biologische Prozesse, die sowohl nach Inkubation der Caco-2 Zellen mit den *L. casei* MVs als auch nach Transfektion mit der *L. casei* MV-RNA für 48 h angereichert waren, sind in Orange gekennzeichnet. Weitere biologische Prozesse, bei denen eine signifikante Anreicherung der differentiell exprimierten Gene beobachtet werden konnte, können **Tabelle 16** im Anhang entnommen werden.

Zusammenfassend lieferten die Ergebnisse Hinweise darauf, dass die größten Veränderungen in der Genexpression der Caco-2 Zellen nach 24 h Inkubation mit den *L. casei* MVs beobachtet werden konnten. Zudem konnte ebenfalls gezeigt werden, dass auch die RNA in den *L. casei* MV selbst eine spezifische Veränderung der Expression einzelner Gene hervorrufen konnte.

4.10.3 Veränderung der Genexpression durch *E. faecalis* MVs und MV-RNA

Nachdem die Caco-2 Zellen mit den *E. faecalis* MVs inkubiert wurden, war die Expression der meisten Gene nach 24 h verändert. Darüber hinaus zeigte der größte Anteil dieser Gene eine erhöhte Expression (**Abb. 31 A**). Im Gegensatz dazu war nach Transfektion der Caco-2 Zellen mit der *E. faecalis* MV-RNA eine größere Anzahl der Gene bereits nach 10 h verändert. Zusätzlich war dabei zu beobachten, dass die meisten der differentiell exprimierten Gene nach 10 h und 24 h eine verringerte Expression aufwiesen (**Abb. 31 B**).

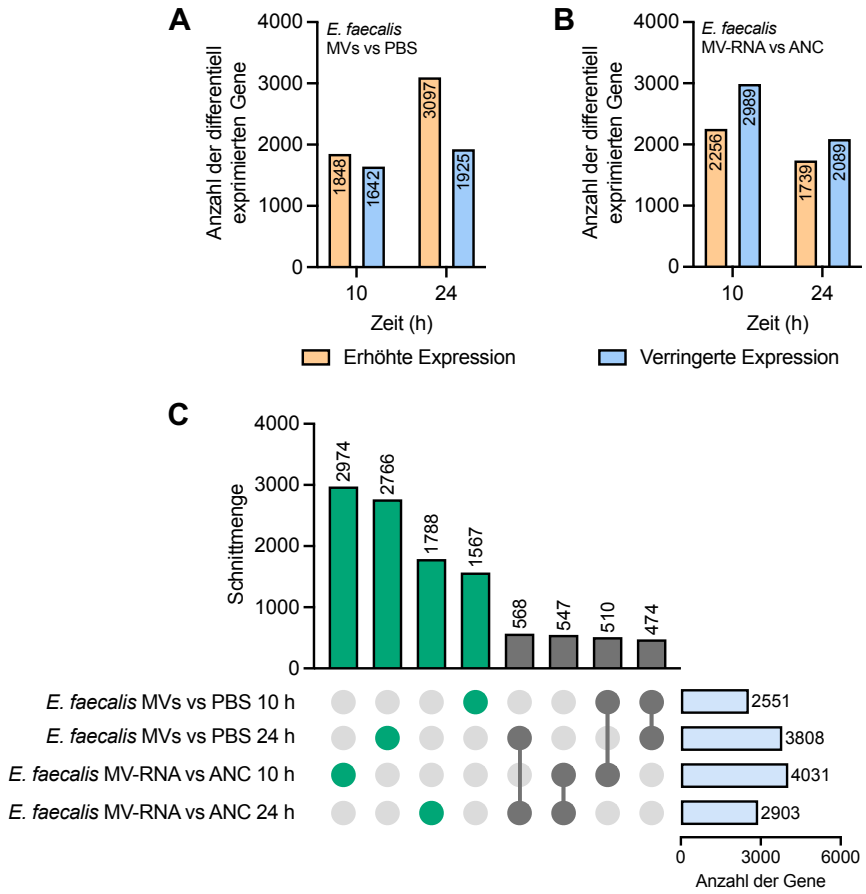

Abbildung 31: Differentiell exprimierte Gene nach Inkubation der Caco-2 Zellen mit *E. faecalis* MVs oder Transfektion von *E. faecalis* MV-RNA.
Dargestellt ist die jeweilige Anzahl der Gene, welche nach Inkubation der Zellen mit *E. faecalis* MVs (**A**) oder Transfektion mit *E. faecalis* MV-RNA (**B**) für 10 h oder 24 h eine erhöhte oder verringerte Expression zeigten. Als Kontrollen dienten entweder PBS oder ANC. (**C**) Im Upset Plot ist zusätzlich die Anzahl der differentiell exprimierten Gene angegeben, die in jeweils einem oder mehreren der angegebenen Vergleiche detektiert wurden. Eine grüne Färbung kennzeichnet dabei die Gene, die lediglich in einem der jeweiligen Vergleiche detektiert wurden und eine graue Färbung diejenigen Gene, welche in mindestens zwei Vergleichen gefunden werden konnten.

Wie auch schon bei den Caco-2 Zellen, die mit den MVs oder der MV-RNA von *L. casei* behandelt wurden, konnten die meisten differentiell exprimierten Gene nur an je einem der untersuchten Zeitpunkte sowie entweder nach Inkubation mit den MVs bzw. Transfektion mit der MV-RNA detektiert werden. Ebenso ließen sich auch Gene identifizieren, deren Expression in mehr als einer der verschiedenen Bedingungen verändert war (**Abb. 31 C**).

Bei genauerer Analyse der biologischen Prozesse, in denen die differentiell exprimierten Gene angereichert waren, war vor allem auffällig, dass durch die Inkubation der Caco-2 Zellen mit den *E. faecalis* MVs für 10 h zunächst eher unspezifische Veränderungen in den Zellen ausgelöst wurden. Im Gegensatz zu den Zellen, die mit den MVs von *L. casei* inkubiert wurden, konnten hier nach 10 h keine Anreicherung von differentiell exprimierten Genen in Prozessen, die mit Entzündungsreaktion oder der Chemotaxis assoziiert waren, beobachtet werden (**Abb. 32 A**).

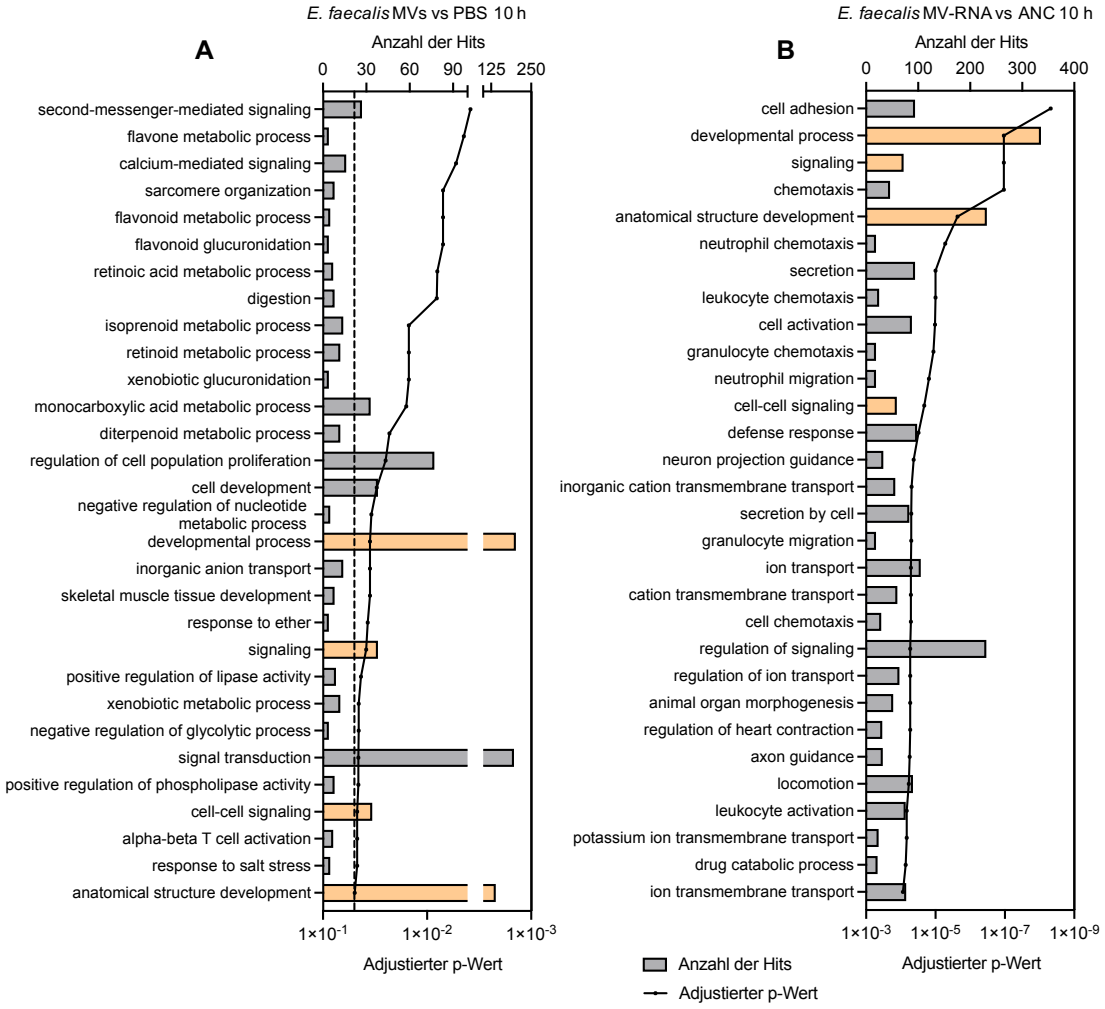

Abbildung 32: Anreicherungsanalyse von differentiell exprimierten Genen nach Inkubation der Caco-2 Zellen mit *E. faecalis* MVs oder Transfektion mit *E. faecalis* MV-RNA für 10 h.
Zur Einordnung der Veränderungen in den Caco-2 Zellen in biologische Prozesse wurden auf Grundlage der differentiell exprimierten Gene nach Inkubation mit *E. faecalis* MVs (**A**) oder Transfektion mit *E. faecalis* MV-RNA (**B**) eine Anreicherungsanalyse (*Over-representation analysis*, ORA) mit GeneTrail 3.2 durchgeführt. Dargestellt sind die ersten 30 biologischen Prozesse (Termini der Gene Ontology Kategorie: „Biological Process“), in denen die differentiell exprimierten Gene entsprechend ihres Benjamini-Hochberg-adjustierten p-Wertes signifikant angereichert waren. Die gestrichelte Linie kennzeichnet das Signifikanzniveau von p = 0,05. Biologische Prozesse, die sowohl nach Inkubation der Caco-2 Zellen mit den *E. faecalis* MVs als auch nach Transfektion mit der *E. faecalis* MV-RNA für 10 h angereichert waren, sind in Orange gekennzeichnet. Weitere biologische Prozesse, bei denen eine signifikante Anreicherung der differentiell exprimierten Gene beobachtet werden konnte, können **Tabelle 17** im Anhang entnommen werden.

Bei genauer Analyse der Expression einzelner Gene in den signifikant angereicherten Prozessen konnte jedoch z. B. eine erhöhte Expression von *CXCL8* und *IL-37* sowie eine verringerte Expression von *IL-6* detektiert werden (**Anhang Tabelle 18**). Im Gegensatz dazu zeigten sich nach 10 h Transfektion der Zellen mit der *E. faecalis* MV-RNA deutliche Veränderungen von Genen, die in verschiedenen biologischen Prozessen wie „*defense response*“, „*chemotaxis*“, „*cell adhesion*“ oder auch „*cell-cell signaling*“ angereichert waren (**Abb. 32 B**). Darunter konnte bei Genen wie z. B. *CCL17*, *CCL5*, *CXCL1*, *CXCL17*, *CXCL3*, *CLDN18* oder *TLR3* eine erhöhte Expression und bei *CXCL11*, *CLDN10* oder *IL-1B* eine verringerte Expression detektiert werden (**Anhang Tabelle 18**).

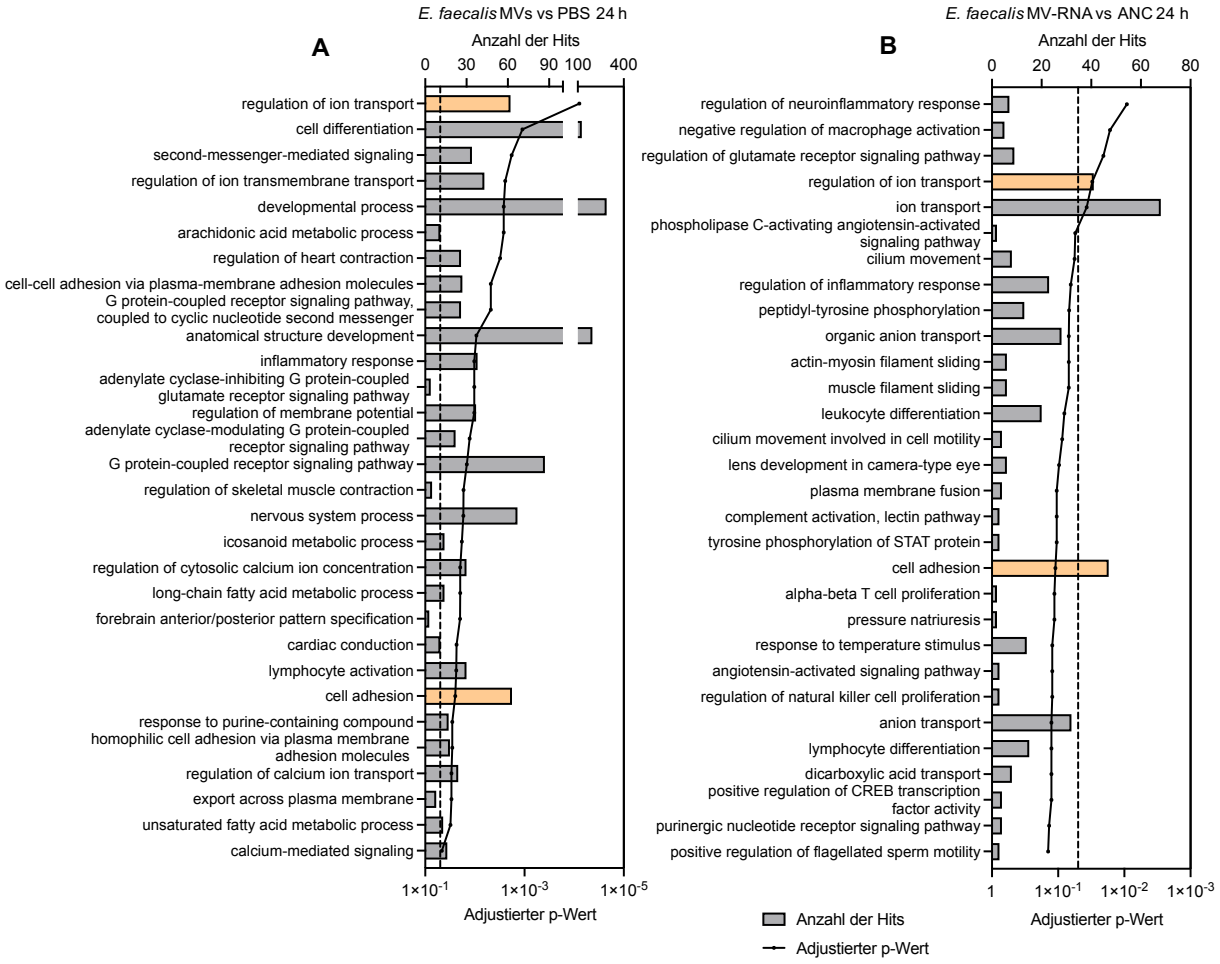

Abbildung 33: Anreicherungsanalyse von differentiell exprimierten Genen nach Inkubation der Caco-2 Zellen mit *E. faecalis* MVs oder Transfektion mit *E. faecalis* MV-RNA für 24 h.
Zur Einordnung der Veränderungen in den Caco-2 Zellen in biologische Prozesse wurden auf Grundlage der differentiell exprimierten Gene nach Inkubation mit *E. faecalis* MVs (**A**) oder Transfektion mit *E. faecalis* MV-RNA (**B**) eine Anreicherungsanalyse (*Over-representation analysis*, ORA) mit GeneTrail 3.2 durchgeführt. Dargestellt sind die ersten 30 biologischen Prozesse (Termini der Gene Ontology Kategorie: „Biological Process“), in denen die differentiell exprimierten Gene entsprechend ihres Benjamini-Hochberg-adjustierten p-Wertes signifikant angereichert sind. Die gestrichelte Linie kennzeichnet das Signifikanzniveau von p = 0,05. Biologische Prozesse, die sowohl nach Inkubation der Caco-2 Zellen mit den *E. faecalis* MVs als auch nach Transfektion mit der *E. faecalis* MV-RNA für 24 h angereichert waren, sind in Orange gekennzeichnet.

Nach 24 h Inkubation der Caco-2 Zellen mit den MVs von *E. faecalis* konnte eine signifikante Anreicherung von differentiell exprimierten Genen, die mit biologischen Prozessen wie „*inflammatory response*“ oder „*cell adhesion*“ assoziiert waren, beobachtet werden (**Abb. 33 A**). Gene wie *IL-17C* oder *IL-27* zeigten dabei eine erhöhte und *CLDN2*, *CXCL11* und *CXCR3* eine verringerte Expression (**Anhang Tabelle 18**). Auf der anderen Seite konnten nach Transfektion der Caco-2 Zellen mit der *E. faecalis* MV-RNA für 24 h weniger Veränderungen in der Genexpression der Zellen beobachtet werden. Zwar konnten Anreicherungen der differentiell exprimierten Gene in biologischen Prozessen wie „*regulation of inflammatory response*“ oder „*cell adhesion*“ detektiert werden, diese waren jedoch nicht signifikant (**Abb. 33 B, Anhang Tabelle 18**).

Die Ergebnisse haben somit gezeigt, dass es nach 24 h Inkubation der Caco-2 Zellen mit dem *E. faecalis* MVs zu Veränderungen der Genexpression in den Zellen kam, die mit Entzündungsreaktionen in Zusammenhang standen. Dagegen zeigte sich nach Transfektion der Caco-2 Zellen mit der *E. faecalis* MV-RNA bereits nach 10 h eine deutliche Veränderung in der Genexpression.

4.10.4 Veränderung der Genexpression durch *P. mirabilis* OMV und OMV-RNA

In Caco-2 Zellen, die mit *P. mirabilis* OMVs inkubiert wurden, konnten sowohl nach 10 h als auch nach 24 h eine ähnliche Anzahl deregulierter Gene identifiziert werden. Zudem war die Anzahl der jeweiligen Gene, welche eine verringerte und eine erhöhte Expression zeigten, relativ ausgeglichen (**Abb. 34 A**) Ebenso konnte nach Transfektion der Zellen mit der *P. mirabilis* OMV-RNA eine ähnliche Anzahl deregulierter Gene nach 10 h und 24 h detektiert werden. Dabei zeigte sich jedoch, dass nach 24 h etwas mehr Gene eine verringerte Expression zeigten (**Abb. 34 B**). Wie auch schon nach Inkubation und Transfektion der Caco-2 Zellen mit den BEVs oder der BEV-RNA der anderen beiden Bakterienspezies beobachtet werden konnte, zeigten auch nach Inkubation und Transfektion der Zellen mit den OMVs oder der OMV-RNA von *P. mirabilis* die meisten Gene in lediglich einer der untersuchten Bedingungen eine veränderte Expression. Auf der anderen Seite konnten jedoch auch eine Reihe von Genen detektiert werden, die zu mehreren untersuchten Zeitpunkten oder nach unterschiedlichen Behandlungen verändert waren (**Abb. 34 C**).

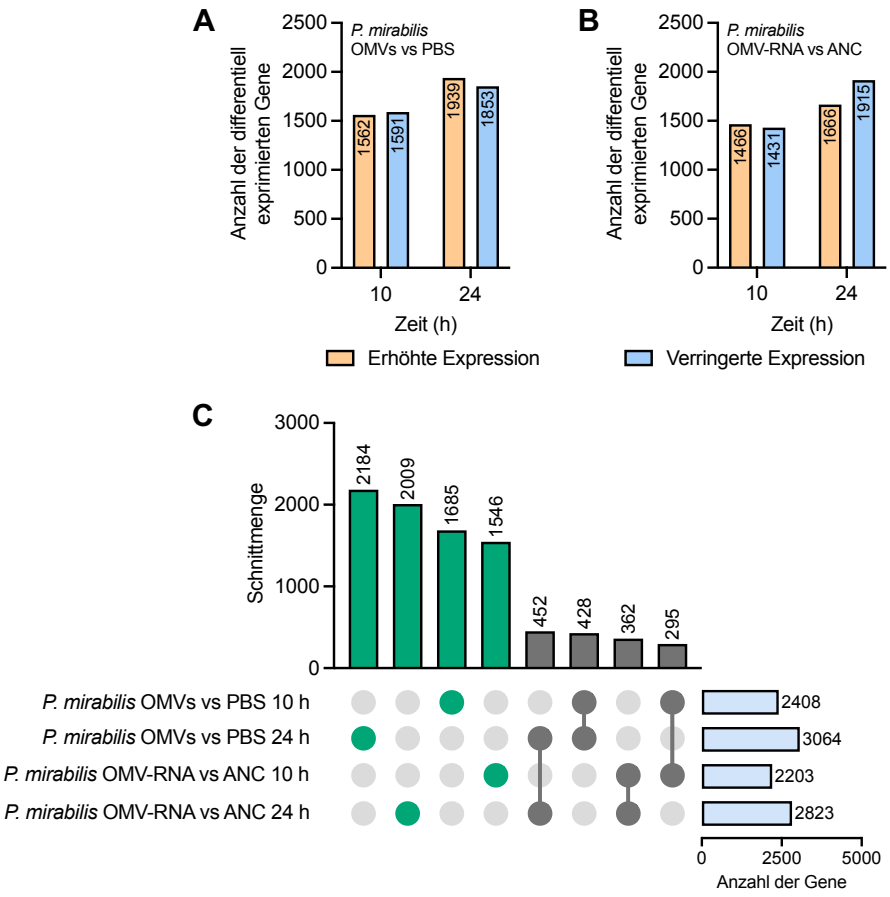

Abbildung 34: Differentiell exprimierte Gene nach Inkubation der Caco-2 Zellen mit *P. mirabilis* OMVs oder Transfektion von *P. mirabilis* OMV-RNA.
Dargestellt ist die jeweilige Anzahl der Gene, welche nach Inkubation der Zellen mit *P. mirabilis* OMVs (**A**) oder Transfektion mit *P. mirabilis* OMV-RNA (**B**) für 10 h oder 24 h eine erhöhte oder verringerte Expression zeigten. Als Kontrollen dienten entweder PBS oder ANC. (**C**) Im Upset Plot ist zusätzlich die Anzahl der differentiell exprimierten Gene angegeben, die in jeweils einem oder mehreren der angegebenen Vergleiche detektiert wurden. Eine grüne Färbung kennzeichnet dabei die Gene, die lediglich in einem der jeweiligen Vergleiche detektiert wurden und eine graue Färbung diejenigen Gene, welche in mindestens zwei Vergleichen gefunden werden konnten.

Um im Folgenden wiederum biologische Prozesse in den Zellen zu identifizieren, in welchen die durch die Inkubation mit den OMVs oder die Transfektion mit der OMV-RNA veränderten Gene angereichert waren, wurde eine ORA durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass es bereits nach 10 h Inkubation der Caco-2 Zellen mit den *P. mirabilis* OMVs zu deutlichen Veränderungen in der Expression von Genen kam, die signifikant in Prozessen wie z. B. „*inflammatory response*“, „*response to other organism*”, “*chemotaxis*” oder “*response to molecule of bacterial origin*” angereichert waren (**Abb. 35 A**). Zu den Genen, welche eine erhöhte Expression zeigten, gehörten z. B. *CXCL10*, *CXCL11*, *CXCL5*, *CXCL8* oder *TLR7* (**Anhang Tabelle 20**).

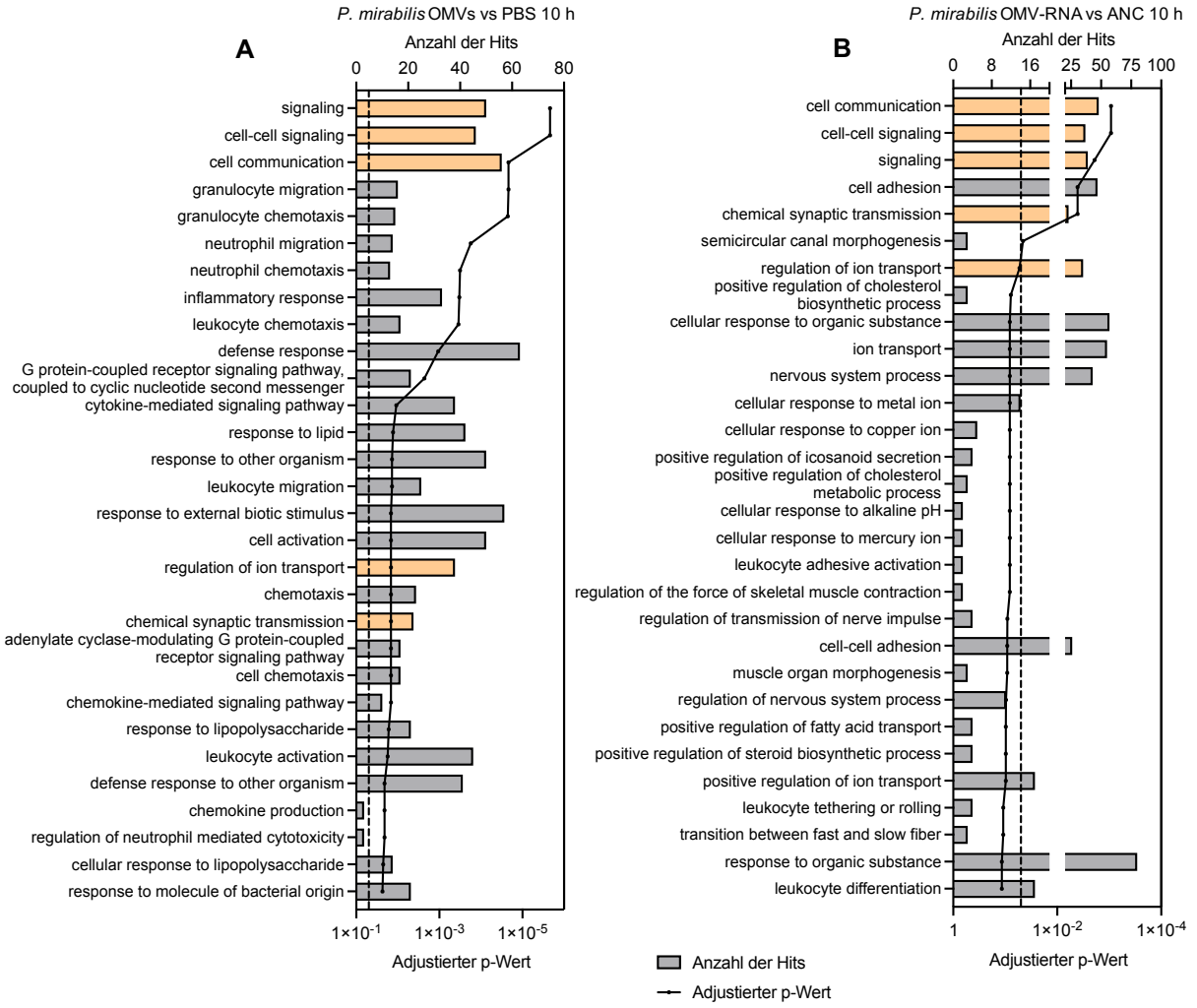

Abbildung 35: Anreicherungsanalyse von differentiell exprimierten Genen nach Inkubation der Caco-2 Zellen mit *P. mirabilis* OMVs oder Transfektion mit *P. mirabilis* OMV-RNA für 10 h.
Zur Einordnung der Veränderungen in den Caco-2 Zellen in biologische Prozesse wurden auf Grundlage der differentiell exprimierten Gene nach Inkubation mit *P. mirabilis* OMVs (**A**) oder Transfektion mit *P. mirabilis* OMV-RNA (**B**) eine Anreicherungsanalyse (*Over-representation analysis*, ORA) mit GeneTrail 3.2 durchgeführt. Dargestellt sind die ersten 30 biologischen Prozesse (Termini der Gene Ontology Kategorie: „Biological Process"), in denen die differentiell exprimierten Gene entsprechend ihres Benjamini-Hochberg-adjustierten p-Wertes signifikant angereichert waren. Die gestrichelte Linie kennzeichnet das Signifikanzniveau von p = 0,05. Biologische Prozesse, die sowohl nach Inkubation der Caco-2 Zellen mit den *P. mirabilis* OMVs als auch nach Transfektion mit der *P. mirabilis* OMV-RNA für 10 h angereichert waren, sind in Orange gekennzeichnet. Weitere biologische Prozesse, bei denen eine signifikante Anreicherung der differentiell exprimierten Gene beobachtet werden konnte, können **Tabelle 19** im Anhang entnommen werden.

Nach Transfektion der Zellen mit der *P. mirabilis* OMV-RNA für 10 h zeigten sich ebenfalls signifikante Anreicherungen der differentiell exprimierten Gene in verschiedenen Prozessen, die auch nach der Inkubation der Zellen mit den OMVs selbst detektiert werden konnten. Zu diesen gehörten z. B. „*cell communication*" oder „*cell-cell signaling*". Dabei konnte auch eine verringerte Expression von *CXCL5* und *IL-1B* detektiert werden. Zudem waren auch Gene verändert, die signifikant in Prozessen wie „*cell adhesion*" angereichert sind. Darunter befanden sich Gene wie *CLDN14*, *CLDN18*, *CLDN6* deren Expression nach Transfektion mit der *P. mirabilis* OMV-RNA verringert war (**Abb. 35 B, Anhang Tabelle 20**).

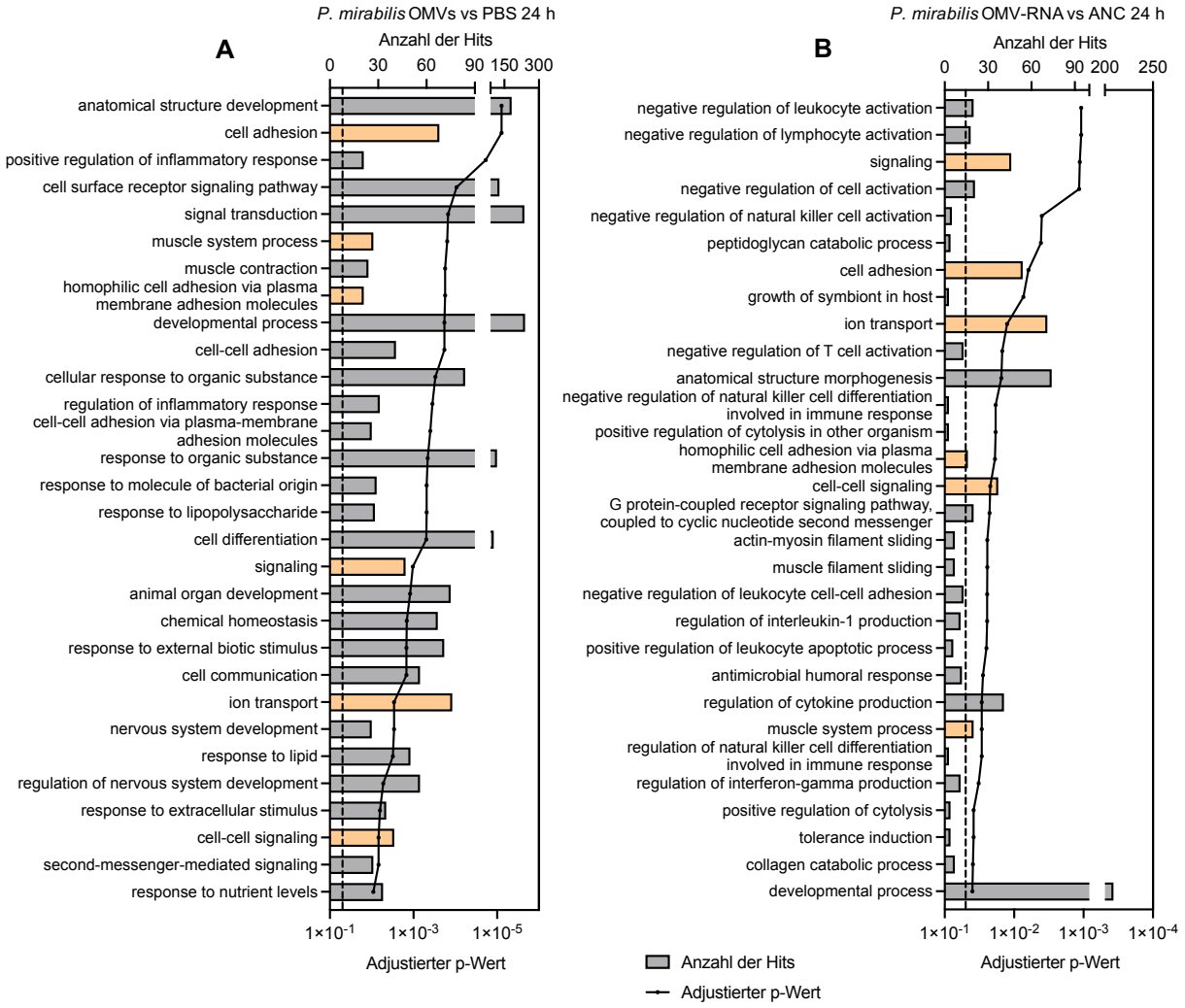

Abbildung 36: Anreicherungsanalyse von differentiell exprimierten Genen nach Inkubation der Caco-2 Zellen mit *P. mirabilis* OMVs oder Transfektion mit *P. mirabilis* OMV-RNA für 24 h.
Zur Einordnung der Veränderungen in den Caco-2 Zellen in biologische Prozesse wurden auf Grundlage der differentiell exprimierten Gene nach Inkubation mit *P. mirabilis* OMVs (**A**) oder Transfektion mit *P. mirabilis* OMV-RNA (**B**) eine Anreicherungsanalyse (*Over-representation analysis*, ORA) mit GeneTrail 3.2 durchgeführt. Dargestellt sind die ersten 30 biologischen Prozesse (Termini der Gene Ontology Kategorie: „Biological Process"), in denen die differentiell exprimierten Gene entsprechend ihres Benjamini-Hochberg-adjustierten p-Wertes signifikant angereichert waren. Die gestrichelte Linie kennzeichnet das Signifikanzniveau von p = 0,05. Biologische Prozesse, die sowohl nach Inkubation der Caco-2 Zellen mit den *P. mirabilis* OMVs als auch nach Transfektion mit der *P. mirabilis* OMV-RNA für 24 h angereichert waren, sind in Orange gekennzeichnet. Weitere biologische Prozesse, bei denen eine signifikante Anreicherung der differentiell exprimierten Gene beobachtet werden konnte, können **Tabelle 21** und **Tabelle 22** im Anhang entnommen werden.

Wenn die Caco-2 Zellen für 24 h mit den OMVs von *P. mirabilis* inkubiert wurden, konnten ebenfalls eine große Anzahl Gene identifiziert werden, die signifikant in bestimmten biologischen Prozessen angereichert waren. Dies umfasste ebenfalls Prozesse, welche mit einer veränderten Immunantwort und der Reaktion der Zellen auf die Inkubation mit den OMVs bakteriellen Ursprungs in Verbindung standen wie etwa „*positive regulation of inflammatory response*", „*response to molecule of bacterial origin*" oder „*cell adhesion*" (**Abb. 36 A**). Gene wie z. B. *CXCL10*, *CXCL8*, *CLDN18* sowie *TLR3* und TLR7 zeigten dabei eine erhöhte

Expression (**Anhang Tabelle 20**). Nach Transfektion der Caco-2 Zellen mit der *P. mirabilis* OMV-RNA waren die differentiell exprimierten Gene signifikant in biologischen Prozessen wie „*antimicrobial humoral response*“ oder „*regulation of cytokine production*“ angereichert (**Abb. 36 B**). Zu den Genen, deren Expression erhöht war, gehörten u. a. *CXCL5, IL-27* oder *IL-6*. Gene wie *CLDN10*, welches mit „*cell adhesion*“ assoziiert war, zeigte hingegen eine verringerte Expression (**Anhang Tabelle 20**).

Die Ergebnisse haben gezeigt, dass durch die Inkubation der Caco-2 Zellen mit den OMVs von *P. mirabilis* sowohl nach 10 h als auch nach 24 h vor allem die Expression von Genen verändert wurde, welche mit inflammatorischen Prozessen zusammenhingen. Darüber hinaus zeigte sich ebenfalls in den Caco-2 Zellen, welche für 24 h mit der OMV-RNA transfiziert wurden, spezifische Veränderung der Genexpression.

4.10.4.1 Vergleich der Veränderungen mit *P. mirabilis* LPS

Wie bereits beschrieben wurde, konnte in den OMVs von *P. mirabilis* sowie der aus den OMVs isolierten RNA eine erhöhte LPS-Konzentration gemessen wurde (**Abb. 25**). Da LPS selbst dazu in der Lage ist in eukaryotischen Zellen inflammatorische Reaktionen auszulösen (Heumann & Roger, 2002), sollte im Rahmen der vorliegenden Arbeit ebenfalls der Effekt von *P. mirabilis* LPS auf das Transkriptom der Caco-2 Zellen untersucht werden. Damit sollte analysiert werden, inwiefern die Veränderungen auf Genexpressionsebene, welche zuvor detektiert wurden, möglicherweise auf das LPS in den jeweiligen Proben zurückgeführt werden können.

Nach Inkubation der Caco-2 Zellen mit dem *P. mirabilis* LPS konnte eine größere Anzahl von Genen detektieret werden, die eine veränderte Expression zeigten. Dabei war zu beobachten, dass nach 24 h ein größerer Teil der differentiell exprimierten Gene eine erhöhte Expression zeigte (**Abb. 37 A**). Im Gegensatz dazu waren nach Transfektion der Caco-2 Zellen mit den LPS von *P. mirabilis* sowohl nach 10 h als auch nach 24 h ein größerer Anteil der Gene in ihrer Expression verringert (**Abb. 37 B**). Vergleichbar mit den Zellen, die mit den OMVs inkubiert oder der OMV-RNA von *P. mirabilis* transfiziert wurden, wurde der überwiegende Anteil der differentiell exprimierten Gene exklusiv in jeweils einer der verschiedenen Bedingungen detektiert. Eine geringere Anzahl von Genen zeigte hingegen ebenfalls eine veränderte Expression in mehr als einer Bedingung (**Abb. 37 C**).

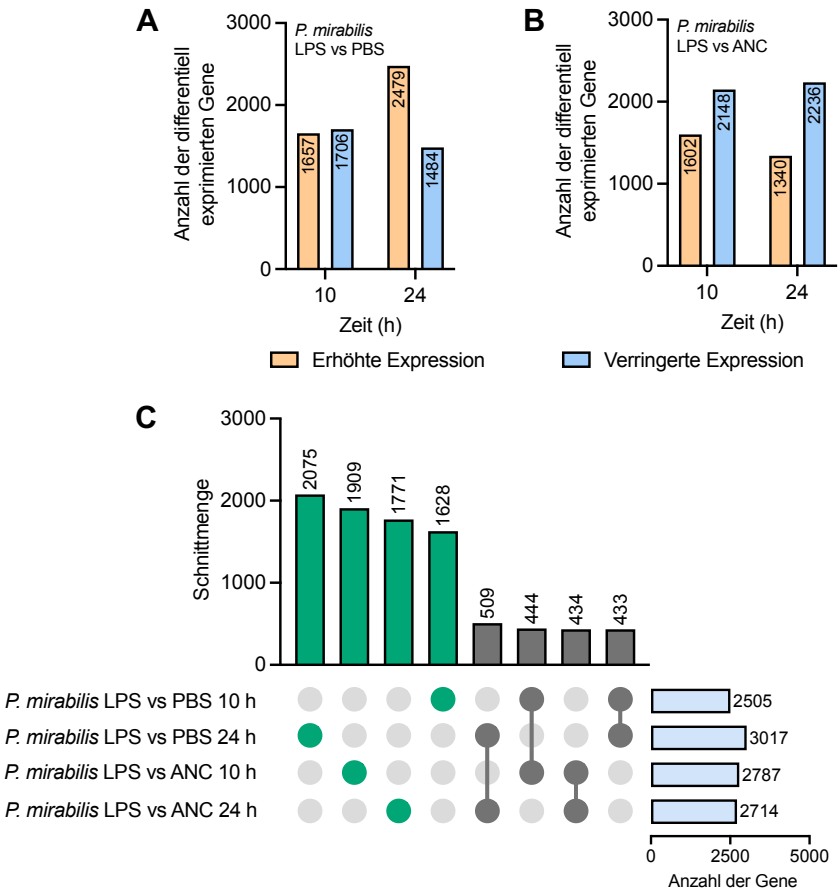

Abbildung 37: Differentiell exprimierte Gene nach Inkubation oder Transfektion der Caco-2 Zellen mit *P. mirabilis* LPS.
Dargestellt ist die jeweilige Anzahl der Gene, welche nach Inkubation der Zellen mit *P. mirabilis* LPS (**A**) oder Transfektion mit *P. mirabilis* LPS (**B**) für 10 h oder 24 h eine erhöhte oder verringerte Expression zeigten. Als Kontrollen dienten entweder PBS oder ANC. (**C**) Im Upset Plot ist zusätzlich die Anzahl der differentiell exprimierten Gene angegeben, die in jeweils einem oder mehreren der angegebenen Vergleiche detektiert wurden. Eine grüne Färbung kennzeichnet dabei die Gene, die lediglich in einem der jeweiligen Vergleiche detektiert wurden und eine graue Färbung diejenigen Gene, welche in mindestens zwei Vergleichen gefunden werden konnten.

Nach 10 h Inkubation der Caco-2 Zellen mit dem *P. mirabilis* LPS konnten nur wenige biologische Prozesse identifiziert werden, in denen die differentiell exprimierten Gene signifikant angereichert waren. Darunter fielen eher generelle Veränderungen in den Zellen wie „*regulation of ion transport*“ oder „*cell-cell signaling*“. Prozesse mit vermehrtem Bezug zur veränderten Immunantwort, wie sie bei Inkubation der Zellen mit *P. mirabilis* OMVs beobachtet werden konnten, waren nur wenig detektierbar. Diese umfassten Prozesse wie z. B. „*detection of bacterium*“ oder „*response to lipopolysaccharide*”, welche jedoch nicht signifikant angereichert waren (**Abb. 38 A**). Nach Transfektion der Caco-2 Zellen mit dem *P. mirabilis* LPS zeigten sich hingegen Veränderungen in der Expression von Genen, die mit Prozessen wie „*cell adhesion*“, „*acute-phase response*“ oder „*acute inflammatory response*“ assoziiert waren. Dazu gehörten z. B. *CCL2*, *CLDN10*, *CLDN14* oder auch *IL-1A*, die eine verringerte Expression nach Transfektion mit dem LPS zeigten. (**Abb. 38 B, Anhang Tabelle 24**).

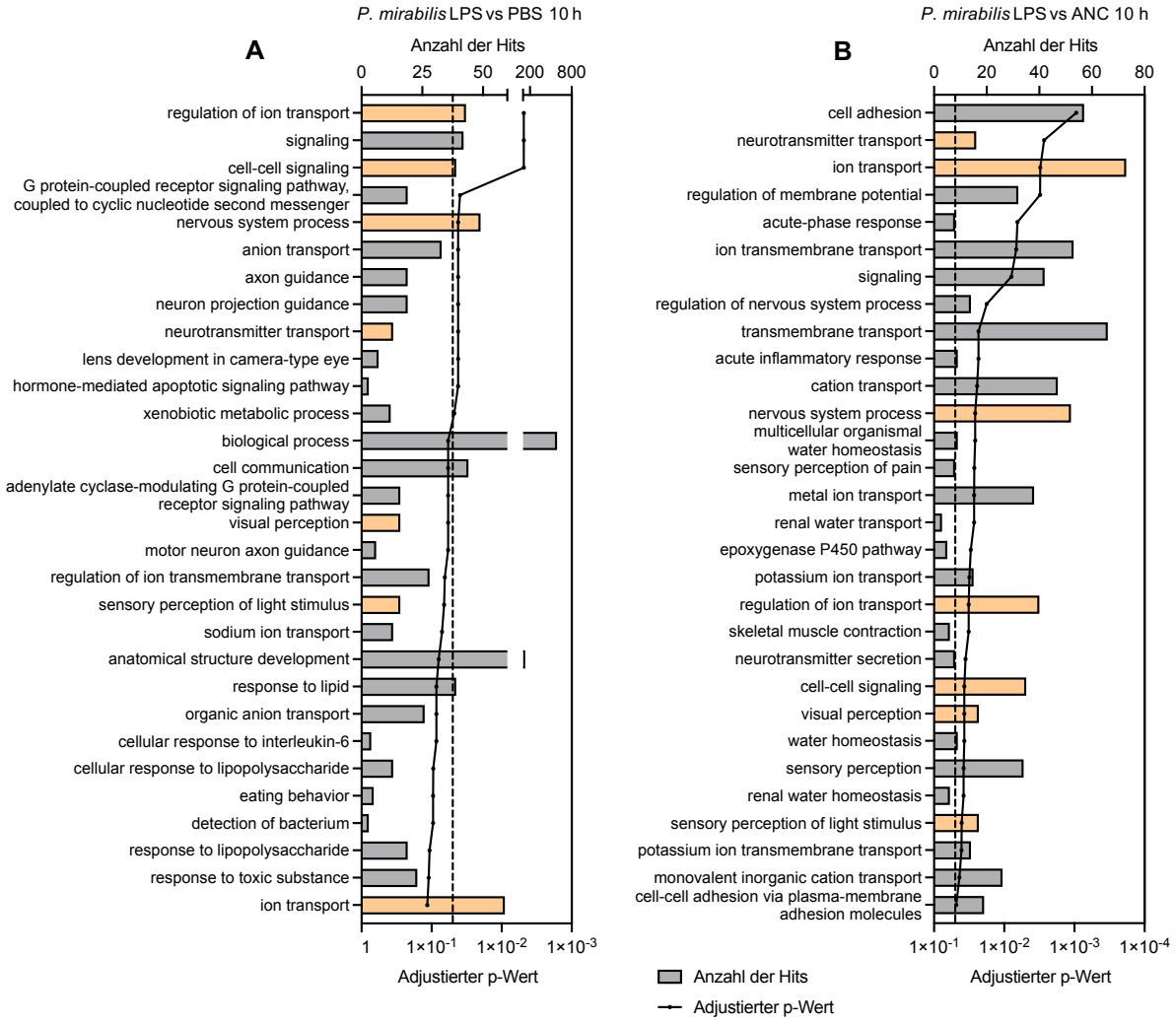

Abbildung 38: Anreicherungsanalyse von differentiell exprimierten Genen nach Inkubation oder Transfektion der Caco-2 Zellen mit *P. mirabilis* LPS für 10 h.
Zur Einordnung der Veränderungen in den Caco-2 Zellen in biologische Prozesse wurden auf Grundlage der differentiell exprimierten Gene nach Inkubation (**A**) oder Transfektion (**B**) mit *P. mirabilis* LPS eine Anreicherungsanalyse (*Over-representation analysis*, ORA) mit GeneTrail 3.2 durchgeführt. Dargestellt sind die ersten 30 biologischen Prozesse (Termini der Gene Ontology Kategorie: „Biological Process"), in denen die differentiell exprimierten Gene entsprechend ihres Benjamini-Hochberg-adjustierten p-Wertes signifikant angereichert waren. Die gestrichelte Linie kennzeichnet das Signifikanzniveau von p = 0,05. Biologische Prozesse, die sowohl nach Inkubation oder Transfektion der Caco-2 Zellen mit *P. mirabilis* LPS für 10 h angereichert waren, sind in Orange gekennzeichnet. Weitere biologische Prozesse, bei denen eine signifikante Anreicherung der differentiell exprimierten Gene beobachtet werden konnte, können **Tabelle 23** im Anhang entnommen werden.

Nach 24 h Inkubation der Zellen mit dem LPS zeigten sich weiterhin vermehrt generelle Veränderungen in allgemeinen biologischen Prozessen. Allerdings konnten auch Prozesse wie „*regulation of inflammatory response*" detektiert werden, in denen die differentiell exprimierten Gene signifikant angereichert waren und damit auf Veränderungen in Bezug auf das Auslösen einer Entzündungsreaktion in den Zellen schließen ließen (**Abb. 39 A**). Unter dieser Kategorie konnte z. B. eine erhöhte Expression der Gene *CCL5* und *IL-17C* beobachtet werden, während andere Gene wie *CXCL11* eine verringerte Expression zeigten (**Anhang**

Tabelle 24). Nach Transfektion der Caco-2 Zellen mit der *P. mirabilis* LPS für 24 h kam es in den Zellen zu Veränderungen in der Expression von Genen, die signifikant mit Prozessen wie „*cell adhesion*“, „*inflammatory response*“ oder auch dem JAK-STAT Signalweg assoziiert waren. Gene wie *CCL20*, *CLDN10* oder *TLR7* zeigten dabei eine verringerte Expression, während die Expression von z. B. *CCL22* oder *IL-6* erhöht war (**Abb. 39 B, Anhang Tabelle 24**).

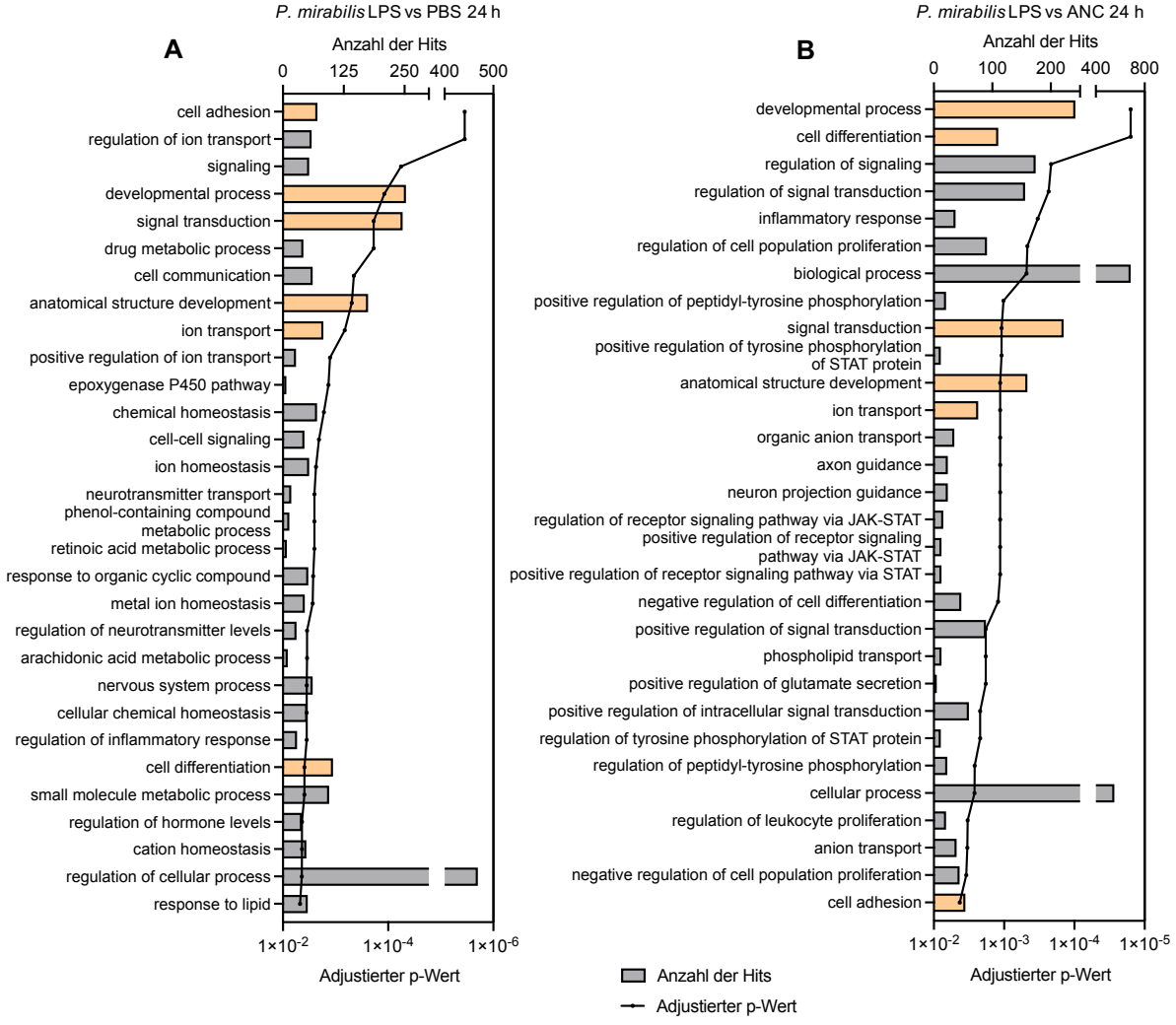

Abbildung 39: Anreicherungsanalyse von differentiell exprimierten Genen nach Inkubation oder Transfektion der Caco-2 Zellen mit *P. mirabilis* LPS für 24 h.
Zur Einordnung der Veränderungen in den Caco-2 Zellen in biologische Prozesse wurden auf Grundlage der differentiell exprimierten Gene nach Inkubation (**A**) oder Transfektion (**B**) mit *P. mirabilis* LPS eine Anreicherungsanalyse (*Over-representation analysis*, ORA) mit GeneTrail 3.2 durchgeführt. Dargestellt sind die ersten 30 biologischen Prozesse (Termini der Gene Ontology Kategorie: „Biological Process“), in denen die differentiell exprimierten Gene entsprechend ihres Benjamini-Hochberg-adjustierten p-Wertes signifikant angereichert waren. Die gestrichelte Linie kennzeichnet das Signifikanzniveau von p = 0,05. Biologische Prozesse, die sowohl nach Inkubation oder Transfektion der Caco-2 Zellen mit *P. mirabilis* LPS für 24 h angereichert waren, sind in Orange gekennzeichnet. Weitere biologische Prozesse, bei denen eine signifikante Anreicherung der differentiell exprimierten Gene beobachtet werden konnte, können **Tabelle 25** und **Tabelle 26** im Anhang entnommen werden.

Zuletzt sollte nochmals verglichen werden, ob die Effekte, welche durch Inkubation der Caco-2 Zellen mit den OMVs oder der Transfektion der OMV-RNA von *P. mirabilis* ausgelöst wurden, Ähnlichkeiten mit den Effekten nach Inkubation oder Transfektion mit dem LPS von *P. mirabilis* zeigten. Dafür wurden die Genexpressionsprofile der Zellen, die mit den OMVs inkubiert oder der OMV-RNA transfiziert wurden, mit denen der Zellen, die mit dem LPS inkubiert oder transfiziert wurden, verglichen.

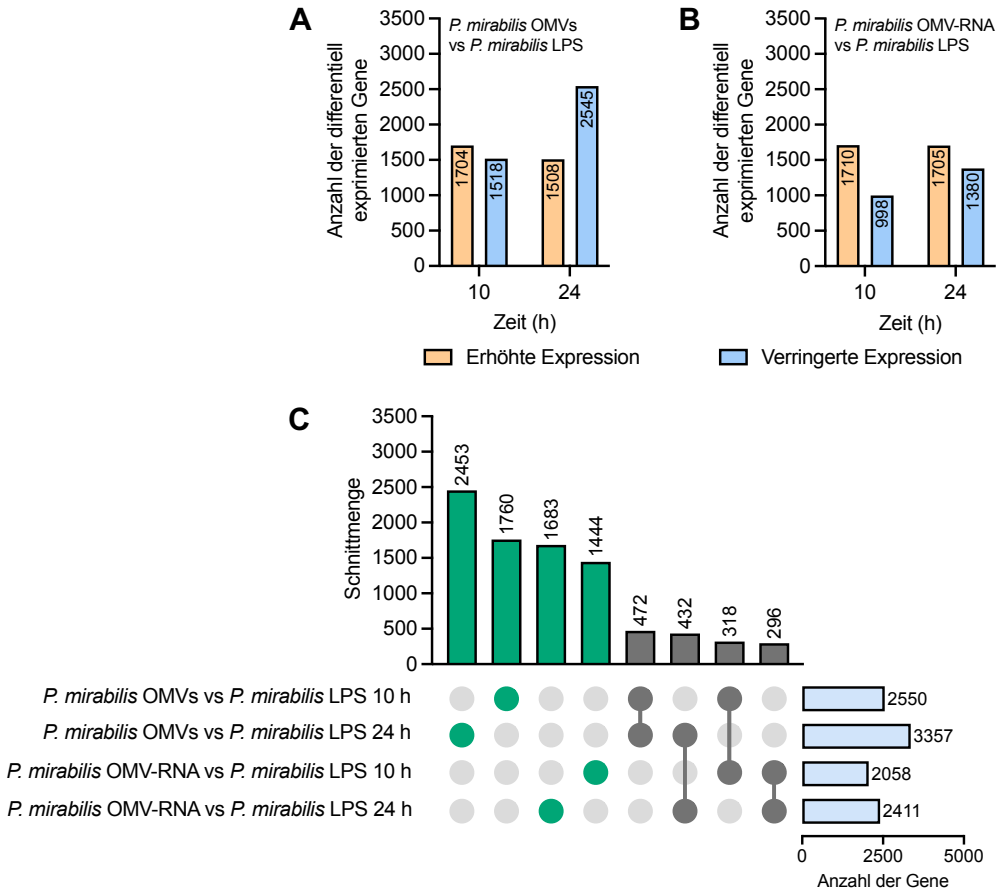

Abbildung 40: Differentiell exprimierte Gene nach Inkubation der Caco-2 Zellen mit *P. mirabilis* OMVs oder Transfektion mit *P. mirabilis* OMV-RNA verglichen mit *P. mirabilis* LPS.
Dargestellt ist die jeweilige Anzahl der Gene, welche nach Inkubation der Zellen mit *P. mirabilis* OMVs (**A**) oder Transfektion mit *P. mirabilis* OMV-RNA (**B**) im Vergleich mit *P. mirabilis* LPS für 10 h oder 24 h eine erhöhte oder verringerte Expression zeigten. (**C**) Im Upset Plot ist zusätzlich die Anzahl der differentiell exprimierten Gene angegeben, die in jeweils einem oder mehreren der angegebenen Vergleiche detektiert wurden. Eine grüne Färbung kennzeichnet dabei die Gene, die lediglich in einem der jeweiligen Vergleiche detektiert wurden und eine graue Färbung diejenigen Gene, welche in mindestens zwei Vergleichen gefunden werden konnten.

Dabei hat sich gezeigt, dass sowohl nach Inkubation der Zellen mit den OMVs von *P. mirabilis* als auch nach Transfektion der OMV-RNA verglichen mit LPS von *P. mirabilis* weiterhin eine große Anzahl der Gene differentiell exprimiert war. Dies lässt darauf schließen, dass sich die Effekte, welche durch die OMVs oder die OMV-RNA ausgelöst wurden, von den durch das reine LPS ausgelösten Effekten unterscheiden. Nach der Inkubation der Zellen mit den OMVs im Vergleich zum LPS zeigten nach 10 h eine ähnliche Anzahl an Genen eine erhöhte bzw.

verringerte Expression. Nach 24 h zeigten hingegen deutlich mehr Gene eine verringerte Expression (**Abb. 40 A**). Im Gegensatz dazu konnten nach Transfektion der OMV-RNA verglichen mit dem LPS zu beiden Zeitpunkten mehr Gene mit erhöhter Expression detektiert werden (**Abb. 40 B**). Zudem konnte erneut beobachtet werden, dass der größere Teil der differentiell exprimierten Gene an jeweils einem Zeitpunkt oder bei einer untersuchten Bedingung verändert war, während ein kleineres Set von Genen Veränderungen in mehr als einer der untersuchten Bedingungen zeigte (**Abb. 40 C**).

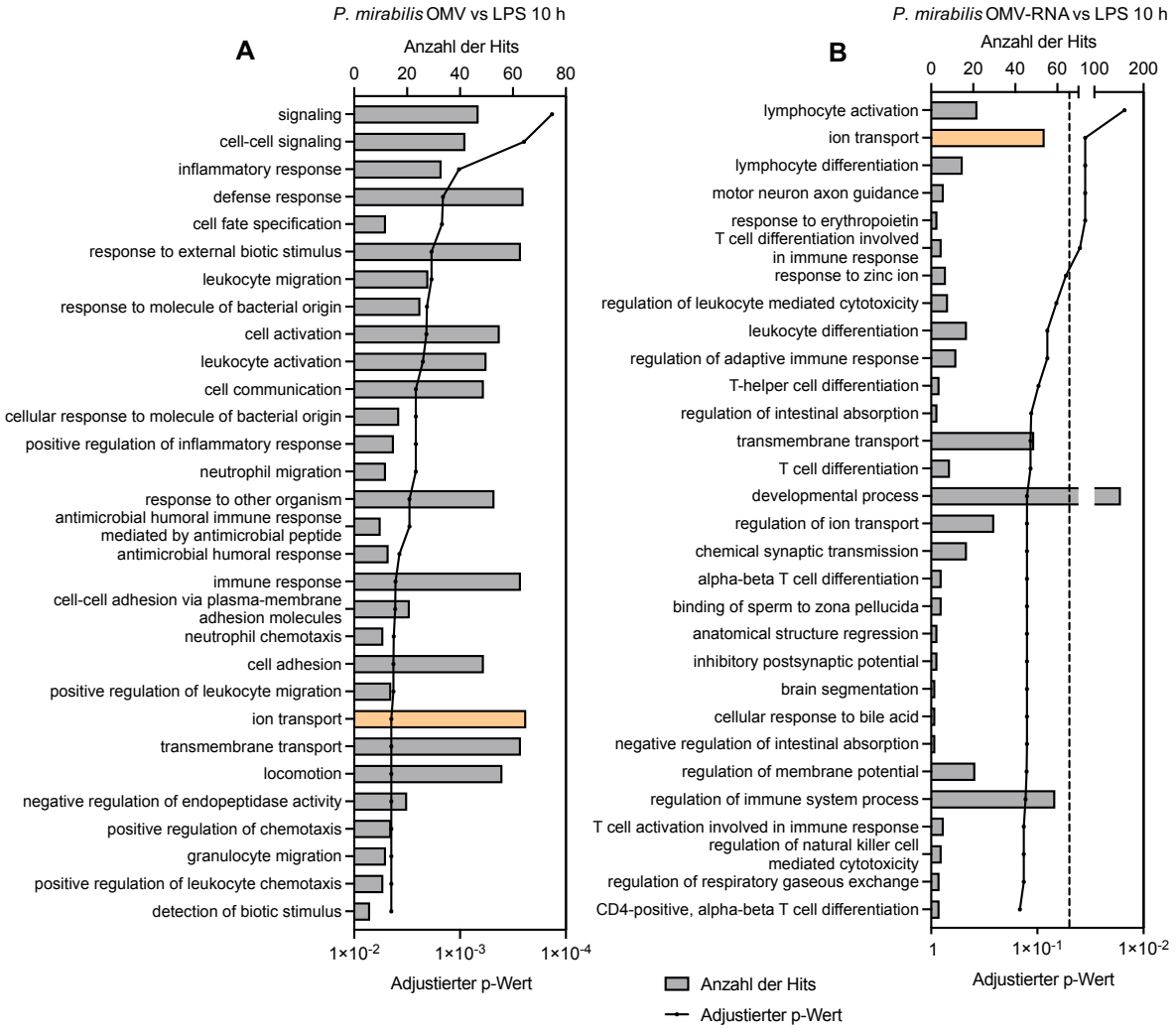

Abbildung 41: Anreicherungsanalyse von differentiell exprimierten Genen nach Inkubation der Caco-2 Zellen mit *P. mirabilis* OMVs oder Transfektion mit *P. mirabilis* OMV-RNA im Vergleich zu *P. mirabilis* LPS für 10 h.
Zur Einordnung der Veränderungen in den Caco-2 Zellen in biologische Prozesse wurden auf Grundlage der differentiell exprimierten Gene nach Inkubation mit *P. mirabilis* OMVs (**A**) oder Transfektion mit *P. mirabilis* OMV-RNA (**B**) eine Anreicherungsanalyse (*Over-representation analysis*, ORA) mit GeneTrail 3.2 durchgeführt. Dargestellt sind die ersten 30 biologischen Prozesse (Termini der Gene Ontology Kategorie: „Biological Process“), in denen die differentiell exprimierten Gene entsprechend ihres Benjamini-Hochberg-adjustierten p-Wertes signifikant angereichert waren. Die gestrichelte Linie kennzeichnet das Signifikanzniveau von p = 0,05. Biologische Prozesse, die sowohl nach Inkubation der Caco-2 Zellen mit den *P. mirabilis* OMVs als auch nach Transfektion mit der *P. mirabilis* OMV-RNA für 10 h angereichert waren, sind in Orange gekennzeichnet. Weitere biologische Prozesse, bei denen eine signifikante Anreicherung der differentiell exprimierten Gene beobachtet werden konnte, können **Tabelle 27** im Anhang entnommen werden.

Nach 10 h Inkubation der Caco-2 Zellen mit den OMVs verglichen mit dem *P. mirabilis* LPS waren die differentiell exprimierten Genen signifikant in biologischen Prozessen angereichert, welche mit Veränderungen in der Immunantwort assoziiert waren. Dazu gehörten z. B. „*inflammatory response*“, „*response to molecule of bacterial origin*”, „*antimicrobial humoral response*“ oder „*immune response*“ (**Abb. 41 A**). Nach Transfektion der OMV-RNA hingegen zeigten die differentiell exprimierten Gene in nur wenigen biologischen Prozessen eine signifikante Anreicherung. Unter den nicht signifikant angereicherten Prozessen waren jedoch solche, die ebenfalls auf eine Veränderung der Genexpression mit Bezug zur Immunantwort schließen ließen. Dazu gehörten z. B. „*regulation of adaptive immune response*“ oder „*regulation of immune system process*” (**Abb. 41 B**). Die Ergebnisse haben damit gezeigt, dass auch nach der Inkubation der Caco-2 Zellen mit den OMVs von *P. mirabilis* oder der Transfektion mit der OMV-RNA im direkten Vergleich zu LPS von *P. mirabilis* Gene verändert waren, die einen Bezug zur Immunantwort haben. Es ist demzufolge wahrscheinlich, dass ein Teil der beobachteten Veränderung im Transkriptom unabhängig von dem LPS hervorgerufen wurde. Um im Folgenden beurteilen zu können, inwiefern sich die Effekte nach Inkubation der Caco-2 Zellen mit den OMVs von *P. mirabilis* oder Transfektion mit der OMV-RNA tatsächlich von denen des LPS unterscheiden, wurde der Expressionsunterschied von einzelnen Genen in den verschiedenen Vergleichen gegenübergestellt.

Im direkten Vergleich ist erkennbar, dass die Expression von Genen wie *CCL20*, *CCL22*, *CXCL10* oder *CXCL8* vor allem nach 10 h Inkubation der Caco-2 Zellen mit den OMVs, nicht jedoch nach 10 h Inkubation mit dem LPS alleine erhöht war (**Tab. 7**). Dies ist ein starker Hinweis darauf, dass dieser Effekt unabhängig von dem LPS und möglicherweise durch andere Bestandteile der OMVs hervorgerufen worden ist. Bei anderen Genen wie *CCL5* oder *CXCL9* ließ sich hingegen eine höhere Expression nach Inkubation der Zellen mit dem LPS jedoch eine weniger stark erhöhte Expression nach Inkubation mit *P. mirabilis* OMVs detektieren. Diese Beobachtung deutete wiederum darauf hin, dass bei diesen Genen die veränderte Expression vermehrt durch das LPS hervorgerufen wurde. Wiederum bei anderen Genen wie *TLR3* war sowohl nach Inkubation der Caco-2 Zellen mit den OMVs als dem LPS im Vergleich zu PBS eine Verringerung der Expression des Gens zu beobachten. Im direkten Vergleich von OMVs gegen LPS trat diese Veränderung jedoch als Erhöhung der Expression von *TLR3* nach Inkubation mit dem OMVs in Erscheinung. Dies bestätigt nochmals die Wichtigkeit der detaillierten Analyse der Expression einzelner Gene, um so eventuelle Veränderungen der Expression korrekt beurteilen zu können.

Tabelle 7: Differentielle Expression von ausgewählten Genen nach Inkubation mit *P. mirabilis* OMVs oder *P. mirabilis* LPS für 10 h.
Angegeben ist sind die Log2 Fold Changes (Log2 FC) von ausgewählten Genen aus relevanten biologischen Prozessen. Ein Log2 FC > 0 deutet auf eine erhöhte, ein Log2 FC < 0 auf eine verringerte Expression des jeweiligen Gens in dem jeweiligen Vergleich hin. Die differentielle Expression weiterer ausgewählter Gene nach Inkubation von Caco-2 Zellen mit *P. mirabilis* OMVs im Vergleich zu *P. mirabilis* LPS kann **Tabelle 28** (Anhang) entnommen werden.

Gen Name	Log2 FC (OMV vs LPS)	Log2 FC (OMV vs PBS)	Log2 FC (LPS vs PBS)
CCL20	1,358	1,443	0,240
CCL22	3,531	3,885	0,353
CCL5	-1,661	0,614	2,336
CXCL10	2,533	2,817	0,181
CXCL11	1,435	2,473	1,026
CXCL8	2,358	2,131	-0,215
CXCL9	-0,513	0,534	1,027
TLR3	2,216	-0,478	-2,677
TLR7	2,575	1,523	-1,072
TNFRSF9	1,289	2,725	1,459

Ähnliche Ergebnisse zeigten sich auch bei der Analyse der Expressionsunterschiede einzelner Gene nach Transfektion der Caco-2 Zellen für 10 h mit der OMV-RNA oder LPS von *P. mirabilis* (**Tab. 8**). So konnten z. B. nach der Transfektion der Caco-2 Zellen mit der *P. mirabilis* OMV-RNA eine deutlich verminderte Expression von *CLDN18* und *CX3CL1* und Erhöhung der Expression von *TNFRSF11A* detektiert werden, während die Expression dieser Gene nach Transfektion des LPS nur leicht verändert war. Dem entgegengesetzt standen wiederum Gene wie *CCL20*, *CXCL5* oder *TLR3*, deren Expression sowohl nach Transfektion der OMV-RNA als auch des LPS in einem ähnlichen Maße verringert war.

Tabelle 8: Differentielle Expression von ausgewählten Genen nach Transfektion mit *P. mirabilis* OMV-RNA oder *P. mirabilis* LPS für 10 h.
Angegeben ist sind die Log2 Fold Changes (Log2 FC) von ausgewählten Genen aus relevanten biologischen Prozessen. Ein Log2 FC > 0 deutet auf eine erhöhte, ein Log2 FC < 0 auf eine verringerte Expression des jeweiligen Gens in dem jeweiligen Vergleich hin. Die differentielle Expression weiterer ausgewählter Gene nach Transfektion von Caco-2 Zellen mit *P. mirabilis* OMV-RNA im Vergleich zu *P. mirabilis* LPS kann **Tabelle 28** (Anhang) entnommen werden.

Gen Name	Log2 FC (OMV-RNA vs LPS)	Log2 FC (OMV-RNA vs ANC)	Log2 FC (LPS vs ANC)
CCL20	0,514	-1,427	-1,920
CCR9	-1,383	-0,071	1,318
CLDN18	-1,430	-1,931	-0,514
CX3CL1	-1,225	-2,045	-0,733
CXCL5	-0,122	-1,280	-1,112
IL-5	2,474	0,963	-1,471
TLR3	0,208	-0,982	-1,211
TNFRSF11A	1,093	1,724	0,614

Wenn die Zellen für 24 h mit den OMVs von *P. mirabilis* im Vergleich zu LPS inkubiert wurden, zeigten sich Veränderungen in der Expression von Genen, welche in Prozessen wie „*cell activation*“, „*inflammatory response*“ oder „*immune system process*“ angereichert waren (**Abb. 42 A**). Interessanterweise zeigte sich auch nach Transfektion der Caco-2 Zellen mit der OMV-RNA im Vergleich zum LPS eine signifikante Anreicherung von Genen in biologischen Prozessen, die mit der zellulären Reaktion auf Komponenten bakteriellen Ursprungs in Zusammenhang standen. Darunter fielen z. B. „*inflammatory response*“, „*defense response*“ oder „*response to molecule of bacterial origin*“ (**Abb. 42 B**).

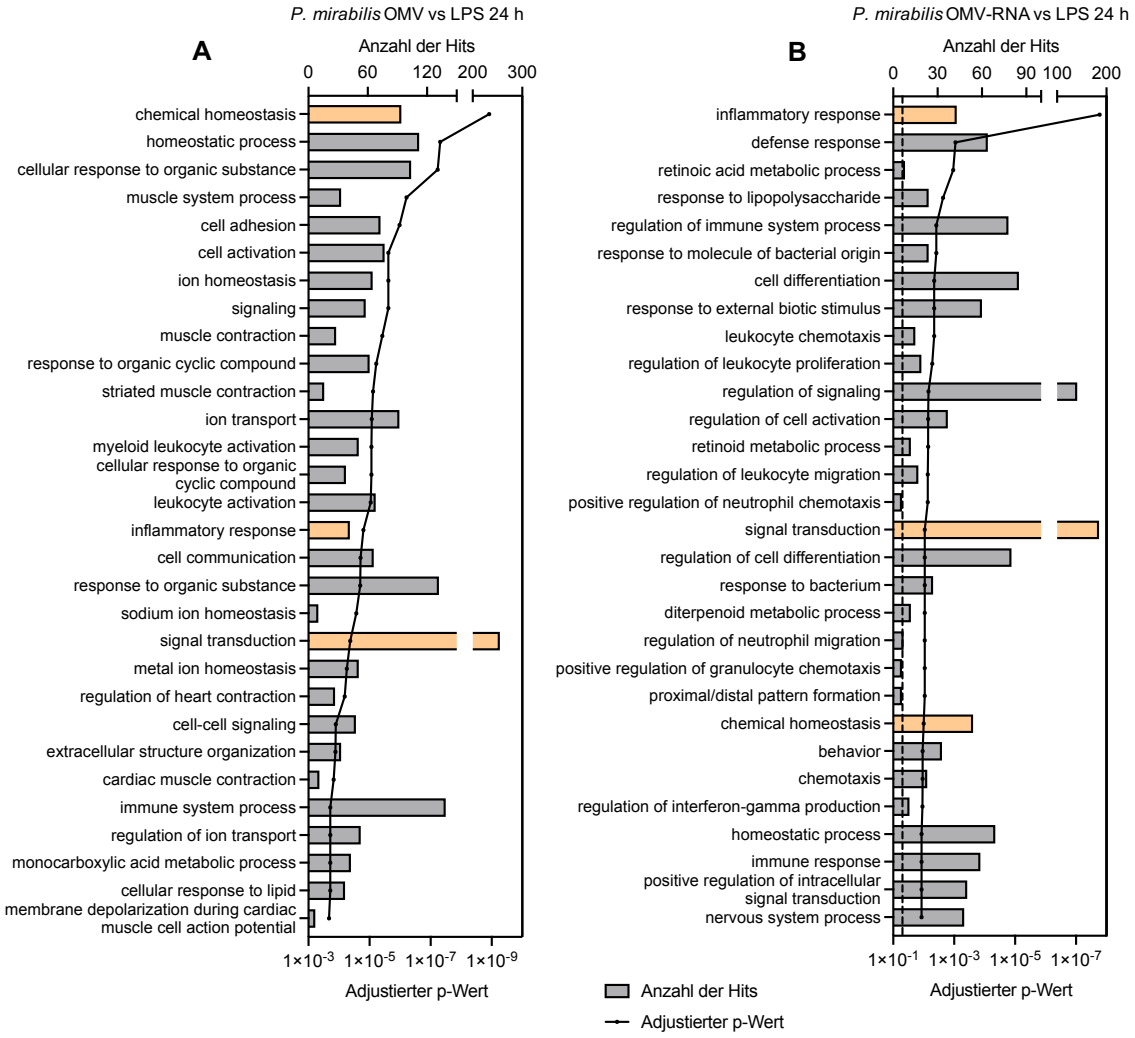

Abbildung 42: Anreicherungsanalyse von differentiell exprimierten Genen nach Inkubation der Caco-2 Zellen mit *P. mirabilis* OMVs oder Transfektion mit *P. mirabilis* OMV-RNA im Vergleich zu *P. mirabilis* LPS für 24 h.

Zur Einordnung der Veränderungen in den Caco-2 Zellen in biologische Prozesse wurden auf Grundlage der differentiell exprimierten Gene nach Inkubation mit *P. mirabilis* OMVs (**A**) oder Transfektion mit *P. mirabilis* OMV-RNA (**B**) eine Anreicherungsanalyse (*Over-representation analysis*, ORA) mit GeneTrail 3.2 durchgeführt. Dargestellt sind die ersten 30 biologischen Prozesse (Termini der Gene Ontology Kategorie: „Biological Process“), in denen die differentiell exprimierten Gene entsprechend ihres Benjamini-Hochberg-adjustierten p-Wertes signifikant angereichert waren. Die gestrichelte Linie kennzeichnet das Signifikanzniveau von p = 0,05. Biologische Prozesse, die sowohl nach Inkubation der Caco-2 Zellen mit den *P. mirabilis* OMVs als auch nach Transfektion mit der *P. mirabilis* OMV-RNA für 24 h angereichert waren, sind in Orange gekennzeichnet. Weitere biologische Prozesse, bei denen eine signifikante Anreicherung der differentiell exprimierten Gene beobachtet werden konnte, können **Tabelle 29** und **Tabelle 30** im Anhang entnommen werden.

Ebenso wie nach 10 h konnten auch nach 24 h Inkubation der Caco-2 Zellen mit den OMVs von *P. mirabilis* oder dem LPS Unterschiede in der Expression einzelner ausgewählter Gene detektiert werden (**Tab. 9**). So war z. B. die Expression von *CCL20*, *CXCL1*, *CXCL10*, *TLR3* und *TLR7* nach Inkubation mit den OMVs deutlich erhöht, wohingegen die Expression derselben Gene nach Inkubation der Caco-2 Zellen mit dem LPS nur leicht erhöht oder sogar verringert war. Bei diesen Genen konnte daher ebenfalls davon ausgegangen werden, dass die beobachteten Veränderungen mit großer Wahrscheinlichkeit unabhängig vom LPS ausgelöst wurden. Außerdem konnte ebenfalls beobachtet werden, dass die Expression einiger Gene wie *NLRP1* oder *TNFRSF11A* nach Inkubation mit den OMVs oder LPS ähnlich stark beeinflusst wurde, wodurch bei diesen Genen wiederum nicht ausgeschlossen werden kann, dass die Veränderung durch das LPS in den OMVs hervorgerufen wurde.

Tabelle 9: Differentielle Expression von ausgewählten Genen nach Inkubation mit *P. mirabilis* OMVs oder *P. mirabilis* LPS für 24 h.
Angegeben ist sind die Log2 Fold Changes (Log2 FC) von ausgewählten Genen aus relevanten biologischen Prozessen. Ein Log2 FC > 0 deutet auf eine erhöhte, ein Log2 FC < 0 auf eine verringerte Expression des jeweiligen Gens in dem jeweiligen Vergleich hin. Die differentielle Expression weiterer ausgewählter Gene nach Inkubation von Caco-2 Zellen mit *P. mirabilis* OMVs im Vergleich zu *P. mirabilis* LPS kann **Tabelle 28** (Anhang) entnommen werden.

Gen Name	Log2 FC (OMV vs LPS)	Log2 FC (OMV vs PBS)	Log2 FC (LPS vs PBS)
CCL20	1,627	2,039	0,448
CXCL1	1,539	2,055	0,577
CXCL10	1,857	2,076	0,252
CXCL11	1,699	-0,258	-1,972
CXCL8	1,416	2,880	1,491
NLRP1	-0,733	2,868	3,498
NLRP6	-1,544	-0,502	1,030
TLR3	2,394	1,979	-0,320
TLR7	1,180	2,142	0,975
TNFRSF11A	-0,486	1,378	1,867

Weiterhin waren auch nach Transfektion der *P. mirabilis* OMV-RNA oder des LPS für 24 h einige Unterschiede erkennbar. So zeigte sich z. B. deutlich, dass die Transfektion der Caco-2 Zellen mit der OMV-RNA, nicht jedoch mit dem LPS zur Erhöhung der Expression von *IL-27* führte. Zudem waren bei einigen der in **Tab. 10** dargestellten Gene eine Verringerung der Expression nach Transfektion mit LPS aber nicht nach Transfektion der OMV-RNA zu beobachten. Dies traf z. B. auf die Gene *CSF1*, *CXCR4*, *IL-23A*, *NLRP6* und *TLR7* zu.

Tabelle 10: Differentielle Expression von ausgewählten Genen nach Transfektion mit *P. mirabilis* OMV-RNA oder *P. mirabilis* LPS für 24 h.
Angegeben ist sind die Log2 Fold Changes (Log2 FC) von ausgewählten Genen aus relevanten biologischen Prozessen. Ein Log2 FC > 0 deutet auf eine erhöhte, ein Log2 FC < 0 auf eine verringerte Expression des jeweiligen Gens in dem jeweiligen Vergleich hin. Die differentielle Expression weiterer ausgewählter Gene nach Transfektion von Caco-2 Zellen mit *P. mirabilis* OMV-RNA im Vergleich zu *P. mirabilis* LPS kann **Tabelle 28** (Anhang) entnommen werden.

Gen Name	Log2 FC (OMV-RNA vs LPS)	Log2 FC (OMV-RNA vs ANC)	Log2 FC (LPS vs ANC)
CCL22	-3,194	-0,846	2,348
CCR7	-1,929	-1,486	0,409
CSF1	2,054	0,506	-1,551
CXCR3	1,054	-1,205	-2,154
CXCR4	1,503	-0,354	-1,780
IL-23A	1,224	-0,372	-1,630
IL-27	1,247	1,624	0,409
NLRP6	1,073	-0,167	-1,261
TLR7	1,125	-0,216	-1,351
TNFRSF11A	1,616	0,601	-1,018

Zusammenfassend zeigte die Gegenüberstellung der Expression der einzelnen Gene, dass zum Teil deutliche Unterschiede hinsichtlich der Veränderungen der Genexpression existieren, welche durch die OMVs oder die OMV-RNA im Vergleich zum LPS hervorgerufen wurden. Durch die genaue Analyse einzelner Gene konnten so bestimmte Gene wie etwa *CCL20*, *CXCL10* und *CXCL8* identifiziert werden, deren Expression mit großer Wahrscheinlichkeit unabhängig vom LPS durch die Inkubation der Caco-2 Zellen mit den *P. mirabilis* OMVs selbst erhöht war. Diese Ergebnisse haben somit gezeigt, dass eine Veränderung der Genexpression unabhängig von dem LPS auch durch andere Komponenten der OMVs wie die mit den OMVs assoziierten RNA ausgelöst werden kann.

Teil III: Interaktion von Bakterien mit eukaryotischen EVs und humanen EV-miRNAs

4.11 Charakterisierung von eukaryotischen EVs

Im Rahmen dieser Arbeit wurden neben bakteriellen auch EVs der humanen Zelllinie Caco-2 als Beispiel für EVs eukaryotischen Ursprungs analysiert. Dabei wurden für die Produktion der EVs je nach Verwendungszweck unterschiedliche Kultivierungsbedingungen gewählt. Caco-2 (-FCS) EVs wurden aus Überständen von Zellen isoliert, die mit FCS-freien Medium kultiviert wurden. Im Gegensatz dazu wurden Caco-2 (+FCS) EVs aus Überständen von Zellen isoliert, die mit FCS-haltigem Zellkulturmedium kultiviert wurden. Zusätzlich wurden ebenfalls EVs aus dem FCS-haltigen Zellkulturmedium selbst isoliert, ohne dass dieses vorher in Kontakt mit den Caco-2 Zellen gekommen ist. Diese EVs werden im Folgenden als DMEM (+FCS) EVs bezeichnet.

Wie die BEVs wurde auch die eukaryotischen EVs, im Folgenden nur noch als EVs bezeichnet, durch Ultrazentrifugation des Kulturmediums zunächst pelletiert und anschließend mittels SEC aufgereinigt. Die Überprüfung der erfolgreichen Trennung von EVs und freien Proteinen sowie die Bestimmung der Proteinkonzentration in den EV-enthaltenden Fraktionen erfolgte ebenfalls mit Hilfe des BCA Assays. In **Abb. 43 A**, **B** und **C** sind beispielhaft die Ergebnisse des BCA Assays als Chromatogramme dargestellt. Wie auch bei den BEVs können nach der Aufreinigung der EVs im BCA Assay zwei Bereiche mit erhöhten Absorptionswerten detektiert werden. Die EVs waren dabei in den Fraktionen 13 bis 15 lokalisiert. Die korrespondierenden Proteinkonzentrationen in der EV-Fraktionen mit der höchsten Absorptionswerten waren für die Caco-2 (-FCS) EVs mit 12,43 ± 2,21 µg/ml von allen untersuchten Bedingungen am höchsten (**Abb. 43 D**). Die Caco-2 (+FCS) EVs hatten eine Proteinkonzentration von 8,47 ± 1,96 µg/ml (**Abb. 43 E**). Am geringsten war die Proteinkonzentration in den DMEM (+FCS) EVs mit 5,05 ± 0,52 µg/ml (**Abb. 43 F**).

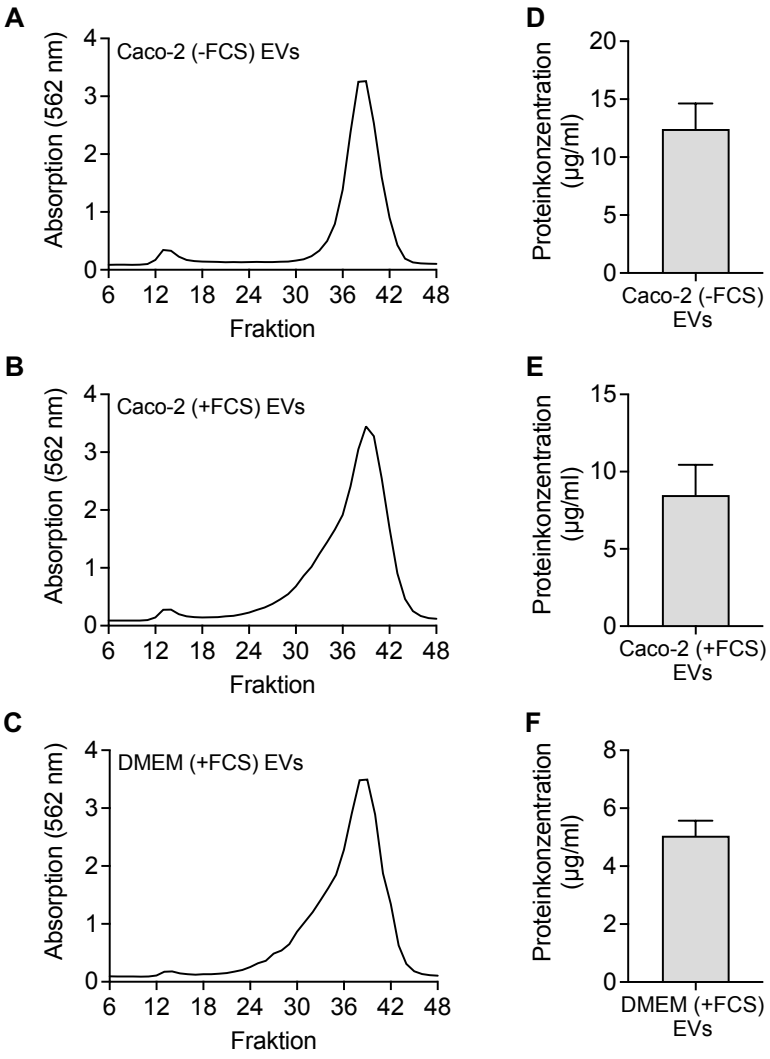

Abbildung 43: Chromatogramme und Proteinkonzentrationen von aufgereinigten EVs.
Dargestellt sind exemplarisch die Chromatogramme für jedes der EV-Pellets aus einer der drei unterschiedlichen Konditionen [Caco-2 (-FCS) EVs, **A**; Caco-2 (+FCS) EVs, **B**; DMEM (+FCS) EVs, **C**] nach SEC. Eine Fraktion entspricht einem Volumen von 1 ml, das während der SEC als Durchfluss aus der Chromatographiesäule aufgefangen wurde. (**D**, **E** und **F**) Die Proteinkonzentrationen wurden anhand der höchsten Absorptionswerte in den EV-Fraktionen ermittelt. Angegeben sind Mittelwerte sowie Standardabweichungen von 5-6 unabhängigen Experimenten.

Im Anschluss wurde von den EV-Fraktionen mit den höchsten Proteinkonzentrationen die Partikelkonzentration und -größe mittels NTA gemessen. Wie sich in **Abb. 44** erkennen lässt, zeigten die EVs aus allen drei Konditionen eine ähnliche Größenverteilung. Die meisten Partikel hatten eine Größe von 100 - 200 nm (**Abb. 44 A, B und C**). Die Präsenz von Partikeln mit einer Größe von 100 - 200 nm konnte ebenfalls mittels Kryo-TEM bestätigt werden. In den Kryo-TEM Aufnahmen ließ sich auch die runde Struktur der EVs erkennen. Neben EVs mit einer einzelnen Lipidschicht konnten auch EVs mit einer doppelten Lipidschicht (**Abb. 44 D, E und F**) gefunden werden.

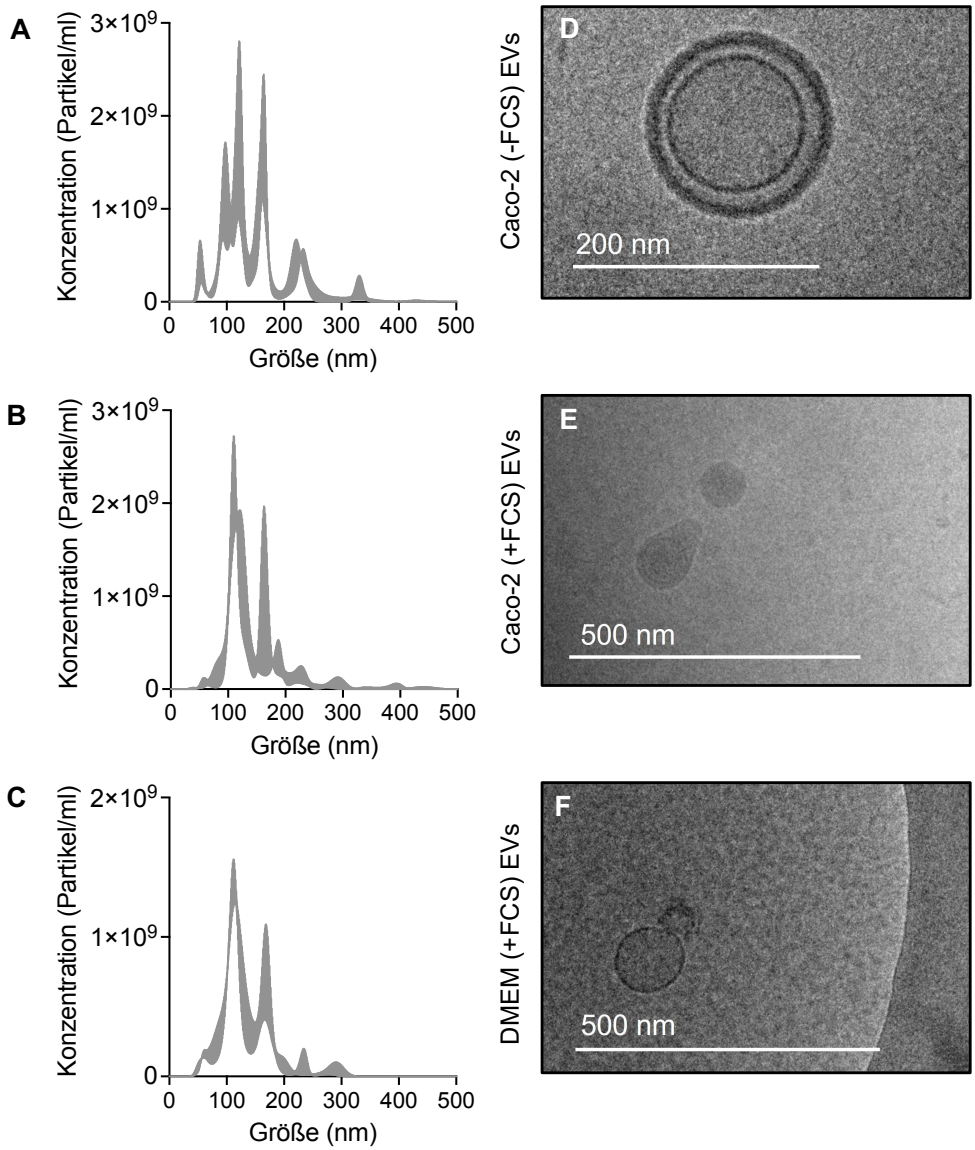

Abbildung 44: Größenverteilung und Kryo-TEM Aufnahmen von EVs.
Dargestellt ist die Größenverteilung der aufgereinigten EVs. Angegeben sind die Mittelwerte sowie Standarderror von drei Messungen einer exemplarischen Probe Caco-2 (-FCS) EVs (**A**), Caco-2 (+FCS) EVs (**B**) und DMEM (+FCS) EVs (**C**). (**D**, **E** und **F**) Die Kryo-TEM Aufnahmen zeigen beispielhaft die EVs der unterschiedlichen Konditionen. Größenstandard: 200 nm und 500 nm

Wie bereits erwähnt dienten DMEM (+FCS) EVs in den nachfolgenden Versuchen als Kontrolle für die Analyse der Caco-2 (+FCS) EVs. Dies war besonders wichtig, da es durch die Anwesenheit von EVs aus dem FCS zur Überschätzung der Konzentration von EVs, die von den eukaryotischen Zellen in das Medium abgegeben werden, kommen kann. In **Abb. 45** ist nochmals deutlich zu erkennen, dass sowohl die Caco-2 (+FCS) EVs als auch die DMEM (+FCS) EVs nach SEC in den Fraktionen 13 bis 15 lokalisiert sind (**Abb. 45 A**). Für die Caco-2 (+FCS) EVs konnte eine Konzentration von 1,09 x 10^{11} ± 2,83 x 10^{10} Partikel/ml und für die DMEM (+FCS) EVs von 7,38 x 10^{10} ± 1,34 x 10^{10} Partikel/ml gemessen werden (**Abb. 45 B**).

Damit war die Konzentration der Caco-2 (+FCS) EVs zwar signifikant höher als die der DMEM (+FCS) EVs, trotzdem zeigt dieses Ergebnis, dass die Konzentration der EVs aus dem DMEM (+FCS) insgesamt relativ hoch ist. Es könnte somit sein, dass ein Großteil der Caco-2 (+FCS) EVs von dem FCS stammte. Die Größe der EVs war mit 123,05 ± 10,43 nm für die Caco-2 (+FCS) EVs und 117,36 ± 6,94 nm für DMEM (+FCS) EVs sehr ähnlich und unterschied sich nicht signifikant (**Abb. 45 C**) Die durchschnittliche Größe der Caco-2 (-FCS) EVs lag bei 121,24 ± 6,08 nm und die Partikelkonzentration bei etwa 1,19 x 10^{11} ± 2,71 x 10^{10} Partikel/ml (**Abb. 45 D, E und F**).

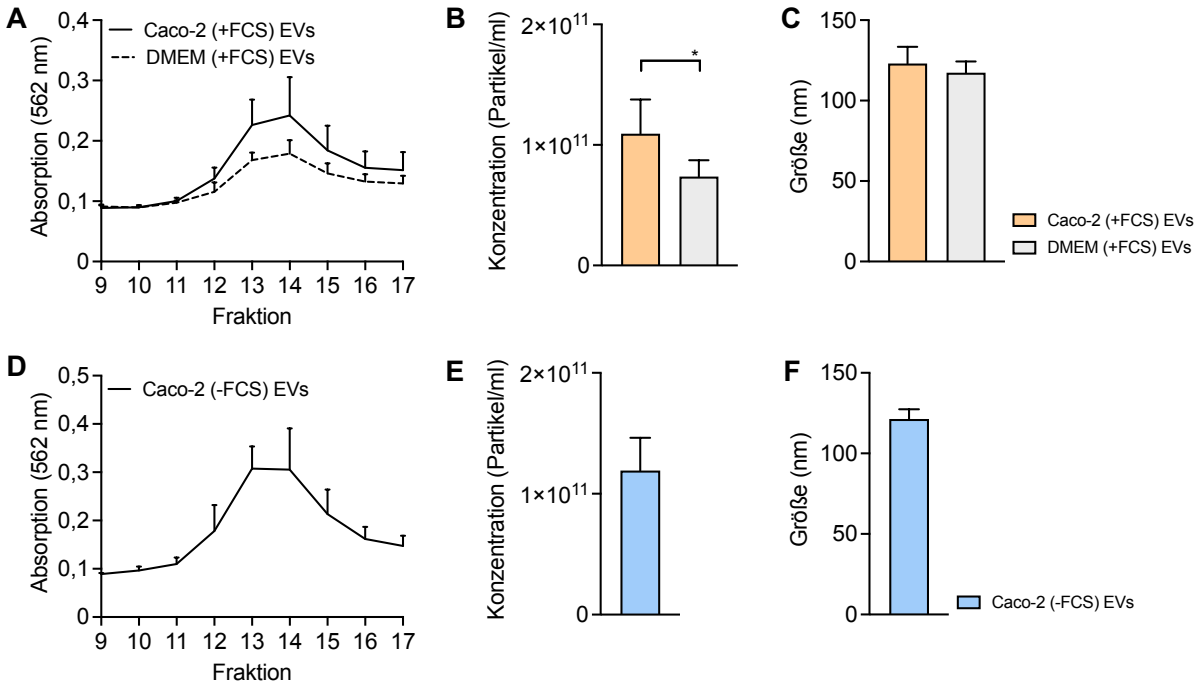

Abbildung 45: Chromatogramme, Konzentrationen und Größe von EV.
Dargestellt sind die Chromatogramme von Caco-2 (+FCS) EVs, DMEM (+FCS) EVs und Caco-2 (-FCS) EVs nach SEC in den Fraktionen 9 bis 17 (**A** und **D**). Angegeben sind Mittelwerte und Standardabweichungen von 5-6 unabhängigen Experimenten. Die Partikelkonzentration (**B** und **E**) sowie -größe (**C** und **F**) wurde mittels NTA gemessen. Angegeben sind ebenfalls Mittelwerte sowie Standardabweichungen von 5-7 unabhängigen Experimenten. Zur Ermittlung von statistischen Signifikanzen wurden ein zweiseitiger ungepaarter t-Test durchgeführt ($p < 0,05$ *).

Zur weiteren Charakterisierung der EVs wurde auch die Anwesenheit von ausgewählten Proteinen im Rahmen eines Western Blots untersucht. Dafür wurden jeweils exemplarisch die EVs, welche aus den drei unterschiedlichen Bedingungen isoliert wurden, sowie Proteine, die aus den Caco-2 Zellen selbst isoliert wurden, analysiert. In **Abb. 46** ist ein repräsentativer Western Blots dargestellt. Es ist deutlich sichtbar, dass in allen drei EV-Proben ebenso wie dem Gesamtzellextrakt ein Signal für CD81 detektiert werden konnte. Bei CD81 (*Cluster of Differentiation 81*) handelt es sich ein Mitglied der Tetraspanin-Familie und damit um ein Protein, welches auf der Oberfläche von vielen Zellen aber auch EVs zu finden ist (Andreu & Yáñez-Mó, 2014). Die Unterschiede in der Bandenintensität lassen sich hierbei auf die unterschiedliche Menge an EVs, welche für den Western Blot genutzt wurden, zurückführen. Die Intensitäten decken sich dabei mit den Partikelkonzentrationen, die zuvor mittels NTA gemessen wurden (**Abb. 45 B und E**).

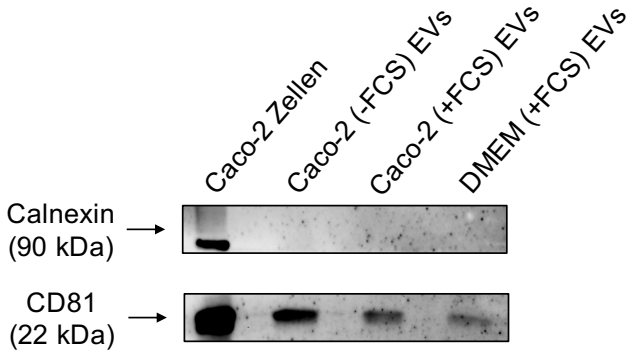

Abbildung 46: Detektion von Proteinen in Caco-2 Zellextrakt und aufgereinigten EVs.
Dargestellt ist ein repräsentativer Western Blot für die Calnexin und CD81. Das Proteinlevel wurde mit Hilfe spezifischer Antikörper in Caco-2 Zellextrakt und aufgereinigten Caco-2 (-FCS) EVs, Caco-2 (+FCS) EVs oder DMEM (+FCS) EVs nachgewiesen.

Weiterhin wurde auch die Anwesenheit von Calnexin untersucht. Dabei konnte nur im Gesamtzellextrakt, nicht aber in den EV-Proben ein Signal für Calnexin mittels Western Blot detektiert werden (**Abb. 46**). Dies war zu erwarten, da es sich bei Calnexin um ein integrales Membranprotein des endoplasmatischen Retikulums (Paskevicius et al., 2023) und damit um einen zellulären Marker handelt. Die Abwesenheit von Signalen für Calnexin in den Caco-2 (+FCS) und Caco-2 (-FCS) EVs deutet darauf hin, dass während der Isolation und Aufreinigung der EVs aus den Zellkulturüberständen keine zellulären Bestandteile zurückgeblieben sind. Da es sich bei DMEM (+FCS) EVs um Partikel handelte, die aus Zellkulturmedium isoliert wurden, welches zuvor nicht mit den Caco-2 Zellen in Kontakt gekommen, wurde ebenfalls die Abwesenheit von Signalen für Calnexin erwartet. Dies konnte mit Hilfe des Western Blots bestätigt werden.

4.12 Internalisierung von Caco-2 EVs in Bakterien

Eine Voraussetzung für die Kommunikation von humanen Zellen mit Bakterien über EVs ist, dass die Bakterien dazu in der Lage sein müssen, mit den EVs zu interagieren bzw. diese zu internalisieren. Um dies zu überprüfen, wurden die Bakterien mit PKH26-gelabelten EVs inkubiert und mittels CLSM analysiert. Im Rahmen dieses Versuches wurden dafür bewusst die Caco-2 (-FCS) EVs verwendet, um auszuschließen, dass nicht die Aufnahme der EVs aus dem FCS beobachtet wird.

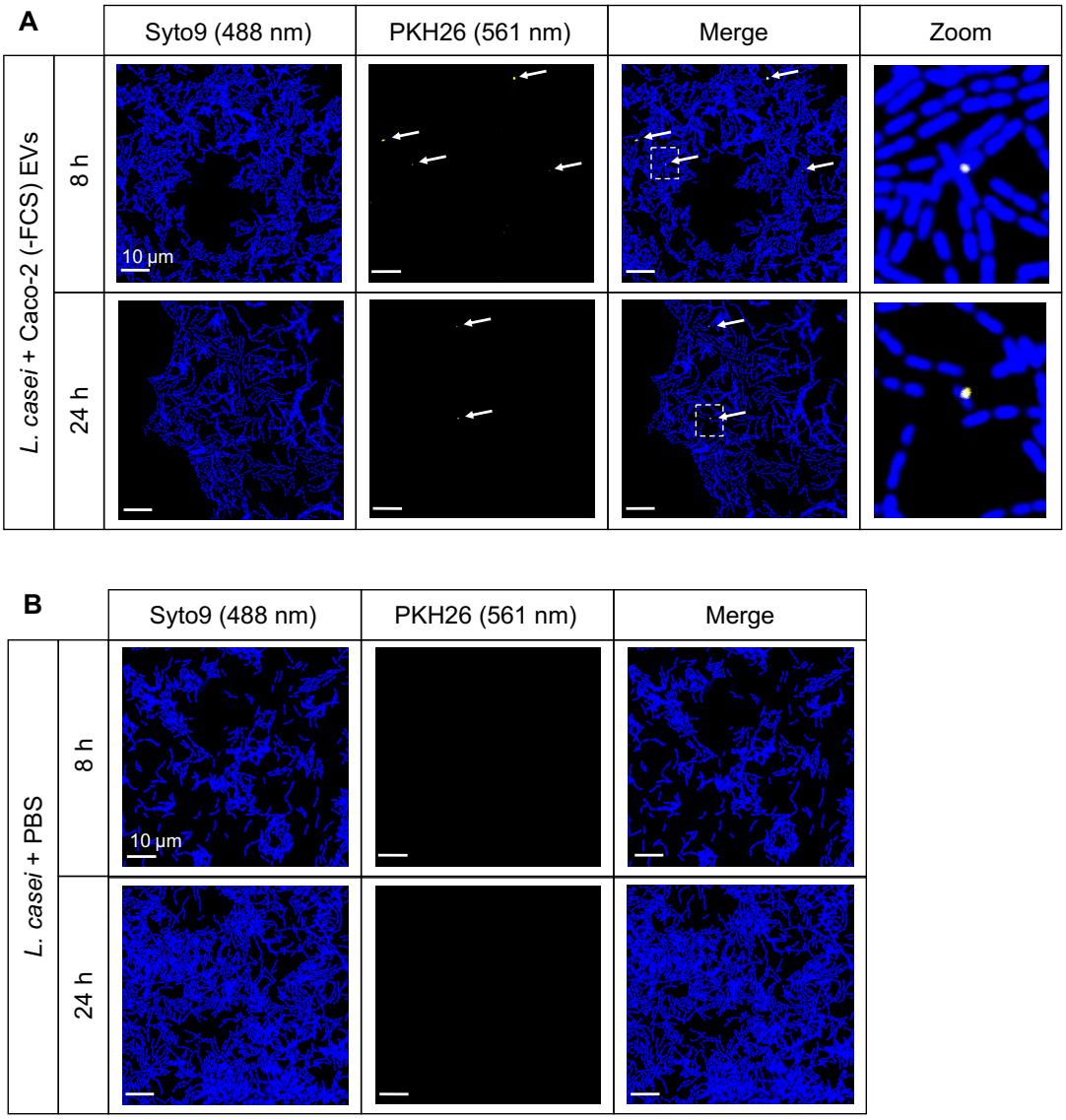

Abbildung 47: Visualisierung der Interaktion von *L. casei* mit Caco-2 (-FCS) EVs.
Die Bakterien wurden für 8 h oder 24 h mit PKH26-gelabelten Caco-2 (-FCS) EVs (**A**) oder PBS als Kontrolle (**B**) inkubiert. Nach Ende der Inkubationszeit wurden die Bakterien mit SYTO™ 9 angefärbt und fixiert. SYTO™ 9 wurde mit einem Argonlaser bei 488 nm und PKH26 mit einem DPSS Laser bei 561 nm sichtbar gemacht. Zur besseren Veranschaulichung wurden die Bakterien in Blau und die gelabelten Caco-2 (-FCS) EVs in Gelb dargestellt. Die weißen Pfeile kennzeichnen Bereiche, in denen PKH26-gelabelte Caco-2 (-FCS) EVs detektiert werden konnten. Größenstandard: 10 µm

Bei *L. casei* konnten bereits nach 8 h Kultivierung der Bakterien in Anwesenheit der PKH26-gelabelten Caco-2 (-FCS) EVs erste Signale detektiert werden (**Abb. 47 A, weiße Pfeile**). Die Caco-2 (-FCS) EVs zeigten dabei entweder eine Co-Lokalisation mit den Bakterien, wie im vergrößerten Ausschnitt nach 8 h gezeigt, oder sie konnten in unmittelbarer Nähe zu den Bakterien detektiert werden. Auch nach 24 h ließen sich Signale für die gelabelten Caco-2 (-FCS) EVs detektieren. Optisch konnte jedoch keine vermehrte Co-Lokalisation der gelabelten Caco-2 (-FCS) EVs mit den Bakterien im Vergleich zu 8 h Inkubation beobachtet werden (**Abb. 47 A**). Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass die Bakterien in der exponentiellen Wachstumsphase vermehrt mit den EVs interagierten und sich die Signalintensität mit steigender Anzahl der Bakterien über die Zeit verringerte. Im Gegensatz dazu waren bei den Bakterien, die als Kontrolle mit PBS inkubiert wurden, keine Signale detektierbar (**Abb. 47 B**). Auch bei *E. faecalis* konnten gelabelte Caco-2 (-FCS) EVs detektiert werden (**Abb. 48 A, weiße Pfeile**). Nach 4 h und 8 h zeigten optisch ungefähr eine ähnliche Anzahl der Bakterien eine Co-Lokalisation oder räumliche Nähe zu den Caco-2 (-FCS) EVs. Nach 24 h war hingegen ein deutlicher Anstieg von Bakterien sichtbar, die eine Interaktion oder Internalisierung der gelabelten EVs gezeigt haben (**Abb. 48 A**). Auch bei *P. mirabilis* konnten sowohl nach 4 h, 8 h und 24 h PKH26-gelabelten Caco-2 (-FCS) EVs detektiert werden (**Abb. 49 A, weiße Pfeile**). Im Gegensatz zu *E. faecalis* waren bei *P. mirabilis* jedoch nur vereinzelt Bakterien sichtbar, bei denen EVs in räumlicher Nähe zu den Bakterien detektiert werden konnten. Außerdem schien es mit zunehmender Inkubationszeit weder zur Zunahme noch zur Abnahme von Bakterien, die mit den Caco-2 (-FCS) EVs interagiert haben, zu kommen. Zur Kontrolle wurde *E. faecalis* und *P. mirabilis* mit PBS inkubiert, um die Spezifität der Signale zu untersuchen. Dabei konnte zu keinem der untersuchten Zeitpunkte Signale für PKH26 detektiert werden (**Abb. 48 B und 49 B**).

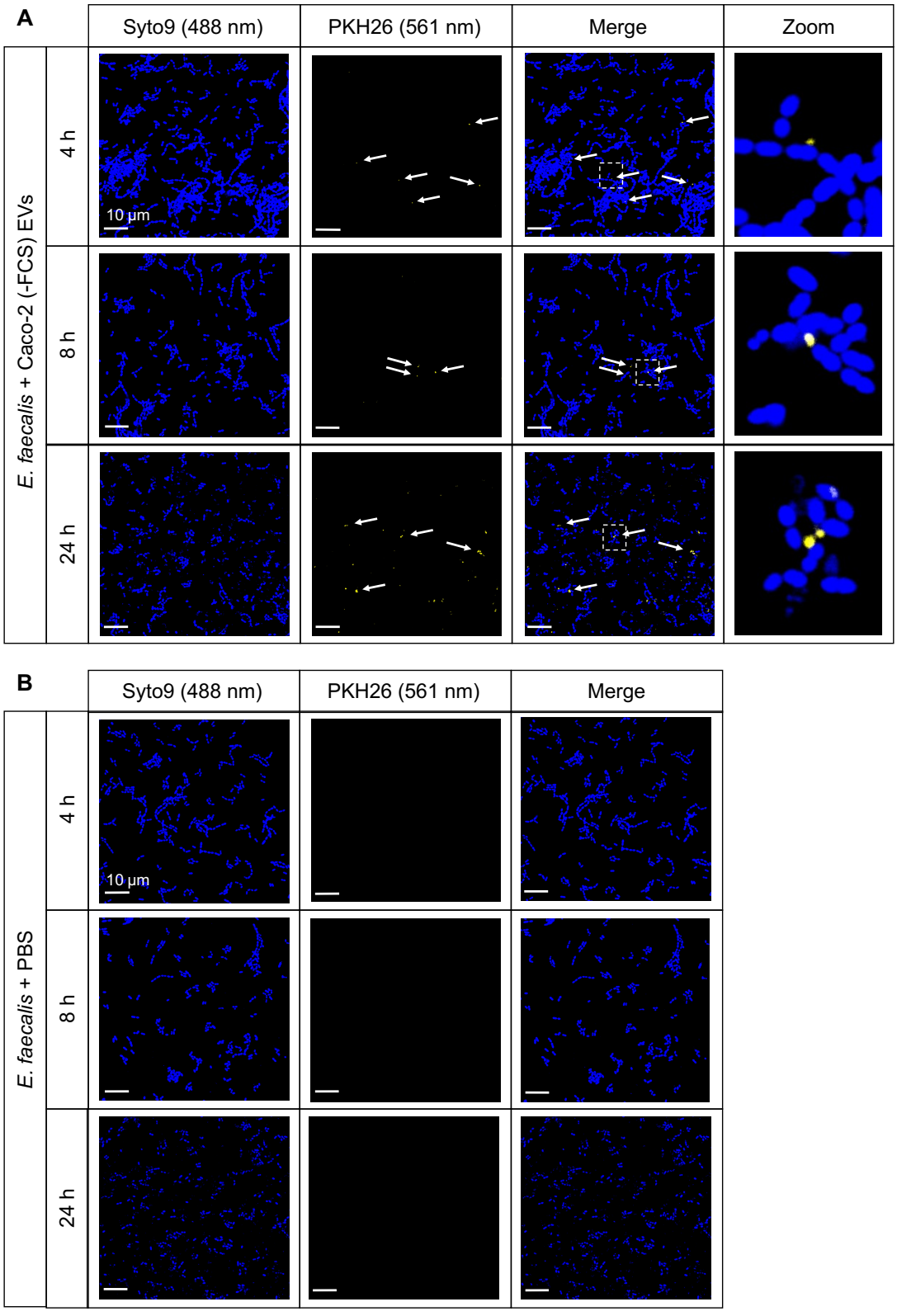

Abbildung 48: Visualisierung der Interaktion von *E. faecalis* mit Caco-2 (-FCS) EVs.
Die Bakterien wurden für 4 h, 8 h oder 24 h mit PKH26-gelabelten Caco-2 (-FCS) EVs (**A**) oder PBS als Kontrolle (**B**) inkubiert. Nach Ende der Inkubationszeit wurden die Bakterien mit SYTO™ 9 angefärbt und fixiert. SYTO™ 9 wurde mit einem Argonlaser bei 488 nm und PKH26 mit einem DPSS Laser bei 561 nm sichtbar gemacht. Zur besseren Veranschaulichung wurden die Bakterien in Blau und die gelabelten Caco-2 (-FCS) EVs in Gelb dargestellt. Die weißen Pfeile kennzeichnen Bereiche, in denen PKH26-gelabelte Caco-2 (-FCS) EVs detektiert werden konnten. Größenstandard: 10 µm

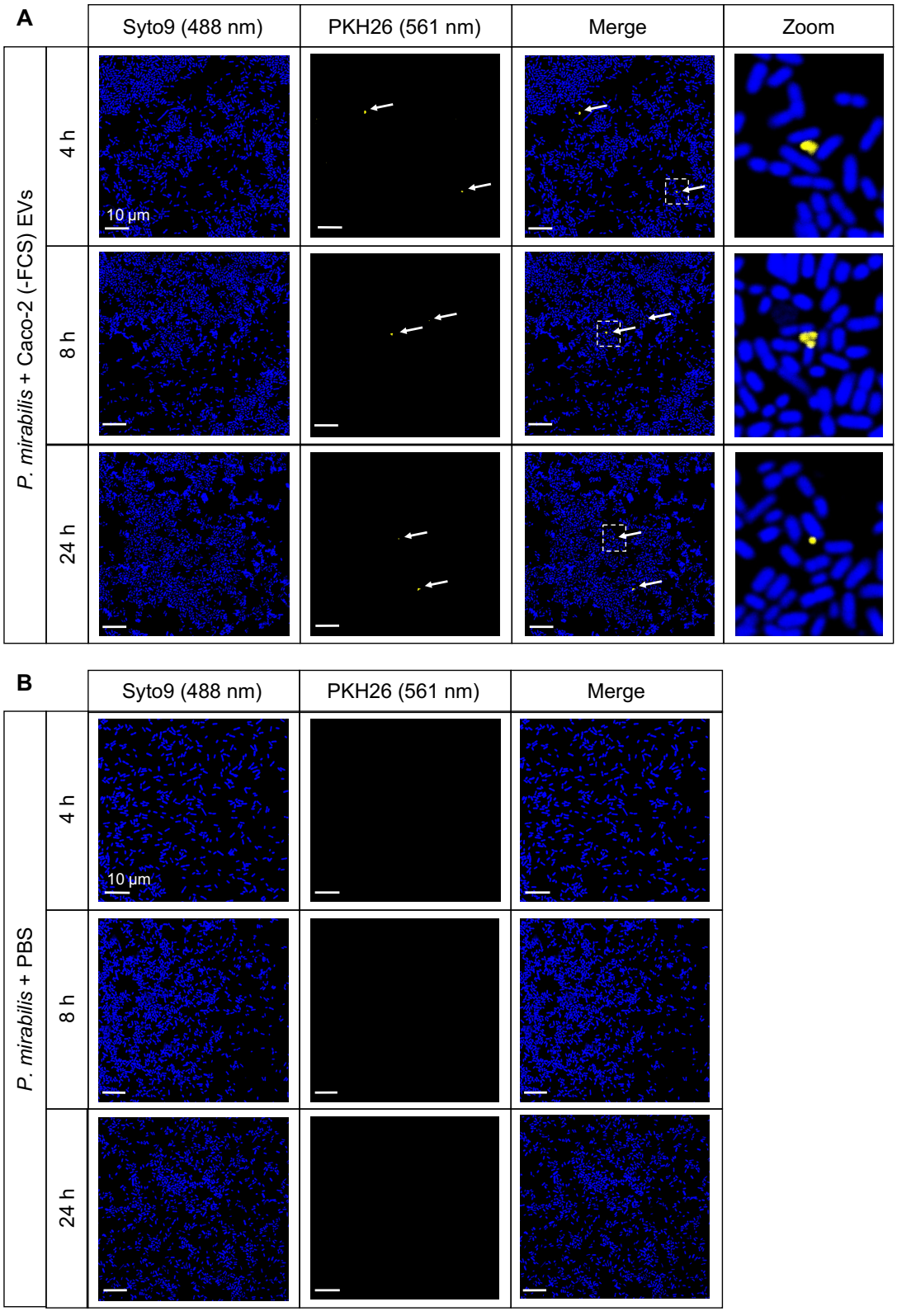

Abbildung 49: Visualisierung der Interaktion von *P. mirabilis* mit Caco-2 (-FCS) EVs.
Die Bakterien wurden für 4 h, 8 h oder 24 h mit PKH26-gelabelten Caco-2 (-FCS) EVs (**A**) oder PBS als Kontrolle (**B**) inkubiert. Nach Ende der Inkubationszeit wurden die Bakterien mit SYTO™ 9 angefärbt und fixiert. SYTO™ 9 wurde mit einem Argonlaser bei 488 nm und PKH26 mit einem DPSS Laser bei 561 nm sichtbar gemacht. Zur besseren Veranschaulichung wurden die Bakterien in Blau und die gelabelten Caco-2 (-FCS) EVs in Gelb dargestellt. Die weißen Pfeile kennzeichnen Bereiche, in denen PKH26-gelabelte Caco-2 (-FCS) EVs detektiert werden konnten. Größenstandard: 10 µm

Die Ergebnisse zur Visualisierung der Interaktion von Bakterien mit Caco-2 (-FCS) EVs lassen somit darauf schließen, dass alle untersuchten Bakterien potenziell dazu in der Lage sind, mit eukaryotischen EVs zu interagieren. *E. faecalis* zeigte dabei die stärkste Interaktion mit den Caco-2 (-FCS) EVs wohingegen bei *L. casei* und *P. mirabilis* eine deutlich schwächere Interaktion mit den Caco-2 (-FCS) EVs zu beobachten war.

4.13 Einfluss von Caco-2 EVs auf das Wachstum von unterschiedlichen Bakterien

Da sich gezeigt hat, dass die hier untersuchten Bakterien potenziell dazu in der Lage waren, mit den Caco-2 EVs zu interagieren bzw. diese aufzunehmen, sollte im Folgenden untersucht werden, ob die Inkubation von *L. casei*, *E. faecalis* oder *P. mirabilis* mit Caco-2 EVs einen Effekt auf das Wachstumsverhalten der Bakterien ausübt. Um dies zu untersuchen, wurden die Bakterien in Anwesenheit von unterschiedlichen Mengen Caco-2 (-FCS) EVs kultiviert und das Wachstum in regelmäßigen Abständen durch Messung der OD dokumentiert. Auch im Rahmen dieses Versuches wurden die Caco-2 (-FCS) EVs verwendet. Dies sollte sicherstellen, dass der beobachtete Effekt tatsächlich durch die EVs, welche von den Caco-2 Zellen sezerniert wurden, hervorgerufen wurde und nicht durch die EVs aus dem FCS. Die Wachstumskurven sind in **Abb. 50** dargestellt.

L. casei zeigte über den gesamten untersuchten Zeitraum von 48 h kein verändertes Wachstum nach Inkubation mit unterschiedlichen Mengen Caco-2 (-FCS) EVs (**Abb. 50 A**). Bei *E. faecalis* war bereits nach etwa 8 h zu erkennen, dass die OD der Bakterien, die mit 1 x 10^{10} Caco-2 (-FCS) EVs inkubiert wurden, signifikant höher war. Die OD blieb zwischen 8 h und 14 h mit leichten Schwankungen relativ konstant, bevor sie anfing langsam abzunehmen, wohingegen die OD der Bakterien, die mit PBS oder einer geringeren Menge Caco-2 (-FCS) EVs inkubiert wurden, bereits nach etwa 10 h abnahm. Der Unterschied hinsichtlich der OD blieb dann bis einschließlich 36 h messbar (**Abb. 50 B**). Die Inkubation von *E. faecalis* mit 1 x 10^{10} Caco-2 (-FCS) EVs schien somit eine Verlängerung der stationären Phase und einem späteren Eintritt in die Absterbephase hervorzurufen. *P. mirabilis* zeigte in den ersten 24 h kein verändertes Wachstum. Lediglich nach etwa 36 h war ein signifikanter Unterschied zwischen PBS-Kontrolle und Bakterien, die mit Caco-2 (-FCS) EVs inkubiert wurden, sichtbar. Das verminderte Wachstum war dabei unabhängig von der eingesetzten Menge Caco-2 (-FCS) EVs messbar (**Abb. 50 C**).

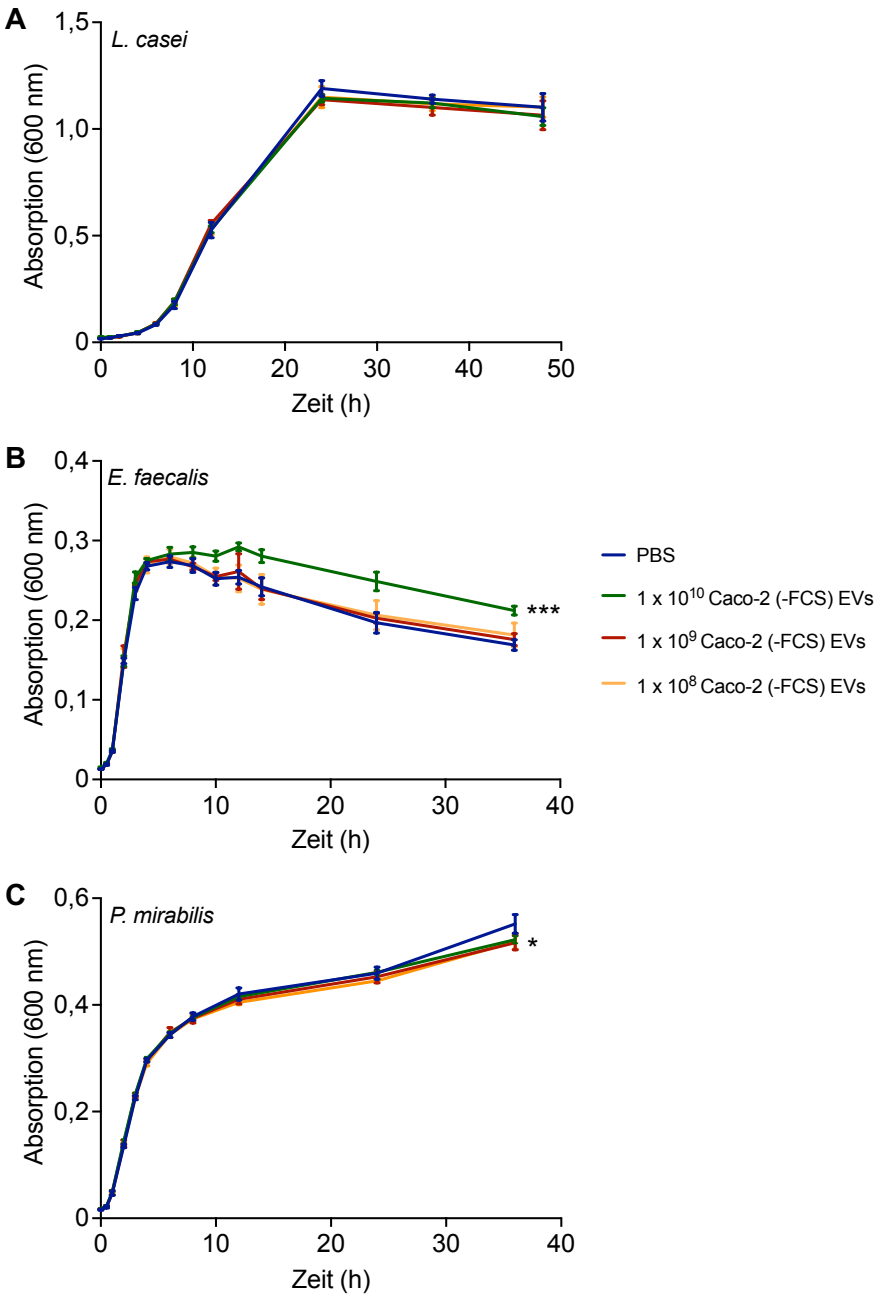

Abbildung 50: Wachstum von Bakterien in Anwesenheit von Caco-2 (-FCS) EVs.
Dargestellt ist das Wachstumsverhalten von *L. casei* (**A**), *E. faecalis* (**B**) und *P. mirabilis* (**C**) in Anwesenheit von unterschiedlichen Mengen Caco-2 (-FCS) EVs oder PBS als Kontrolle über einen Zeitraum von 48 h bzw. 36 h. Das Wachstum wurde durch die Messung der Absorption bei 600 nm (OD) ermittelt. Angegeben sind Mittelwerte sowie Standardabweichungen von 4 unabhängigen Experimenten. Zur Ermittlung von statistischen Signifikanzen wurden ein zweiseitiger ungepaarter t-Test durchgeführt ($p < 0,05$ *, $p < 0,001$ ***).

Grund für das veränderte Wachstumsverhalten von *E. faecalis* könnte die Interaktion der Bakterien mit den Caco-2 (-FCS) EVs sein, welche im CLSM deutlich sichtbar war. Für *L. casei* und *P. mirabilis* konnte hingegen nur eine schwache Interaktion mit den Caco-2 (-FCS) EVs beobachtet werden, weswegen wahrscheinlich kein oder nur ein geringer Effekt auf das Wachstum der Bakterien messbar war.

Um zusätzlich zu überprüfen, ob der für *E. faecalis* beobachtete Effekt auch durch EVs aus anderen Konditionen detektiert werden kann, wurden die Bakterien in Anwesenheit von unterschiedlichen Mengen Caco-2 (+FCS) und DMEM (+FCS) EVs kultiviert und das Wachstum in regelmäßigen Abständen durch Messung der OD dokumentiert (**Abb. 51**).

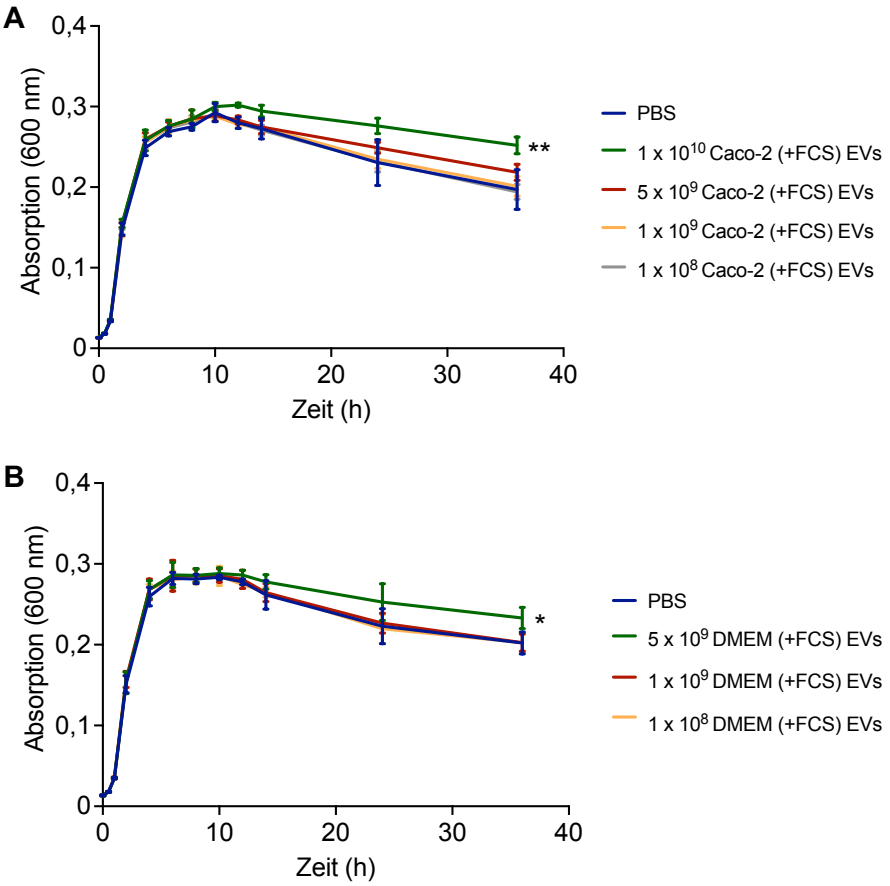

Abbildung 51: Wachstum von *E. faecalis* in Anwesenheit von EVs aus unterschiedlichen Konditionen.
Dargestellt ist das Wachstumsverhalten von *E. faecalis* in Anwesenheit von unterschiedlichen Mengen Caco-2 (+FCS) EVs (**A**) oder DMEM (+FCS) EVs (**B**) über einen Zeitraum von 36 h. Das Wachstum wurde durch die Messung der Absorption bei 600 nm (OD) ermittelt. Angegeben sind Mittelwerte sowie Standardabweichungen von 3-4 unabhängigen Experimenten. Zur Ermittlung von statistischen Signifikanzen wurden ein zweiseitiger ungepaarter t-Test durchgeführt ($p < 0,05$ *, $p < 0,01$ **).

Die Analyse des Wachstumsverhaltens hat gezeigt, dass die OD der Bakterien, die mit 1 x 10^{10} Caco-2 (+FCS) EVs (**Abb. 51 A**) oder 5 x 10^9 DMEM (+FCS) EVs (**Abb. 51 B**) inkubiert wurden, nach 36 h ebenfalls signifikant höher war. Bei den Bakterien, die mit 5 x 10^9 Caco-2 (+FCS) EVs inkubiert wurden war nach 36 h ebenfalls eine leichte Erhöhung der OD messbar, diese war jedoch nicht signifikant (**Abb. 51 A**). Die Ergebnisse zeigen somit, dass der Effekt auf das Wachstumsverhalten von *E. faecalis* sowohl nach Kultivierung der Bakterien mit bovinen als auch humanen EVs beobachtet werden kann.

4.14 Identifizierung von miRNAs in eukaryotischen EVs

EVs können verschiedene Nukleinsäuren wie z. B. miRNAs transportieren. In der Vergangenheit gezeigt werden, dass miRNAs in eukaryotischen EVs von anderen eukaryotischen Zellen aufgenommen werden und dort die Genexpression verändern können (Mittelbrunn et al., 2011; Y. Zhang et al., 2010). Darüber hinaus ist bekannt, dass auch die Genexpression und das Wachstum von Bakterien durch humane miRNAs reguliert werden kann (S. Liu et al., 2016). Im Folgenden sollte daher untersucht werden, welche miRNAs in den Caco-2 (+FCS) EVs transportiert werden und die somit z. B. das Wachstum der Bakterien beeinflussen könnten. Wie bereits zuvor erwähnt, bringt die Analyse von miRNAs in EVs aus Zellkulturüberständen die Herausforderung mit sich, dass nicht eindeutig zwischen EVs aus dem FCS und EVs, die von den Zellen sezerniert wurden, unterschieden werden kann (Lehrich et al., 2021). Hinzu kommt, dass die EVs aus dem FCS ebenfalls bovine miRNAs tragen, die aufgrund evolutionär konservierter Sequenzen fälschlicherweise als humane miRNAs annotiert werden könnten (Wei et al., 2016). Dadurch könnte es zu der Annahme kommen, dass bestimmte miRNAs aus den EVs der kultivierten Zellen stammen, während diese tatsächlich mit den im FCS enthaltenen EVs in die Zellkultur eingebracht werden. Aktuell gibt es verschiedene Lösungsansätze, um dieses Herausforderungen zu umgehen. In der vorliegenden Arbeit wurde parallel zu den Caco-2 (+FCS) EVs deswegen auch noch DMEM (+FCS) EVs analysiert. Diese stammen aus Zellkulturmedium, welches nicht mit den Caco-2 Zellen in Kontakt gekommen ist und daher nur EVs aus dem FCS und bovine miRNAs enthält. Im Rahmen dieser Arbeit sollte das miRNA-Expressionsprofil der DMEM (+FCS) EVs als eine Hintergrundkontrolle genutzt werden, um miRNAs zu identifizieren, die mit großer Wahrscheinlichkeit in EVs von den Caco-2 Zellen sezerniert wurden.

4.14.1 Qualitative Analyse von EV-RNAs

Für die Analyse der EV-miRNAs wurde zunächst die RNA aus den Caco-2 (+FCS) EVs und DMEM (+FCS) EVs isoliert und die Qualität der RNA untersucht. In der EV-RNA aus beiden Konditionen konnte ein großer Anteil von smallRNAs, zu denen auch die miRNAs gehören, mit einer Länge von unter 200 nt detektiert werden. In der Caco-2 (+FCS) EV-RNA waren zudem noch einige größere RNA-Fragmente bis etwa 500 nt Länge zu finden. Wiederum in beiden Konditionen hingegen waren zwei weitere Peaks bei etwa 2000 nt und 4000 nt sichtbar. Dabei handelte es sich mit großer Wahrscheinlichkeit um eukaryotische ribosomale RNAs (18S- und 28S-rRNAs) **(Abb. 52 A und B)**.

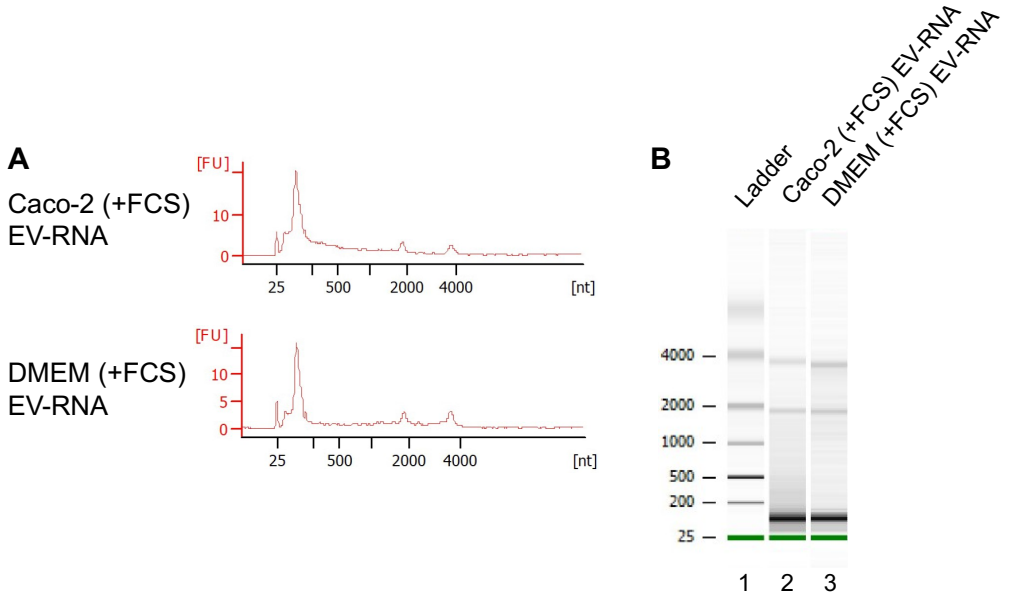

Abbildung 52: Auswertung eines Agilent RNA 6000 Pico Chips für EV-RNA.
(**A**) Dargestellt sind die Elektropherogramme einer exemplarischen Probe von RNA, die aus Caco-2 (+FCS) EVs und DMEM (+FCS) EVs isoliert wurde. (**B**) Im Gel-ähnlichen Bild ist die Auftrennung der RNA-Fragmente entsprechend ihrer Größe in den untersuchten Proben zu sehen. In Spur 1 ist der Größenstandard (Ladder) aufgetragen. Spur 2 und 3 zeigen die EV-RNA Proben. Der Marker ist in jeder Spur als eine grüne Bande gekennzeichnet.

Zur Identifizierung von miRNAs in Caco-2 (+FCS) und DMEM (+FCS) EVs wurde im Rahmen dieser Arbeit die smallRNA-Sequenzierung genutzt. Im Folgenden werden die Caco-2 (+FCS) EVs als EVs aus konditioniertem Medium und DMEM (+FCS) EVs als EVs aus unkonditioniertem Medium bezeichnet. Diese Bezeichnung bezieht sich auf den Ursprung der EVs. Als konditioniertes Medium wird Medium bezeichnet, welches mit den Zellen in Kontakt kam und unkonditioniertem Medium ist jenes, welches zuvor nicht mit den Zellen in Kontakt gekommen ist.
Insgesamt wurde das miRNA-Expressionsprofil von 17 Proben untersucht. Davon waren neun Proben EVs aus dem konditionierten und acht Proben EVs aus dem unkonditionierten Medium. Im Rahmen der Datenanalyse konnten 1067 unterschiedliche miRNAs identifiziert werden, die in mindestens einer Probe der beiden unterschiedlichen Konditionen detektiert wurde. Unter den identifizierten miRNAs wurden 473 miRNAs ausschließlich in EVs aus dem konditionierten und 45 miRNAs exklusiv in den EVs aus dem unkonditionierten Medium detektiert. Sowohl im konditionierten als auch unkonditionierten Medium konnten 549 miRNAs identifiziert werden. Die Auswahl wurde anschließend auf die miRNAs reduziert, die in mehr als 75 % der Proben detektiert werden konnten. Basierend darauf konnten 316 miRNAs identifiziert werden, die in beiden Konditionen detektiert wurden. Bei den miRNAs, die nur in den EVs aus dem konditionierten Medium gefunden werden konnten, war es nach dem Filtern noch 44 miRNAs und bei den miRNAs, die ausschließlich in den EVs aus dem unkonditionierten Medium detektiert werden konnten, blieben nach dem Filtern keine miRNAs mehr übrig.

4.14.2 Hierarchisches Clustering von EV-miRNAs

Im Anschluss wurde eine hierarchische Clusteranalyse durchgeführt. Es handelt sich dabei um eine Methode zur Gruppierung von Objekten, basierend auf ihrer Distanz zueinander. Damit diente sie im Rahmen dieser Arbeit dem Einteilen von Gruppen anhand ähnlicher miRNA-Expressionsmustern. Die Ergebnisse der Analyse zeigten eine deutliche Bildung von Clustern entweder mit den EVs aus dem konditionierten Medium oder den EVs aus dem unkonditionierten Medium (**Abb. 53**). Dies deutet darauf hin, dass die miRNA-Expressionsprofile deutliche Unterschiede zwischen den hier untersuchten Gruppen aufwiesen.

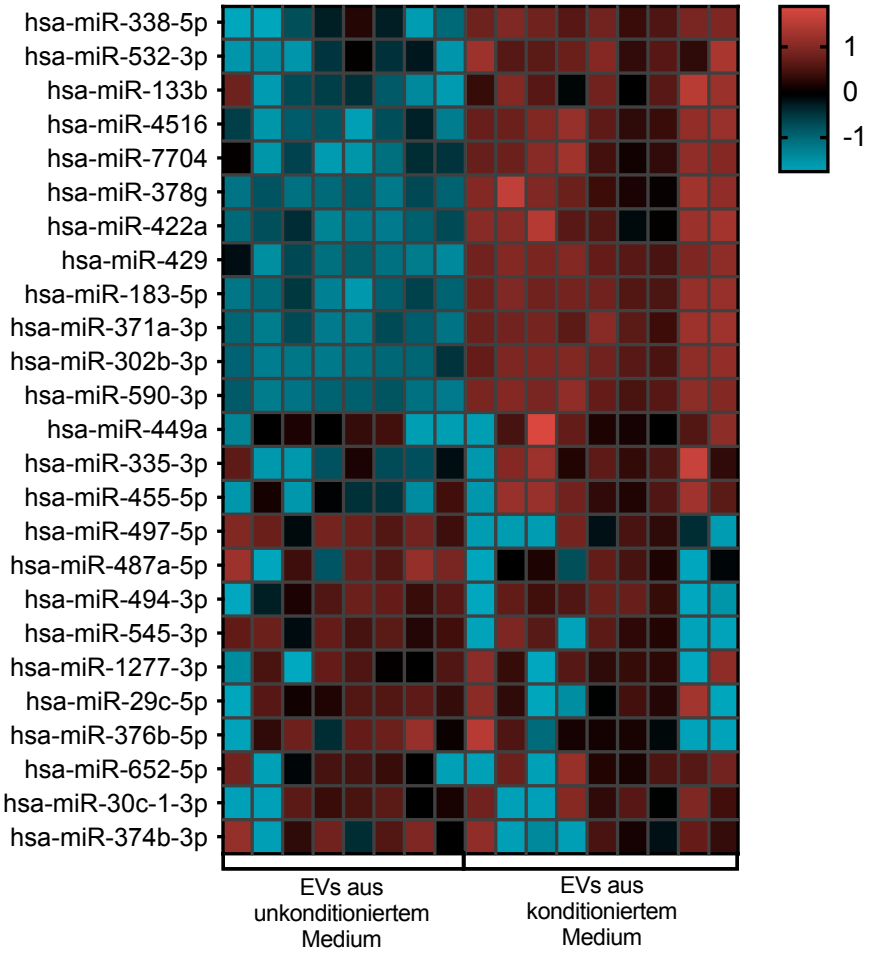

Abbildung 53: Hierarchisches Clustering von miRNAs.
Dargestellt ist das Clustering von 25 miRNAs, die in mindestens 75 % der Proben detektiert wurden. Die Zugehörigkeit der jeweiligen Proben zu den entsprechenden Gruppen wurde gekennzeichnet. Eine stärkere Expression der miRNA in den EVs aus der jeweiligen Kondition ist durch eine rote und eine schwächere Expression durch eine blaue Färbung gekennzeichnet.

4.14.3 Detektion von differentiell exprimierten und abundanten EV-miRNAs

Durch die differentielle Expressionsanalyse ließen sich im Folgenden miRNAs identifizieren, deren Expression in den EVs aus dem konditionierten Medium verglichen zu der im unkonditionierten Medium signifikant verändert war. **Abb. 54** stellt in einem Volcano Plot die Expressionsunterschiede von miRNAs in EVs aus konditioniertem und unkonditionierten Medium in Abhängigkeit von der statistischen Signifikanz dar.

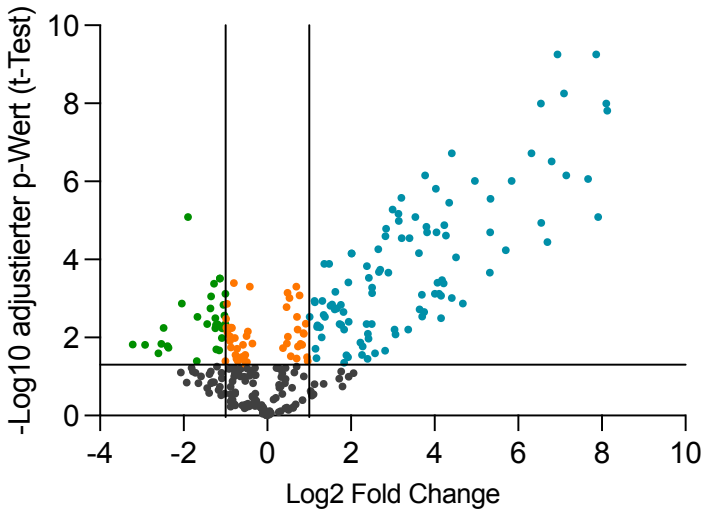

Abbildung 54: Differentielle Expression von miRNAs in EVs aus konditioniertem und unkonditioniertem Medium.
Dargestellt ist der logarithmische Expressionsunterschied (Log2 Fold Change) aller 316 in mindestens 75 % der Proben detektierten miRNAs in Abhängigkeit vom negativen dekadischen Logarithmus des Benjamini-Hochberg-adjustierten p-Wertes. Der p-Wert wurde mit Hilfe eines ungepaarten t-Tests ermittelt. Jeder Punkt stellt eine einzelne miRNA dar. In Grau sind miRNAs dargestellt, die nicht signifikant differentiell exprimiert sind. MiRNAs, deren Expression zwar signifikant ($p < 0,05$) jedoch nicht mindestens um mindestens das zwei-fache verändert war, sind in Orange gekennzeichnet. In Grün sind miRNAs, die signifikant und mindestens um das zwei-fache verringert (Log2 Fold Change < -1) in den EVs aus dem konditionierten Medium exprimiert sind, gekennzeichnet. In Blau sind miRNAs, die signifikant und mindestens um das zwei-fache erhöht (Log2 Fold Change > 1) in den EVs aus dem konditionierten Medium exprimiert sind, gekennzeichnet.

Die Ergebnisse der differentiellen Expressionsanalyse zeigten im Detail die unterschiedliche Expression der miRNAs in den untersuchten Gruppen. Von den 316 miRNA, die in mehr als 75 % der Proben detektiert wurden, zeigten 170 miRNAs eine erhöhte Expression in den EVs aus dem konditionierten Medium verglichen mit den EVs aus dem unkonditionierten Medium. Von diesen hatten wiederum 104 miRNAs eine Expression, die signifikant und mindestens um das zwei-fache (Log2 Fold Change > 1) verändert war (**Anhang Tabelle 31**). Aufgrund dieser Expressionsunterschiede ist die Wahrscheinlichkeit erhöht, dass diese miRNAs tatsächlich von den Caco-2 Zellen in EVs in das Medium sezerniert wurden. Auf der anderen Seite zeigten 146 miRNAs eine verringerte Expression in den EVs aus dem konditionierten Medium. Von diesen waren wiederum 32 miRNAs signifikant und mindestens um das zwei-fache (Log2 Fold Change < -1) verändert (**Anhang Tabelle 32**). Diese miRNAs wurde demzufolge vermehrt in den EVs aus dem unkonditionierten Medium identifiziert und könnten potenziell aus dem EVs im FCS stammen.

Für die weiteren Analysen waren vor allem diejenigen miRNAs von Interesse, deren Expression in den EVs aus dem konditionierten Medium verglichen mit den aus dem unkonditionierten Medium signifikant erhöht war. Zum anderen wurden auch die miRNAs betrachtet, die ausschließlich in den EVs aus dem konditionierten Medium detektiert wurde, da bei diesen ebenfalls eine Herkunft aus dem FCS im Zellkulturmedium ausgeschlossen werden kann. Da diese miRNAs nur in einer der hier untersuchten Gruppen gefunden werden konnten, ließ sich keine differentielle Expressionsanalyse durchführen. Um trotzdem eine Aussage über die Expression der jeweiligen miRNAs treffen und so entscheiden zu können, ob sich eine dieser miRNAs als potenzieller Kandidat für weitere Analysen eignet, wurden die rpmmm (*reads per mapped million miRNAs*) betrachtet. Dabei handelt es sich um eine Normalisierungsmethode, mit Hilfe derer ausgesagt werden kann, wie häufig eine miRNA bezogen auf 10^6 Reads gelesen wurde. Je höher der Wert dabei war, desto stärker war die Expression der entsprechender miRNA in der untersuchten Probe. In **Tabelle 11** sind die rpmmm der 10 am höchsten exprimierten miRNAs angegeben, die ausschließlich in den EVs aus dem konditionierten Medium detektiert werden konnten.

Tabelle 11: Expression (rpmmm) ausgewählter miRNAs in EVs aus konditioniertem Medium.
Angegeben sind die 10 miRNAs mit den höchsten rpmmm, die ausschließlich in den EVs aus dem konditionierten Medium detektiert wurden.

miRNA	rpmmm
miR-371a-5p	659,62
miR-501-3p	285,17
miR-548k	185,04
miR-302a-3p	156,29
miR-1303	98,19
miR-641	96,52
miR-625-3p	88,46
miR-373-5p	82,04
miR-1304-3p	77,98
miR-1226-3p	75,79

Wie in **Tabelle 11** zu erkennen ist, ist miR-371a-5p mit ca. 660 rpmmm die miRNA mit der deutlich höchsten Expression, die ausschließlich in EVs aus dem konditionierten Medium detektiert wurde. Um zu überprüfen, ob noch weitere miRNAs mit hoher Expression entsprechend der rpmmm identifiziert werden können, wurden auch die miRNAs, welche sowohl in EVs aus dem konditionierten als auch dem unkonditionierten Medium detektiert wurden, analysiert. Da die miRNAs in beiden Konditionen detektiert wurden, wurde nicht nur die Expression anhand der rpmmm alleine, sondern auch Expressionsunterschied angegeben als die rpmmm-Differenz, von der jeweiligen miRNA in den EVs aus dem konditionierten Medium verglichen mit EVs aus dem unkonditionierten Medium, näher betrachtet (**Abb. 55**).

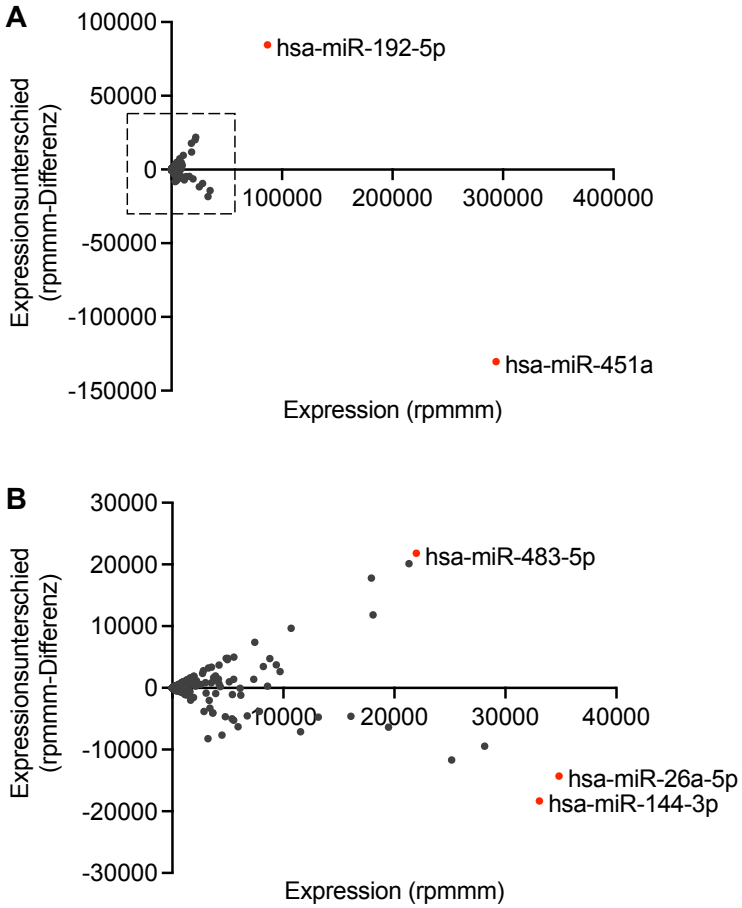

Abbildung 55: Expressionsunterschied (rpmmm-Differenz) von miRNAs in EVs aus konditioniertem und unkonditioniertem Medium.
(**A**) Dargestellt ist die Expression (rpmmm) alle 549 der in mindestens einer Probe detektierten miRNAs in EVs aus dem konditionierten verglichen mit EVs aus unkonditionierten Medium in Abhängigkeit vom Expressionsunterschied (rpmmm-Differenz). (**B**) Zur besseren Sichtbarkeit wurde ebenfalls die Expression (rpmmm) weiterer miRNAs ohne die Expressionswerte von hsa-miR-451a und hsa-miR-192-5p dargestellt. Jeder Punkt repräsentiert eine einzelne miRNA. MiRNAs, die von besonderem Interesse sind, wurden in Rot markiert. Ein Expressionsunterschied < 0 deutet auf eine verringerte Expression (rpmmm), ein Expressionsunterschied > 0 auf einer erhöhten Expression (rpmmm) der entsprechenden miRNA in EVs aus dem konditionierten Medium hin.

Beim Vergleich der Expression (rpmmm) der miRNAs in Abhängigkeit vom Expressionsunterschied (rpmmm-Differenz) in EVs aus konditioniertem verglichen mit EVs aus unkonditioniertem Medium stachen zwei miRNAs deutlich hervor. Sowohl miR-192-5p als auch miR-451a zeigten beide eine besonders hohe Expression (**Abb. 55 A**). Neben der miR-192-5p ließen sich auch noch weitere miRNAs identifizieren, die neben einer hohen Expression auch einen großen Expressionsunterschied zwischen EVs aus dem konditionierten und EVs aus dem unkonditionierten Medium zeigten. Dazu gehörte zum Beispiel miR-483-5p. Zudem zeigten auch neben miR-451a weitere miRNAs wie miR-144-3p oder miR-26b-5p eine erhöhte Expression in den EVs aus dem unkonditionierten Medium (**Abb. 55 B**).

In **Tabelle 12** sind die zehn miRNAs mit dem größten Expressionsunterschied zwischen EVs aus dem konditionierten im Vergleich zu EVs aus dem unkonditionierten Medium aufgelistet. Die Expression von miR-192-5p in EVs aus konditioniertem Medium war mit 86919 rpmmm verglichen mit EVs aus unkonditioniertem Medium mit 2385 rpmmm besonders stark erhöht. Die hohe Differenz von 84534 rpmmm deutete darauf hin, dass diese miRNA wahrscheinlich verstärkt in EVs der Caco-2 Zellen sezerniert wurde. Neben den hohen Expressionsunterschieden war zudem auffällig, dass die Expression der aufgelisteten miRNAs in den EVs aus dem unkonditionierten Medium sehr niedrig war. Dies bestärkt ebenfalls die Annahme, dass diese miRNAs wahrscheinlich von den Caco-2 Zellen in EVs in das Zellkulturmedium sezerniert wurden.

Tabelle 12: Expression (rpmmm) und Expressionsunterschied (rpmmm-Differenz) ausgewählter, in EVs aus konditioniertem Medium hoch exprimierter miRNAs.
Angegeben sind die 10 miRNAs mit dem höchsten Expressionsunterschied in EVs aus dem konditionierten verglichen mit dem EVs aus unkonditioniertem Medium.

miRNA	Expression in EVs aus konditioniertem Medium (rpmmm)	Expression in EVs aus unkonditioniertem Medium (rpmmm)	Expressions-unterschied (rpmmm-Differenz)
miR-192-5p	86919	2385	84534
miR-483-5p	21976	159	21816
miR-378a-3p	21309	1192	20117
miR-200c-3p	17937	141	17796
miR-21-5p	18086	6251	11835
miR-320a-3p	10708	1067	9640
miR-373-3p	7420	43	7377
miR-193a-3p	5538	568	4970
miR-372-3p	4843	49	4794
miR-194-5p	4993	215	4778

Tabelle 13 zeigt die zehn miRNAs, mit dem höchsten Expressionsunterschied in den EVs aus dem unkonditionierten Medium. Auffällig war dabei die besonders hohe Expression von miR-451a mit 423925 rpmmm in den EVs aus dem unkonditionierten Medium. Trotz der Tatsache, dass die Expression dieser miRNA in den EVs aus dem konditionierten Medium mit 293674 rpmmm immer noch vergleichsweise sehr hoch war, ließ sich ein Expressionsunterschied von 130251 rpmmm ermitteln. Es ist also wahrscheinlich, dass miR-451a durch die EVs aus dem FCS in das Zellkultursystem eingebracht wurde. Dieser Unterschied könnte zudem darauf schließen lassen, dass FCS-EVs sowie die darin enthaltenen miRNAs von den Caco-2 Zellen aufgenommen, aber nicht im gleichen Maße wieder von den Zellen in EVs sezerniert werden.

Tabelle 13: Expression (rpmmm) und Expressionsunterschied (rpmmm-Differenz) ausgewählter, in EVs aus unkonditioniertem Medium hoch exprimierter miRNAs.
Angegeben sind die 10 miRNAs mit dem höchsten Expressionsunterschied in EVs aus dem konditionierten verglichen mit dem EVs aus unkonditioniertem Medium.

miRNA	Expression in EVs aus konditioniertem Medium (rpmmm)	Expression in EVs aus unkonditioniertem Medium (rpmmm)	Expressions-unterschied (rpmmm-Differenz)
miR-451a	293674	423925	-130251
miR-144-3p	33068	51398	-18330
miR-26a-5p	34838	49119	-14281
let-7a-5p	25156	36847	-11690
miR-191-5p	28135	37591	-9455
miR-143-3p	3210	11456	-8246
miR-150-5p	4473	12120	-7646
let-7f-5p	11543	18642	-7099
miR-16-5p	19481	25842	-6361
miR-142-3p	5920	12229	-6309

Auch bei den anderen miRNAs war trotz des hohen Expressionsunterschiedes auffällig, dass die Expression der miRNAs sowohl in den EVs aus dem konditionierten als auch den EVs aus dem unkonditionierten Medium insgesamt relativ hoch war. Diese Ergebnisse zeigen, dass bei alleiniger Analyse des miRNA-Expressionsprofils der EVs aus dem konditionierten Medium möglicherweise übersehen worden wäre, dass diese miRNAs auch von den FCS-EVs stammen könnten.

Auf Basis der Ergebnisse der smallRNA-Sequenzierung wurde im Folgenden die miR-192-5p als Kandidat für die weiteren Untersuchungen ausgewählt. Aufgrund ihrer besonders hohen Expression in den EVs aus dem konditionierten Medium wurde sie mit großer Wahrscheinlichkeit von den Caco-2 Zellen verpackt in EVs in das Zellkulturmedium sezerniert. Zudem besitzt miR-192-5p wegen ihrer hohen Expression ein besonders großes Potenzial, um nach Aufnahme der EVs durch verschiedene Bakterien einen Effekt, wie z. B. ein verändertes Wachstumsverhalten auszuüben.

4.15 Internalisierung von miR-192-5p in Bakterien

Damit eine humane miRNA einen Effekt auf Bakterien ausüben kann, muss sie zunächst von diesen aufgenommen werden. Im Folgenden wurde daher die Internalisierung von miR-192-5p in die verschiedenen Bakterien näher untersucht. Dafür wurden die Bakterien über einen Zeitraum von 48 h (*L. casei*) oder 24 h (*E. faecalis* und *P. mirabilis*) in Anwesenheit von 4 µM Cy3-gelabelter synthetischer miR-192-5p inkubiert und an verschiedenen Zeitpunkten die Internalisierung sowohl quantitativ mit Hilfe der Durchflusszytometrie als auch qualitativ mittels CLSM untersucht.

Die Ergebnisse der Durchflusszytometrie haben dabei gezeigt, dass es deutliche Unterschiede hinsichtlich der Aufnahme von miR-192-5p durch die hier untersuchten Bakterien gab (**Abb. 56**). Bei *L. casei* zeigten nach 48 h Inkubation nur 1,37 % der Bakterien ein positives Signal für die Cy3-gelabelte miR-192-5p (**Abb. 56 A, B und C**). Eine noch geringere Aufnahme der gelabelten miRNA konnte bei *E. faecalis* gemessen werden. Hier zeigten nach 24 h Inkubation durchschnittlich 0,17 % der Bakterien ein positives Signal für die gelabelte miRNA (**Abb. 56 D, E und F**). Bei *P. mirabilis* hingegen konnten bereits nach 4 h bei etwa 3,2 % der Bakterien eine Aufnahme der gelabelten miRNA detektiert werden. Nach 24 h Inkubation von *P. mirabilis* mit der Cy3-gelabelten miRNA war dann in 53,1 % der Bakterien ein positives Signal für miR-192-5p detektierbar (**Abb. 56 G, H und I**). Die Interaktion der Bakterien mit der Cy3-gelabelten miR-192-5p konnte zudem auch mittels CLSM bestätigt werden. Wie deutlich zu erkennen ist, waren bei *L. casei* lediglich nach 48 h Inkubation deutliche Signale für die mit Cy3-gelabelter miR-192-5p, die sich mit den Signalen der SYTO™ 9-gelabelten Bakterien überlagerten, sichtbar (**Abb. 57 A, weiße Pfeile**). Bei *E. faecalis* konnten hingegen zu keinem der untersuchten Zeitpunkte ein Signal für die Cy3-gelabelte miRNA detektiert werden (**Abb. 58 A**).

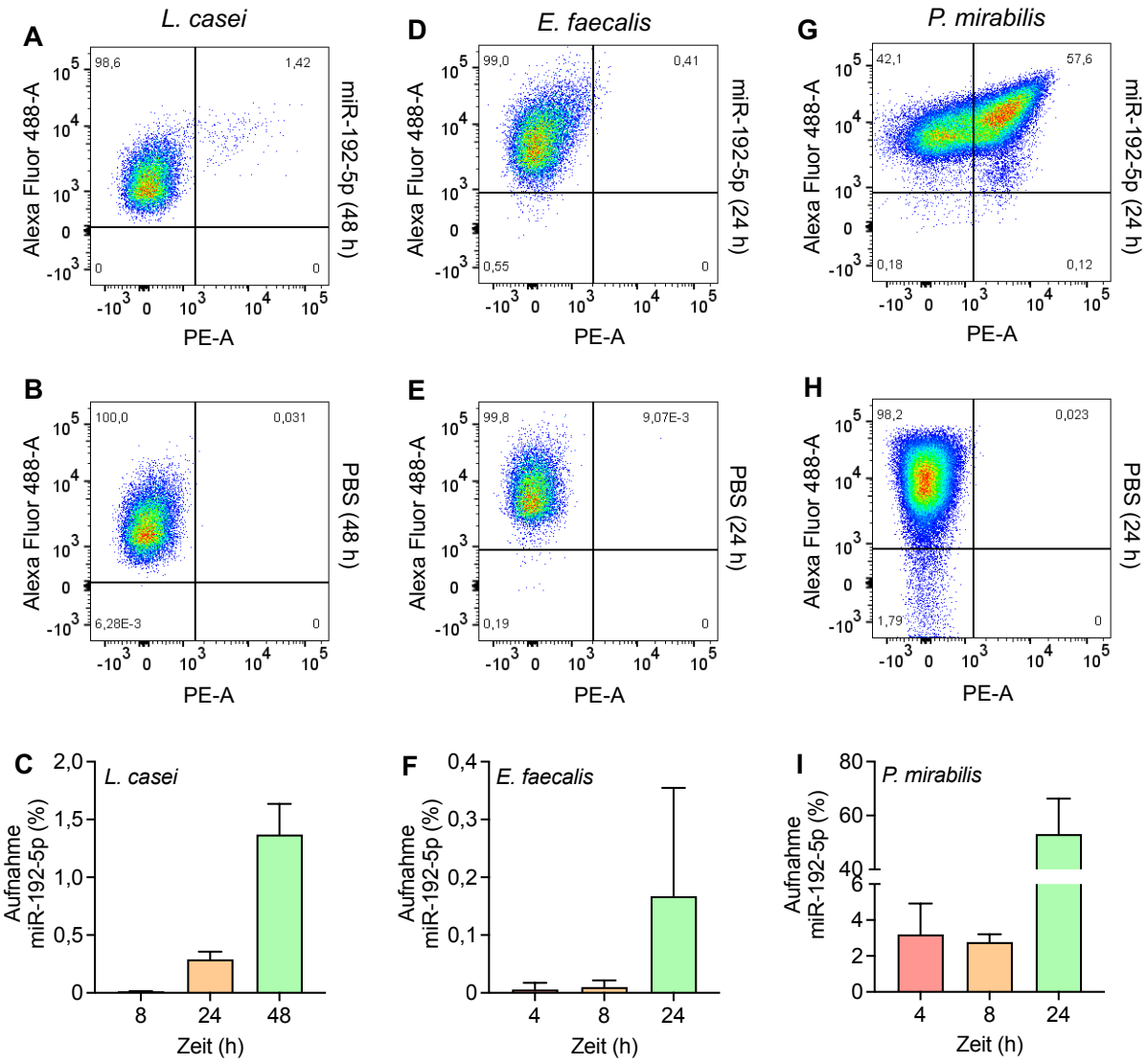

Abbildung 56: Durchflusszytometrische Analyse der Aufnahme von Fluoreszenz-gelabelter synthetischer miRNA durch verschiedene Bakterien.
Alle untersuchten Bakterien wurden zwischen 4 h und 48 h mit 4 µM Cy3-gelabelte synthetischen miR-192-5p inkubiert. Nach Ende der Inkubationszeit wurden die Bakterien mit SYTO™ 9 angefärbt und fixiert. Zur Detektion der angefärbten Bakterien wurde ein Laser bei 488 nm (Alexa Fluor 488) und zur Detektion der Cy3-gelabelten miRNA ein Laser bei 561 nm (Phycoerythrin, PE) verwendet. Dargestellt sind repräsentative Punktdiagramm, welche die Populationen der verschiedenen Bakterien nach 48 h oder 24 h Inkubation mit der gelabelten miRNA (**A**, **D** und **G**) oder PBS als Kontrolle (**B**, **E** und **H**) in Abhängigkeit von der Fluoreszenz zeigen. (**C**, **F** und **I**) Weiterhin ist ebenfalls der Anteil SYTO™ 9/Cy3-positiver Bakterien an den jeweiligen Zeitpunkten für alle untersuchten Bakterien dargestellt. Angegeben sind die Mittelwerte sowie Standardabweichung von 4 unabhängigen Experimenten.

Im Gegensatz dazu konnten bei *P. mirabilis* nach 24 h Inkubation starke Signale für die Cy3-gelabelte miRNA detektiert werden, die eine eindeutige Co-Lokalisation mit denen der gelabelten Bakterien zeigten (**Abb. 59 A**). In den Bakterien, die als Kontrolle mit PBS inkubiert wurden, konnten hingegen keine Signale detektiert werden (**Abb. 57 B, 58 B und 59 B**).

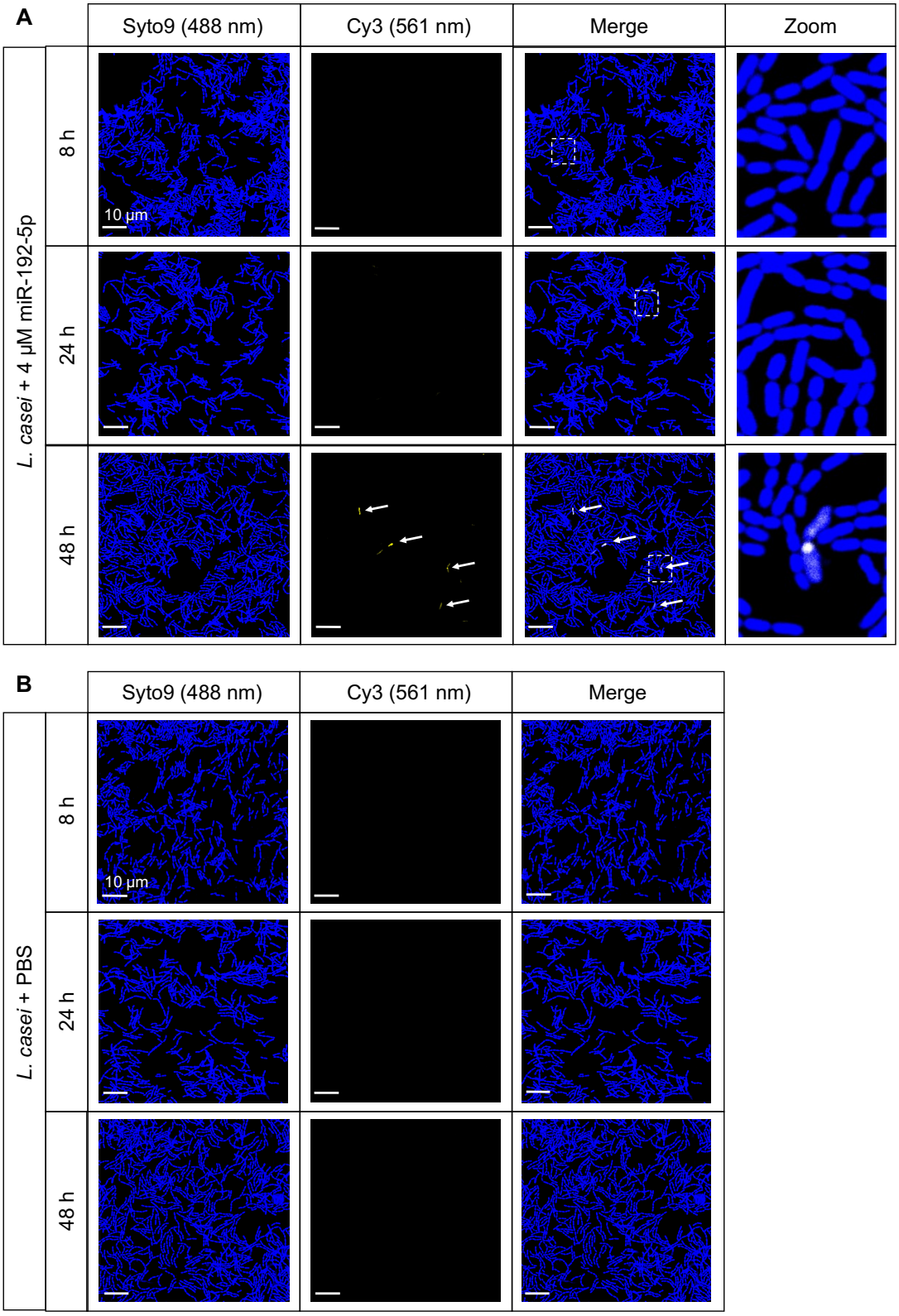

Abbildung 57: Visualisierung der Interaktion von *L. casei* mit miR-192-5p.
Die Bakterien wurden für 8 h, 24 h oder 48 h mit 4 µM Cy3-gelabelter synthetischer miR-192-5p (**A**) oder PBS als Kontrolle (**B**) inkubiert. Nach Ende der Inkubationszeit wurden die Bakterien mit SYTO™ 9 angefärbt und fixiert. SYTO™ 9 wurde mit einem Argonlaser bei 488 nm und Cy3 mit einem DPSS Laser bei 561 nm sichtbar gemacht. Zur besseren Veranschaulichung wurden die Bakterien in Blau und die gelabelte miRNA in Gelb dargestellt. Die weißen Pfeile kennzeichnen Bereiche, in denen eine schwache Interaktion der Bakterien mit Cy3-gelabelter miR-192-5p detektiert werden konnten. Größenstandard: 10 µm

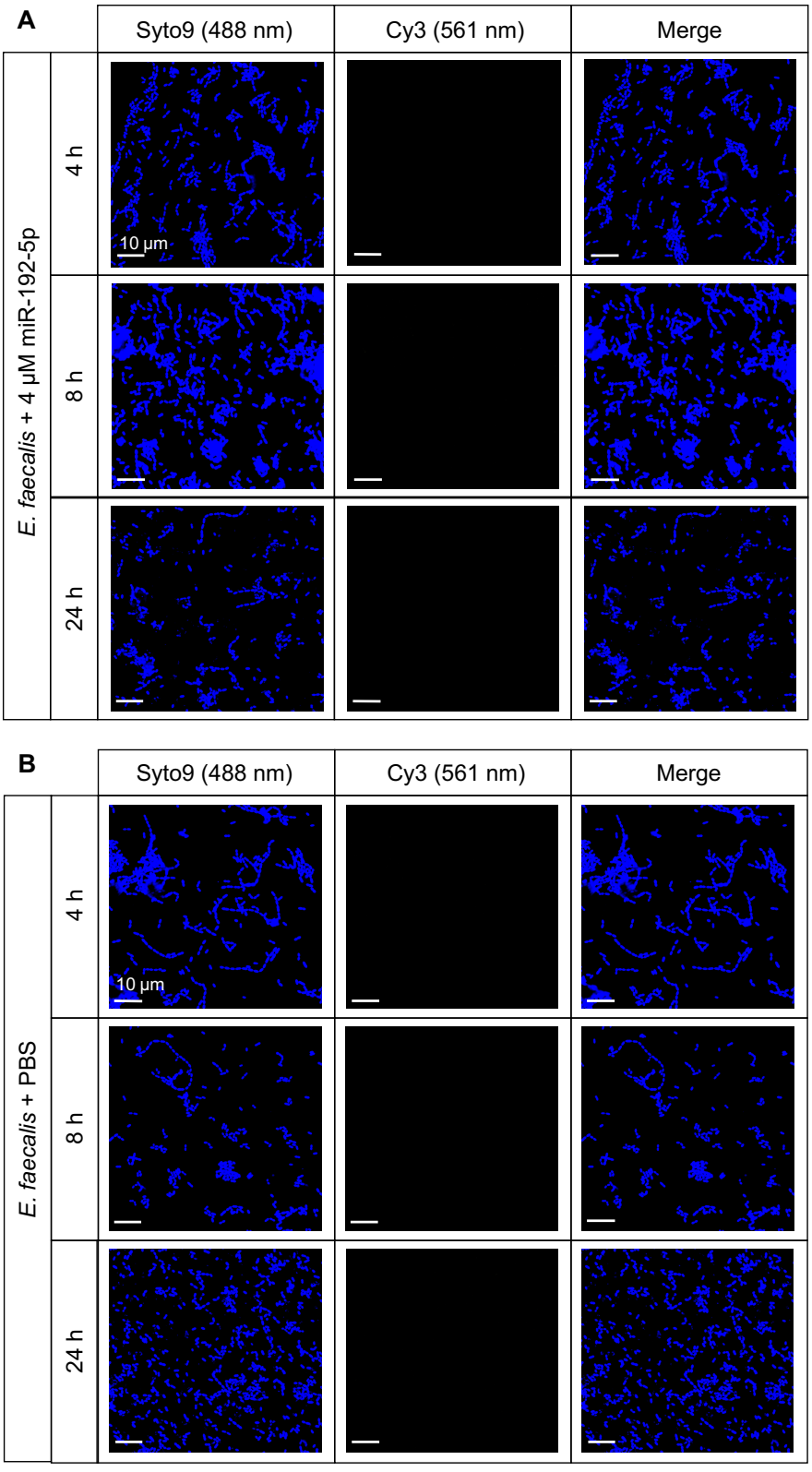

Abbildung 58: Visualisierung der Interaktion von E. faecalis mit miR-192-5p.
Die Bakterien wurden für 4 h, 8 h oder 24 h mit 4 µM Cy3-gelabelter synthetischer miR-192-5p (**A**) oder PBS als Kontrolle (**B**) inkubiert. Nach Ende der Inkubationszeit wurden die Bakterien mit SYTO™ 9 angefärbt und fixiert. SYTO™ 9 wurde mit einem Argonlaser bei 488 nm und Cy3 mit einem DPSS Laser bei 561 nm sichtbar gemacht. Zur besseren Veranschaulichung wurden die Bakterien in Blau und die gelabelte miRNA in Gelb dargestellt. Größenstandard: 10 µm

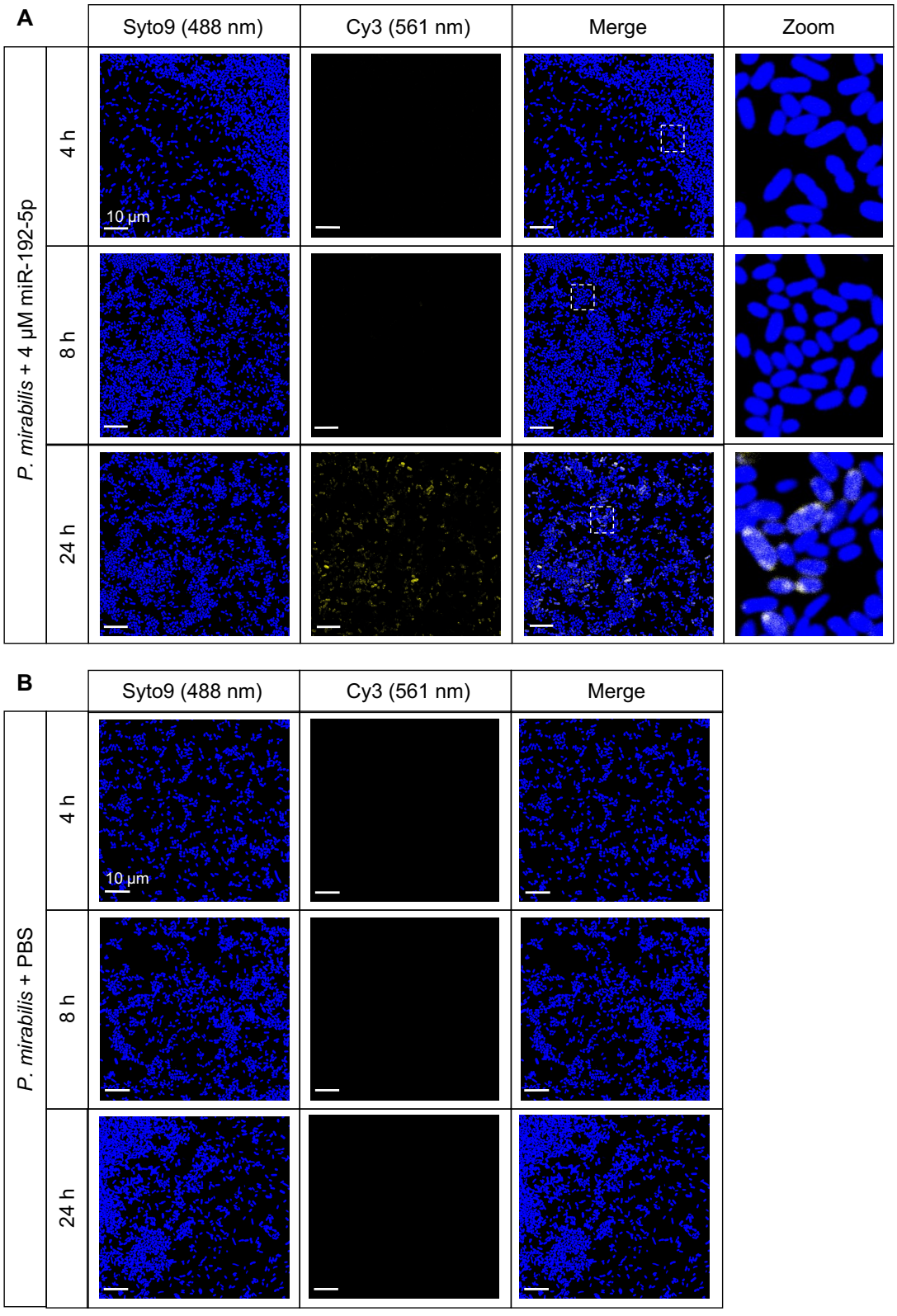

Abbildung 59:Visualisierung der Interaktion von *P. mirabilis* mit miR-192-5p.
Die Bakterien wurden für 4 h, 8 h oder 24 h mit 4 µM Cy3-gelabelter synthetischer miR-192-5p (**A**) oder PBS als Kontrolle (**B**) inkubiert. Nach Ende der Inkubationszeit wurden die Bakterien mit SYTO™ 9 angefärbt und fixiert. SYTO™ 9 wurde mit einem Argonlaser bei 488 nm und Cy3 mit einem DPSS Laser bei 561 nm sichtbar gemacht. Zur besseren Veranschaulichung wurden die Bakterien in Blau und die gelabelte miRNA in Gelb dargestellt. Der weiße Pfeil kennzeichnet einen Bereich, in dem eine schwache Interaktion der Bakterien mit Cy3-gelabelter miR-192-5p detektiert werden konnten. Größenstandard: 10 µm

Im Rahmen dieses Versuches konnte somit gezeigt werden, dass miR-192-5p am stärksten von *P. mirabilis* aufgenommen wurde. Bei *L. casei* und *E. faecalis* konnte hingegen kaum eine Interaktion mit der miR-192-5p detektiert werden. Die Ergebnisse der Durchflusszytometrie und CLSM lassen somit darauf schließen, dass verschiedene Bakterien ein unterschiedliches Potenzial besitzen, humane miRNAs aufzunehmen.

4.16 Einfluss von miR-192-5p auf das Wachstum und die Viabilität von Bakterien

Weiterhin sollte untersucht werden, ob die Inkubation von *L. casei*, *E. faecalis* oder *P. mirabilis* mit miR-192-5p eine Veränderung des Wachstumsverhaltens der Bakterien zur Folge hat. Dafür wurden die Bakterien in Anwesenheit von unterschiedlichen Konzentrationen synthetischer miR-192-5p kultiviert und das Wachstum in regelmäßigen Abständen durch Messung der OD dokumentiert. Dabei konnte beobachtet werden, dass das Wachstum von *L. casei* über den gesamten Zeitraum von 48 h Inkubation mit unterschiedlichen Konzentrationen miR-192-5p nicht signifikant beeinflusst wurde (**Abb. 60 A**). Ebenso wenig konnte bei der Inkubation von *E. faecalis* mit miR-192-5p ein verändertes Wachstum beobachtet werden (**Abb. 60 B**). Bei *P. mirabilis* hingegen konnte bereits nach 8 h bis einschließlich 36 h ein signifikanter Anstieg der OD nach Inkubation der Bakterien mit 4 µM miR-192-5p gemessen werden. Wenn die Bakterien mit 2 µM miR-192-5p inkubiert wurden, kam es ebenfalls zu einem leichten, nach 12 h und 24 h ebenfalls signifikanten Anstieg der OD. Nach 36 h konnte jedoch kein signifikanter Unterschied zur OD der PBS-Kontrolle mehr gemessen werden (**Abb. 60 C**). Ein Grund für das veränderte Wachstumsverhalten von *P. mirabilis* könnte die Internalisierung der miR-192-5p sein, welche zuvor mittels CLSM deutlich detektiert werden konnte.

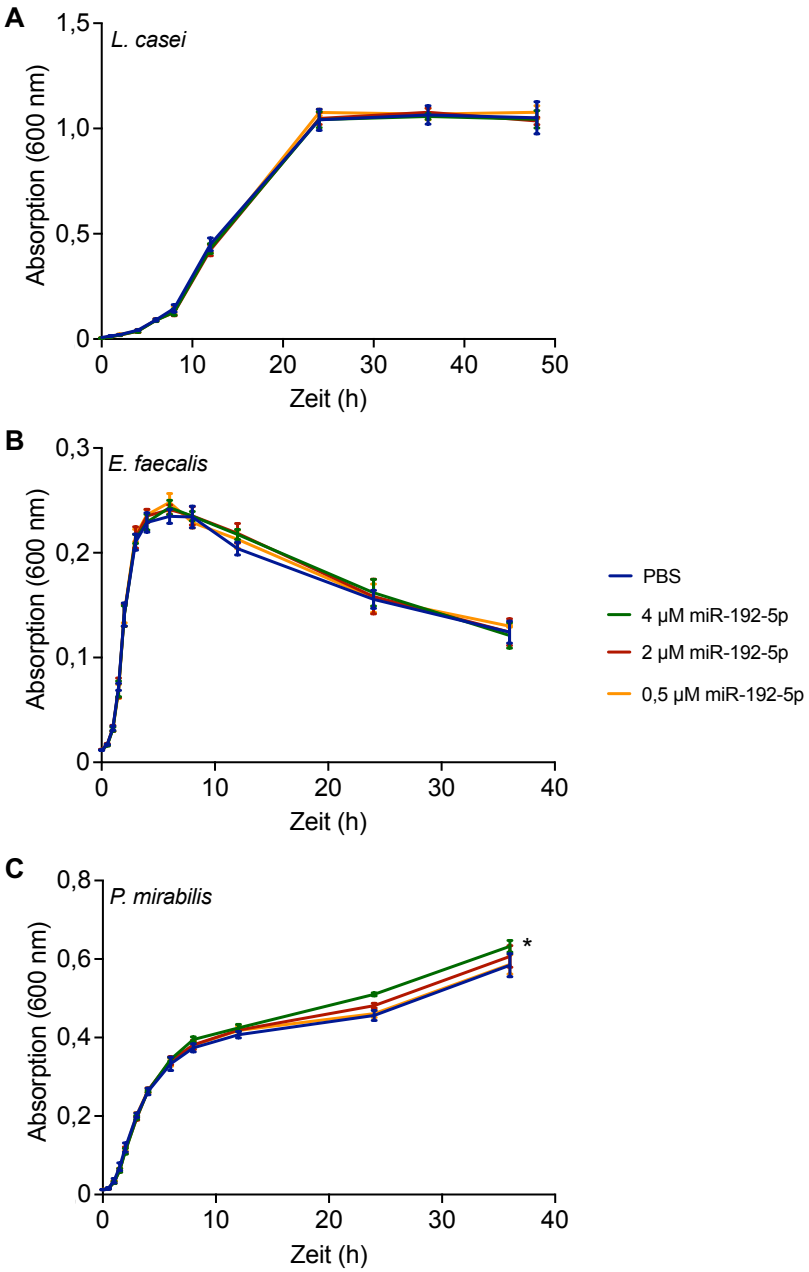

Abbildung 60: Wachstum von Bakterien in Anwesenheit von miR-192-5p.
Dargestellt ist das Wachstumsverhalten von *L. casei* (**A**), *E. faecalis* (**B**) und *P. mirabilis* (**C**) in Anwesenheit von unterschiedlichen Konzentrationen synthetischer miR-192-5p oder PBS als Kontrolle über einen Zeitraum von 48 h bzw. 36 h. Das Wachstum wurde durch die Messung der Absorption bei 600 nm (OD) ermittelt. Angegeben sind Mittelwerte sowie Standardabweichungen von 3-4 unabhängigen Experimenten. Zur Ermittlung von statistischen Signifikanzen wurden ein zweiseitiger ungepaarter t-Test durchgeführt ($p < 0,05$ *)

Darüber hinaus wurde analysiert, ob der Anstieg der OD tatsächlich auf eine erhöhte Anzahl an lebenden Bakterien zurückgeführt werden kann. Um dies zu überprüfen, wurde mit Hilfe des Live/Dead™ BacLight™ Bacterial Viability Kit (Invitrogen™) der prozentuale Anteil lebender Bakterien nach Inkubation mit 4 µM synthetischer miR-192-5p bestimmt. Um sicherzustellen, dass der potenziell beobachtete Effekt nicht durch Bestandteile des Puffers, in dem die synthetische miRNA gelöst wurde, hervorgerufen wurde, wurden zusätzlich Bakterien mit 6 µl 1 x siMAX Universal Buffer inkubiert und ebenfalls der prozentuale Anteil lebender Bakterien bestimmt.

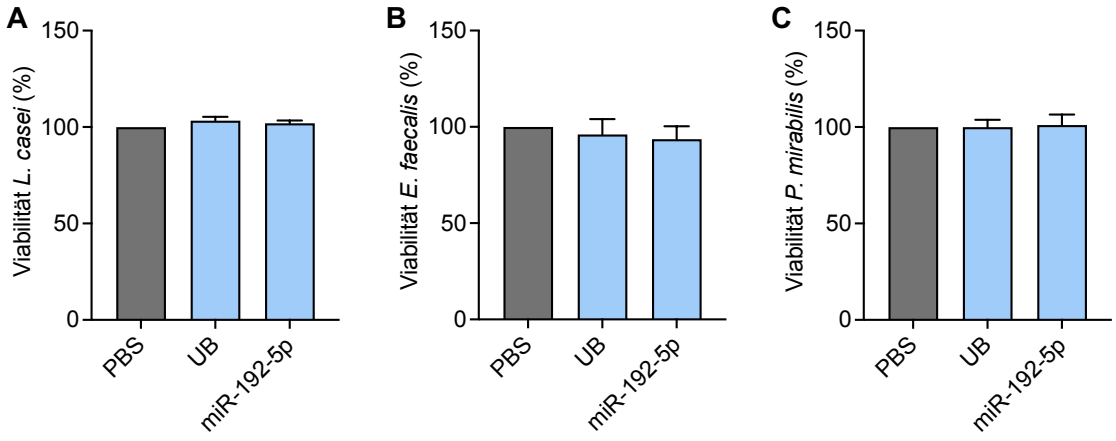

Abbildung 61: Viabilität von Bakterien in Anwesenheit von miR-192-5p.
Dargestellt sind die prozentualen Anteile lebender *L. casei* (**A**), *E. faecalis* (**B**) und *P. mirabilis* (**C**), die mit 4 µM synthetischer miR-192-5p oder 6 µl 1 x siMAX Universal Buffer (UB) für 40 h (*L. casei*) bzw. 24 h (*E. faecalis* und *P. mirabilis*) inkubiert wurden. Als Kontrolle dienten Bakterien, die mit PBS inkubiert wurden. Angegeben sind Mittelwerte sowie Standardabweichungen von 4 unabhängigen Experimenten. Zur Ermittlung von statistischen Signifikanzen wurden ein zweiseitiger ungepaarter t-Test durchgeführt.

Für *L. casei* und *E. faecalis* konnten nach 40 h oder 24 h Inkubation der Bakterien mit 4 µM miR-192-5p oder 1 x siMAX Universal Buffer keine Veränderung in den prozentualen Anteilen lebender Bakterien gemessen werden (**Abb. 61 A und B**). Diese Ergebnisse decken sich mit den Analysen des Wachstumsverhaltens durch Messung der OD (**Abb. 60 A und B**). Tatsächlich konnte jedoch auch bei *P. mirabilis* kein erhöhter Anteil lebender Bakterien gemessen werden (**Abb. 61 C**). Diese Beobachtung steht damit im Gegensatz zu dem, was die Messung der OD ergeben hat (**Abb. 60 C).** Es könnte somit möglich sein, dass die erhöhte OD in den *P. mirabilis*-Kulturen nach Inkubation mit 4 µM miR-192-5p durch andere Faktoren als einer erhöhten Anzahl lebender Bakterien hervorgerufen wurde.

4.17 Einfluss von in Liposomen verpackter miR-192-5p auf die Viabilität von Bakterien

Im vorherigen Abschnitt wurde der Einfluss von freier miR-192-5p auf das Wachstum und die Aufnahme in Bakterien untersucht. Wie die Analysen zum miRNA-Expressionsprofil in Caco-2 (+FCS) EVs jedoch gezeigt haben, liegt diese miRNA normalerweise in EVs verpackt vor. Im nächsten Abschnitt sollte daher untersucht werden, inwiefern die Verpackung von miR-192-5p zu einer Veränderung des Einflusses auf die Viabilität der hier untersuchten Bakterien und Interaktion dieser mit der miRNA zur Folge hat. Für die Erzeugung der artifiziellen Liposomen wurde im Rahmen dieser Untersuchungen das Lipofectamine™ 3000 Transfektionsreagenz genutzt. Zunächst wurde der Effekt auf die Viabilität der Bakterien untersucht. Dies sollte zum einen dazu dienen, den Effekt der Liposomen selbst, aber auch der in den Liposomen verpackten miR-192-5p zu untersuchen. Als Kontrolle wurde im Rahmen dieses Versuches DMEM, welches auch bei der Präparation der Liposomenkomplexe genutzt wurde, Liposomen in Kombination mit dem 1 x siMAX Universal Buffer, in welchem die miRNA gelöst wurde, und in Liposomen verpackte Polyadenylsäure, kurz Poly(A), eingesetzt. Poly(A) ist ebenso wie die miRNAs dazu in der Lage, mit den Liposomen einen Komplex auszubilden und diente somit zur Überprüfung der Spezifität der potenziell auftretenden Effekte durch die miR-192-5p.

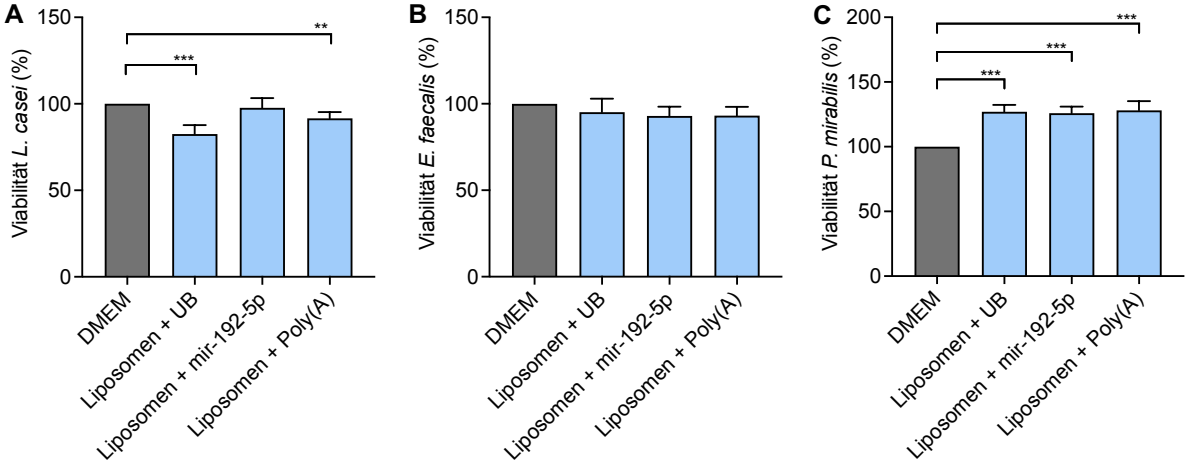

Abbildung 62: Viabilität von Bakterien in Anwesenheit von in Liposomen verpackter miR-192-5p. Dargestellt sind die prozentualen Anteile lebender *L. casei* (**A**), *E. faecalis* (**B**) und *P. mirabilis* (**C**) Bakterien, die mit 4 µM in Liposomen verpackter synthetischer miR-192-5p, 6 µl 1 x siMAX Universal Buffer (UB) in Kombination mit Liposomen oder 8 µg in Liposomen verpacktem Poly(A) für 40 h (*L. casei*) bzw. 24 h (*E. faecalis* und *P. mirabilis*) inkubiert wurden. Als Kontrolle dienten Bakterien, die mit DMEM inkubiert wurden. Angegeben sind Mittelwerte sowie Standardabweichungen von 4 unabhängigen Experimenten. Zur Ermittlung von statistischen Signifikanzen wurden ein zweiseitiger ungepaarter t-Test durchgeführt ($p < 0,05$ *, $p < 0,01$ **, $p < 0,001$ ***).

Für *L. casei* zeigte sich nach der Inkubation der Bakterien mit den Liposomen in Kombination mit 1 x siMAX Universal Buffer eine signifikante Reduktion des prozentualen Anteils lebender Bakterien auf 82,56 %. Dieser Effekt konnte nicht beobachtet werden, wenn *L. casei* mit der

in Liposomen verpackten miR-192-5p inkubiert wurden (**Abb. 62 A**). Bei der Inkubation der Bakterien mit den in Liposomen verpackten Poly(A) kam es ebenfalls zu einer signifikanten Reduktion des prozentualen Anteils lebender Bakterien auf etwa 91,61 %. Wie auch bei der Untersuchung der Viabilität von *E. faecalis* nach Inkubation mit freier miR-192-5p konnte ebenfalls keine Veränderung in der Viabilität festgestellt werden, wenn die Bakterien mit der in Liposomen verpackten miRNA inkubiert wurden (**Abb. 62 B**). Im Gegensatz dazu konnte bei *P. mirabilis* eine Erhöhung des prozentualen Anteils lebender Bakterien detektiert werden. Dieser war jedoch unabhängig davon, ob die Bakterien mit 1 x siMAX Universal Buffer in Kombination mit den Liposomen, in Liposomen verpackter miR-192-5p oder in Liposomen verpacktem Poly(A) inkubiert wurden (**Abb. 62 C**). Die Erhöhung der Viabilität war somit wahrscheinlich auf die Liposomen selbst zurückzuführen und wurde nicht durch die miR-192-5p oder Poly(A) hervorgerufen worden.

4.18 Internalisierung von in Liposomen verpackter miR-192-5p in Bakterien

Weiterhin wurde die Interaktion der Bakterien mit in Liposomen verpackter miR-192-5p wie bereits beschrieben sowohl quantitativ mit Hilfe der Durchflusszytometrie als auch qualitativ mittels CLSM untersucht. Dabei war eindeutig erkennbar, dass es durch die Verpackung der miRNA in Liposomen zu einer veränderten Interaktion aller drei Bakterien mit der miR-192-5p gekommen ist. Für *L. casei* konnte bereits nach 8 h bei 5,40 % der Bakterien ein positives Signal für die Cy3-gelabelte miRNA detektiert werden. Nach 24 h und 48 h hingegen zeigten lediglich noch 3,5 % der Bakterien ein positives Signal (**Abb. 63 A, B und C**). Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass es in den ersten 8 h zu einer verstärkten Aufnahme der in die Liposomen verpackten Cy3-gelabelten miR-192-5p durch *L. casei* gekommen war. Mit längerer Inkubationszeit könnte das Signal jedoch verloren gegangen sein, da sich die Bakterien geteilt haben und möglicherweise weniger der in den Liposomen verpackten miRNA aufgenommen wurde. Bei *E. faecalis* und *P. mirabilis* konnte mit längerer Inkubation ein stetiger Anstieg der Bakterien, die auch ein positives Signal für die Cy3-gelabelte miRNA trugen, detektiert werden. Im Detail wurden bei *E. faecalis* nach 24 h Inkubation mit der in Liposomen verpackten gelabelten miR-192-5p 13,13 % der Bakterien als Cy3-positiv detektiert (**Abb. 63 D, E und F**). Bei *P. mirabilis* zeigten nach 24 h Inkubation mit der in Liposomen verpackten miRNA 80,25 % der Bakterien ein positives Signal für die Cy3-gelabelte miR-192-5p (**Abb. 63 G, H und I**).

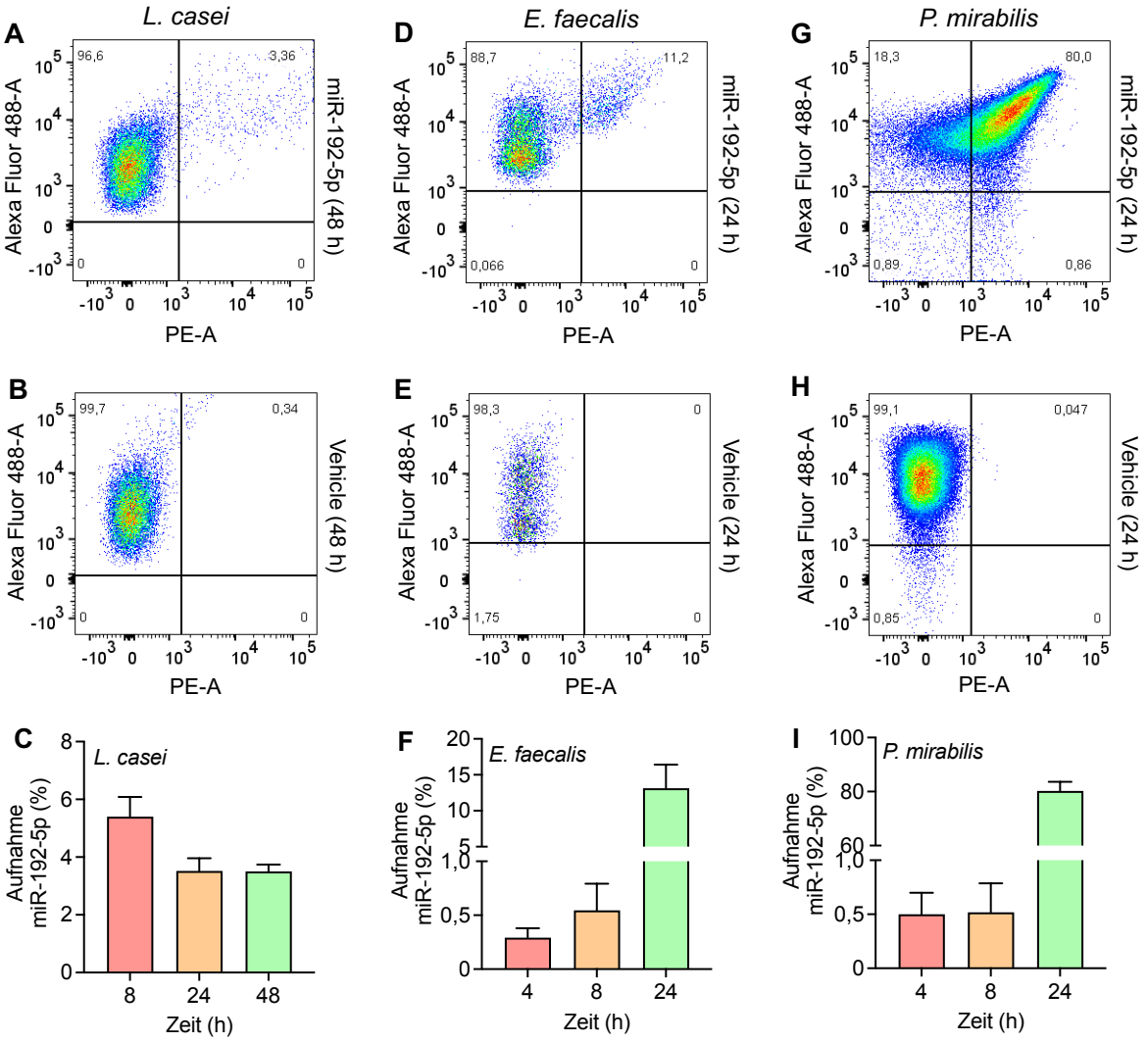

Abbildung 63: Durchflusszytometrische Analyse der Aufnahme von in Liposomen verpackter Fluoreszenz-gelabelter synthetischer miRNA durch verschiedene Bakterien.
Alle untersuchten Bakterien wurden zwischen 4 h und 48 h mit 4 µM in Liposomen verpackter Cy3-gelabelten synthetischen miR-192-5p inkubiert. Nach Ende der Inkubationszeit wurden die Bakterien mit SYTO™ 9 angefärbt und fixiert. Zur Detektion der angefärbten Bakterien wurde ein Laser bei 488 nm (Alexa Fluor 488) und zur Detektion der Cy3-gelabelten miRNA ein Laser bei 561 nm (Phycoerythrin, PE) verwendet. Dargestellt sind repräsentative Punktdiagramm, welche die Populationen der verschiedenen Bakterien nach 48 h oder 24 h Inkubation mit der in Liposomen verpackten gelabelten miRNA (**A**, **D** und **G**) oder 1 x siMAX Universal Buffer in Kombination mit den Liposomen (Vehicle) als Kontrolle (**B**, **E** und **H**) in Abhängigkeit von der Fluoreszenz zeigen. (**C**, **F** und **I**) Weiterhin ist ebenfalls der Anteil SYTO™ 9/Cy3-positiver Bakterien an den jeweiligen Zeitpunkten für alle untersuchten Bakterien dargestellt. Angegeben sind die Mittelwerte sowie Standardabweichung von 4 unabhängigen Experimenten.

Die Ergebnisse der Durchflusszytometrie ließen sich ebenfalls mittels CLSM verifizieren. Bei *L. casei* waren zu allen drei untersuchten Zeitpunkten Signale für die Cy3-gelabelte miR-192-5p sichtbar, die eine Co-Lokalisation mit Signalen der gelabelten Bakterien zeigten (**Abb. 64 A**).

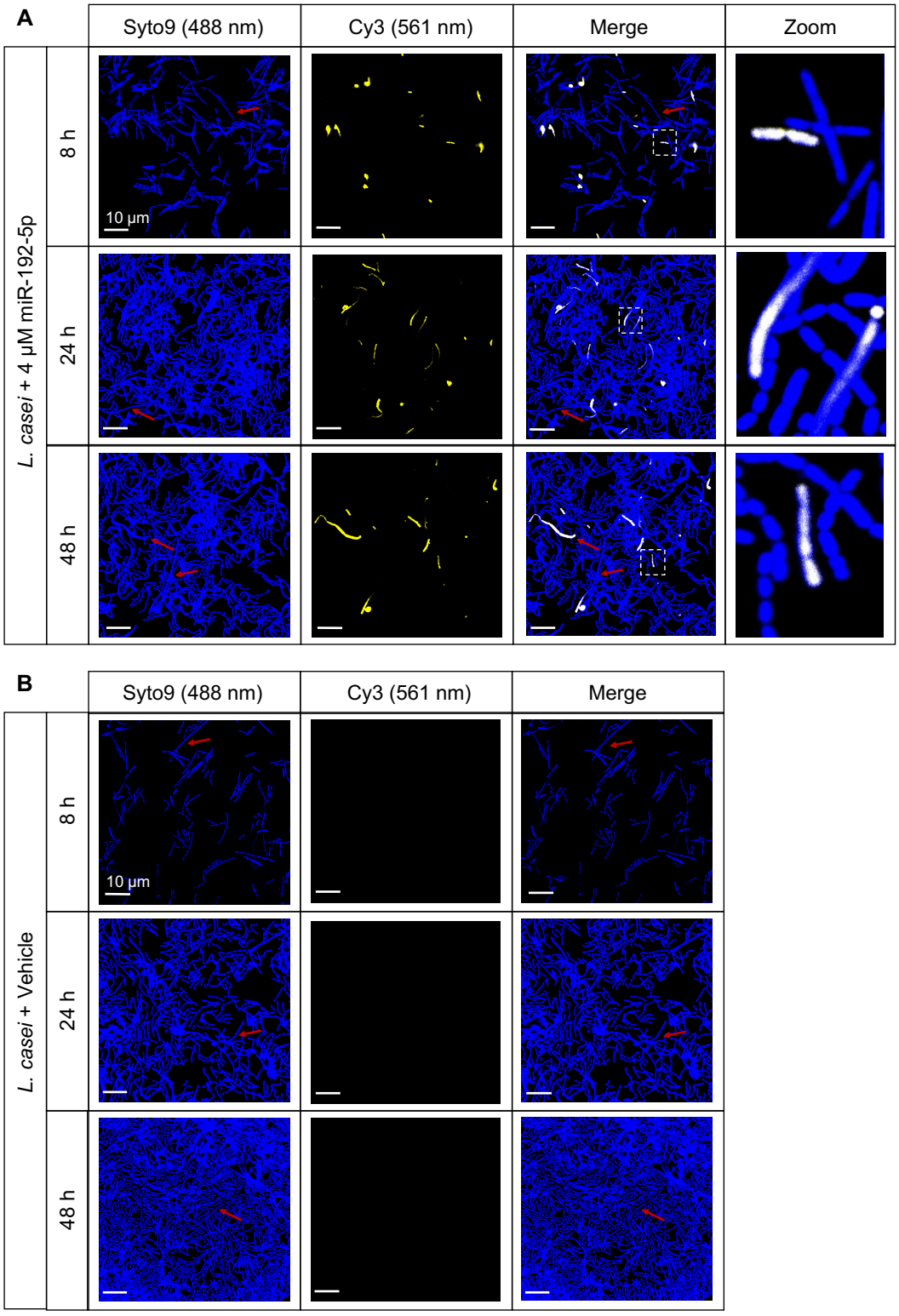

Abbildung 64: Visualisierung der Interaktion von *L. casei* mit in Liposomen verpackter miR-192-5p.
Die Bakterien wurden für 8 h, 24 h oder 48 h mit in Liposomen verpackter Cy3-gelabelter synthetischer miR-192-5p (**A**) oder 1 x siMAX Universal Buffer in Kombination mit den Liposomen (Vehicle) als Kontrolle (**B**) inkubiert. Nach Ende der Inkubationszeit wurden die Bakterien mit SYTO™ 9 angefärbt und fixiert. SYTO™ 9 wurde mit einem Argonlaser bei 488 nm und Cy3 mit einem DPSS Laser bei 561 nm sichtbar gemacht. Zur besseren Veranschaulichung wurden die Bakterien in Blau und die gelabelte miRNA in Gelb dargestellt. Die roten Pfeile kennzeichnen morphologisch auffällige Bakterien. Größenstandard: 10 µm

Auffällig waren weiterhin die morphologischen Veränderungen einiger Bakterien. Nach 8 h Inkubation von *L. casei* mit der in Liposomen verpackten miR-192-5p konnte eine deutliche Veränderung der Morphologie der Bakterien, verglichen mit denen die mit freier miR-192-5p behandelt wurden, festgestellt werden (**Abb. 64 A**). Dieser Effekt schien sich jedoch auf die Liposomen zurückführen zu lassen, da die Kontrolle nach 8 h ähnliche morphologische Veränderungen aufwies (**Abb. 64 B**). Weiterhin konnten auch zu späteren Zeitpunkten immer wieder Bakterien detektiert werden, die ungewöhnlich groß waren (**Abb. 64 A und B, rote Pfeile**). Auch dieser Effekt ließ sich sowohl in den Bakterien, die zusammen mit der in Liposomen verpackten miRNA kultiviert wurden, als auch den Kontrollen detektieren. Da in genau diesen Bakterien ebenfalls ein sehr starkes Signal für die Cy3-gelabelte miR-192-5p detektiert werden konnte, ist diese veränderte Morphologie wie bereits erwähnt mit großer Wahrscheinlichkeit auf die Liposomen zurückzuführen. Dass es sich bei den beobachteten Strukturen nicht um die natürliche Form handelt, in der die in Liposomen verpackte Cy3-gelabelte miR-192-5p im CLSM sichtbar ist, kann durch die Abwesenheit dieser Strukturen bei der Analyse von *E. faecalis* (**Abb. 65**) und *P. mirabilis* (**Abb. 66**) ausgeschlossen werden. Bei *E. faecalis* konnten auch bereits nach 4 h schwache Signale für die Cy3-gelabelte miRNA in den Bakterien detektiert werden, welche mit fortschreitender Inkubationszeit stetig zunahmen (**Abb. 65 A**). Dass bereits nach 8 h so deutliche Signale sichtbar waren, obwohl laut Ergebnissen der Durchflusszytometrie lediglich 0,55 % der Bakterien auch Cy3-positiv waren, könnte mit der Akkumulation der Signale durch die Liposomen und dadurch der besseren Detektierbarkeit im CLSM zusammenhängen. Gleiches könnte auch bei *P. mirabilis* der Fall sein. Dort haben nach 4 h und 8 h ebenfalls nur etwa 0,51 % der Bakterien ein positives Signal für die gelabelte miRNA gezeigt, jedoch ließen sich die Signale im CLSM deutlich detektieren (**Abb. 66 A**). Die Akkumulation der Signale könnte auch der Grund dafür sein, dass bei *P. mirabilis* Bakterien, die mit freier miRNA inkubiert wurden, nach 4 h und 8 h mehr Bakterien detektiert werden konnten, die die miRNA aufgenommen haben. Da die miRNA in diesem Fall frei vorlag, konnten mehr Bakterien kleine Mengen aufnehmen, was wiederum im Durchflusszytometer und nicht im CLSM detektiert werden konnte. Deutlich sichtbar waren hingegen die Signale der gelabelten miRNA nach 24 h Inkubation mit *P. mirabilis*. Es konnten dabei besonders starke Signale für miR-192-5p an den Polen der Bakterien detektiert werden (**Abb. 66 A**). Bei *E. faecalis* und *P. mirabilis* Bakterien, die als Kontrolle mit artifiziellen Liposomen ohne die gelabelte miRNA inkubiert wurden, konnten keine Signale detektiert werden (**Abb. 65 B und 66 B**).

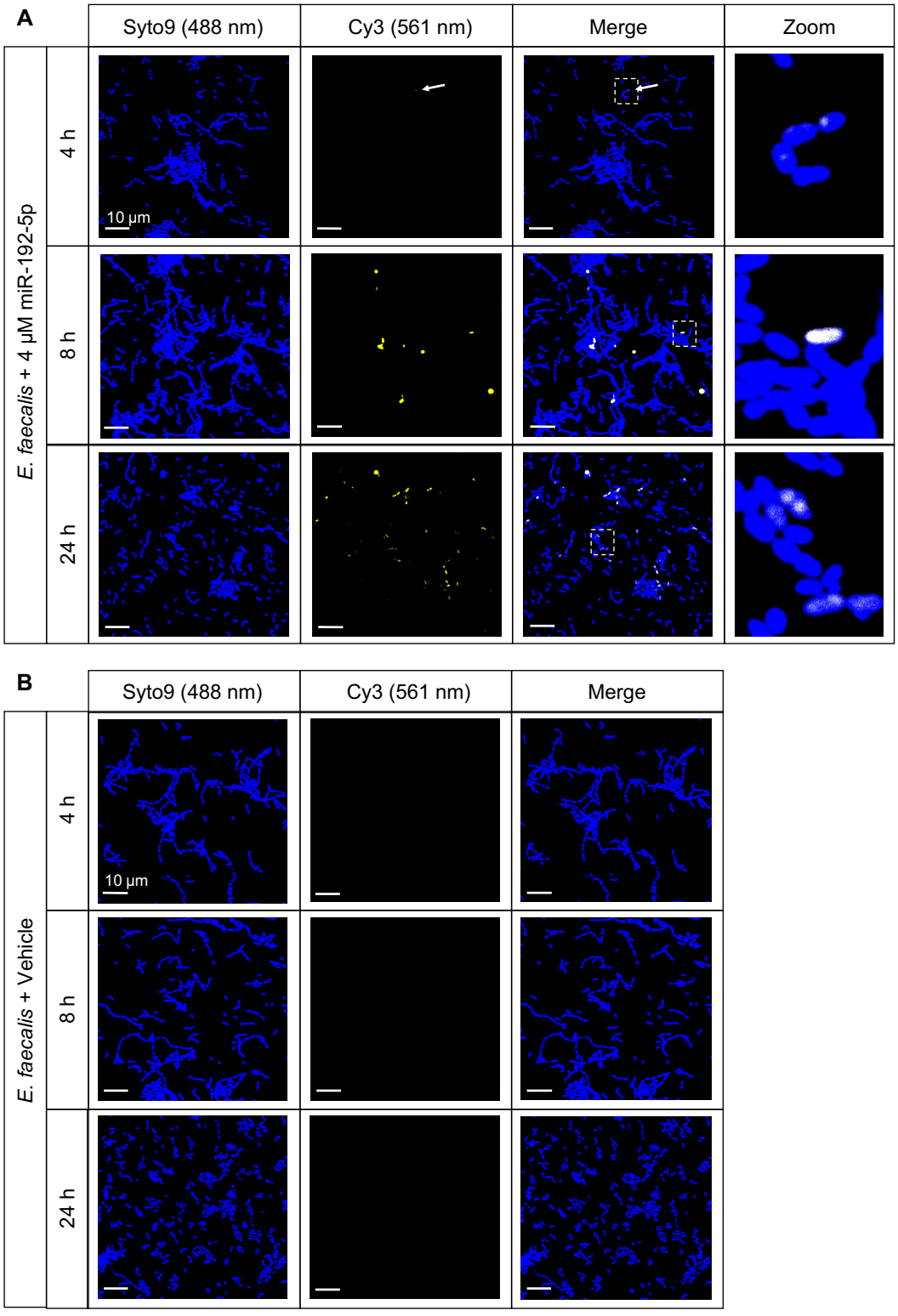

Abbildung 65: Visualisierung der Interaktion von *E. faecalis* mit in Liposomen verpackter miR-192-5p.
Die Bakterien wurden für 4 h, 8 h oder 24 h mit in Liposomen verpackter Cy3-gelabelter synthetischer miR-192-5p (**A**) oder 1 x siMAX Universal Buffer in Kombination mit den Liposomen (Vehicle) als Kontrolle (**B**) inkubiert. Nach Ende der Inkubationszeit wurden die Bakterien mit SYTO™ 9 angefärbt und fixiert. SYTO™ 9 wurde mit einem Argonlaser bei 488 nm und Cy3 mit einem DPSS Laser bei 561 nm sichtbar gemacht. Zur besseren Veranschaulichung wurden die Bakterien in Blau und die gelabelte miRNA in Gelb dargestellt. Die weißen Pfeile kennzeichnen Bereiche, in denen eine schwache Interaktion der Bakterien mit in Liposomen verpackten Cy3-gelabelten miR-192-5p detektiert werden konnten. Größenstandard: 10 µm

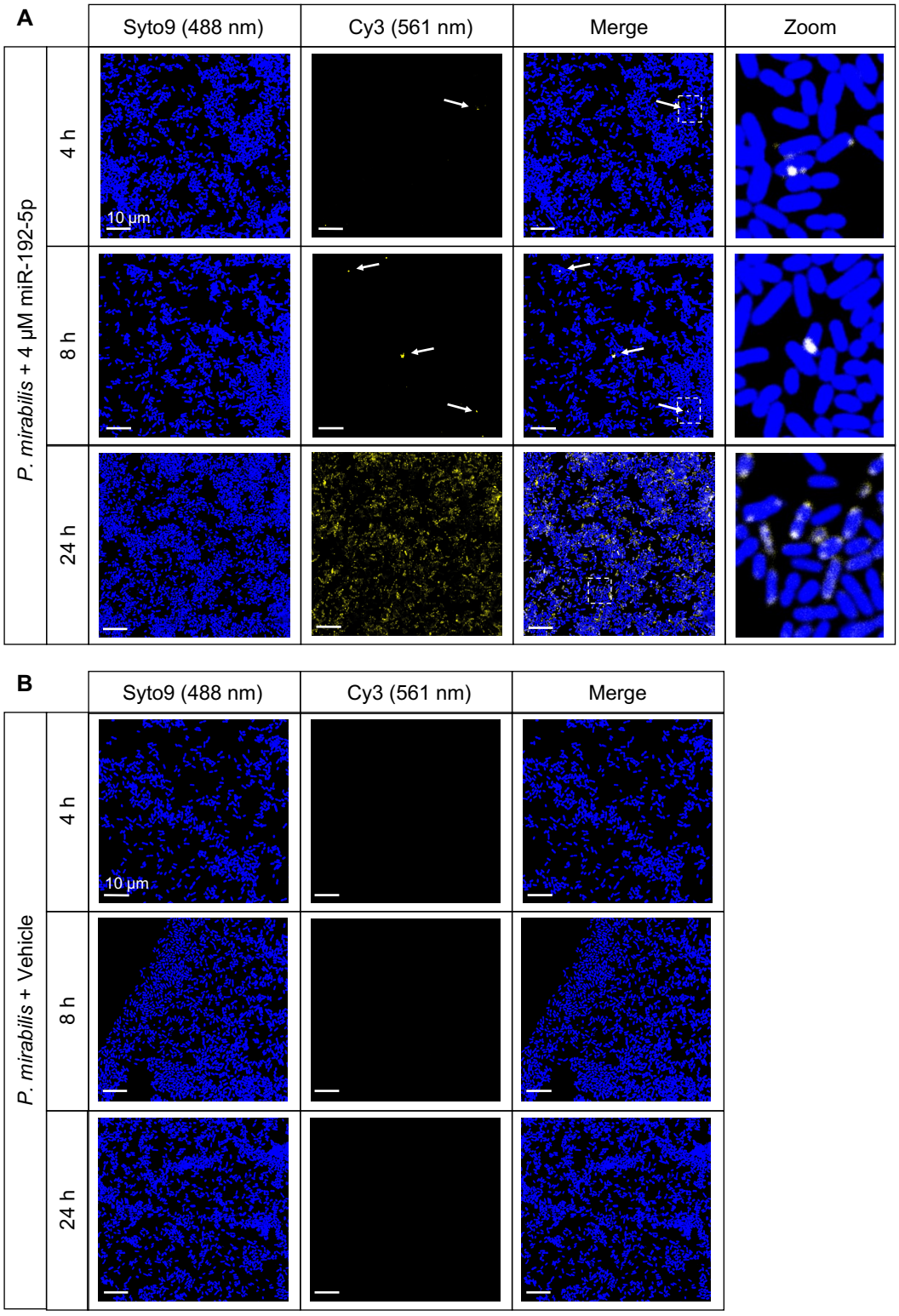

Abbildung 66: Visualisierung der Interaktion von *P. mirabilis* mit in Liposomen verpackter miR-192-5p.
Die Bakterien wurden für 4 h, 8 h oder 24 h mit in Liposomen verpackter Cy3-gelabelter synthetischer miR-192-5p (**A**) oder 1 x siMAX Universal Buffer in Kombination mit den Liposomen (Vehicle) als Kontrolle (**B**) inkubiert. Nach Ende der Inkubationszeit wurden die Bakterien mit SYTO™ 9 angefärbt und fixiert. SYTO™ 9 wurde mit einem Argonlaser bei 488 nm und Cy3 mit einem DPSS Laser bei 561 nm sichtbar gemacht. Zur besseren Veranschaulichung wurden die Bakterien in Blau und die gelabelte miRNA in Gelb dargestellt. Die weißen Pfeile kennzeichnen Bereiche, in denen eine schwache Interaktion der Bakterien mit in Liposomen verpackten Cy3-gelabelten miR-192-5p detektiert werden konnten. Größenstandard: 10 µm

Zusammenfassend lassen die Ergebnisse darauf schließen, dass die Verpackung der miR-192-5p in Liposomen einen positiven Einfluss auf die Fähigkeit aller drei Bakterien hatte, mit der verpackten miRNA zu interagieren.

Wie bereits erwähnt, wurde für die Präparation der Komplexe aus Liposomen und miRNA DMEM genutzt. Für die Versuche mit der freien miR-192-5p wurde diese hingegen zusammen mit PBS und den jeweiligen Bakterien inkubiert. Um auszuschließen, dass das DMEM einen Einfluss auf die Fähigkeit der Bakterien hatte, die miRNA aufzunehmen, wurde die Aufnahme der freien miR-192-5p nochmals, allerdings in Anwesenheit von DMEM untersucht. Wie auch zuvor in den anderen Versuchen beschrieben, wurde für die Analyse der Aufnahme die Durchflusszytometrie und CLSM genutzt. Bei der Inkubation von *L. casei* mit freier Cy3-gelabelter miR-192-5p in DMEM konnte lediglich bei durchschnittlich 1,31 % der Bakterien ein positives Signal für die gelabelte miRNA detektiert werden (**Abb. 67 A, B und C**). Dieser Prozentsatz entsprach damit ungefähr dem, was bereits für die Inkubation der Bakterien mit freier Cy3-gelabelter miR-192-5p in PBS beobachtet wurde. Damit war die Aufnahme der miRNA durch *L. casei* signifikant verringert, wenn die miRNA zuvor nicht in Liposomen verpackt wurde. Ein ähnliches Ergebnis war auch für *E. faecalis* sichtbar. Die Bakterien konnten ebenfalls lediglich die in Liposomen verpackte miR-192-5p, nicht jedoch die freie miRNA in PBS oder DMEM aufnehmen (**Abb. 67 D, E und F**). Bei *P. mirabilis* haben die vorherigen Ergebnisse gezeigt, dass sich durch die Verpackung der miRNA in Liposomen die Aufnahme signifikant auf 80,25 % steigern lassen konnte. Ein ähnlich hoher Prozentsatz von 82,75 % konnte detektiert werden, wenn die Bakterien für 24 h zusammen mit der miRNA in DMEM inkubiert wurden (**Abb. 67 G, H und I**). Die Ergebnisse ließen sich auch mittels CLSM bestätigen. Während bei *L. casei* vereinzelt Bakterien detektiert werden können, in denen Signale für die Cy3-gelabelte miRNA akkumuliert waren (**Abb. 68 A**), waren diese bei *E. faecalis* komplett abwesend (**Abb. 68 B**). Die meisten Signale für die gelabelte miRNA waren, wie die Ergebnisse des Durchflusszytometers bereits gezeigt haben, nach Inkubation von *P. mirabilis* mit der gelabelten miR-192-5p detektierbar (**Abb. 68 C**). Daraus kann geschlussfolgert werden, dass die Verpackung der miRNA in Liposomen mit großer Wahrscheinlichkeit für die gesteigerte Aufnahme der miRNA in *L. casei* und *E. faecalis* verantwortlich war. Bei *P. mirabilis* hingegen schienen weitere Faktoren eine Rolle zu spielen, da hier bereits eine gesteigerte Aufnahme der freien miRNA durch den Einsatz von DMEM statt PBS bei der Behandlung erzielt werden konnte.

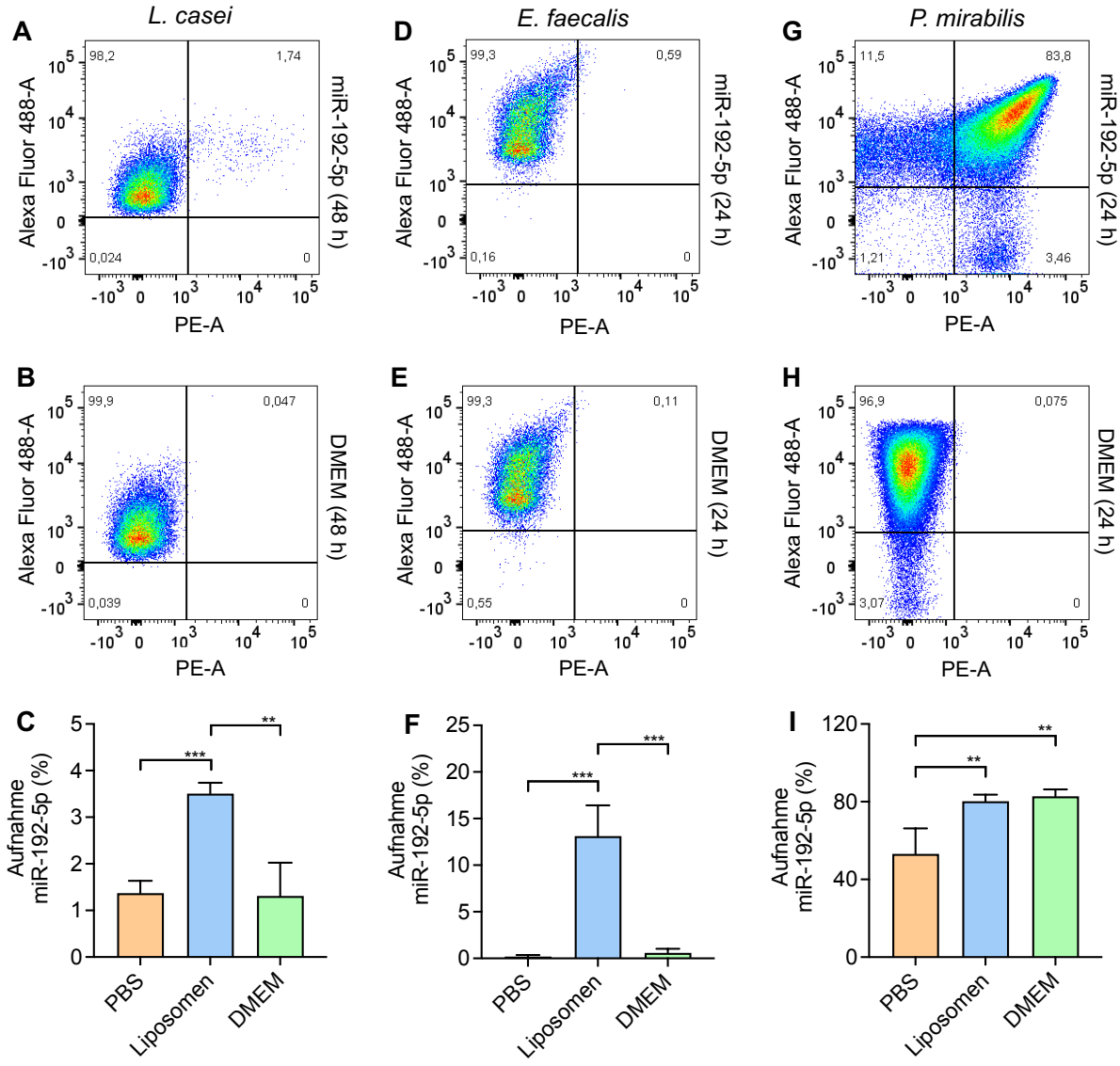

Abbildung 67: Durchflusszytometrische Analyse der Aufnahme von Fluoreszenz-gelabelter miRNA durch verschiedene Bakterien in Abhängigkeit von den Behandlungsbedingungen.
Alle untersuchten Bakterien wurden zwischen 24 h und 48 h mit 4 µM Cy3-gelabelten synthetischen miR-192-5p inkubiert. Nach Ende der Inkubationszeit wurden die Bakterien mit SYTO™ 9 angefärbt und fixiert. Zur Detektion der angefärbten Bakterien wurde ein Laser bei 488 nm (Alexa Fluor 488) und zur Detektion der Cy3-gelabelten miRNA ein Laser bei 561 nm (Phycoerythrin, PE) verwendet. Dargestellt sind repräsentative Punktdiagramm, welche die Populationen der verschiedenen Bakterien nach 48 h oder 24 h Inkubation mit der gelabelten miRNA (**A**, **D** und **G**) oder DMEM als Kontrolle (**B**, **E** und **H**) in Abhängigkeit von der Fluoreszenz zeigen. (**C**, **F** und **I**) Weiterhin ist ebenfalls der Anteil SYTO™ 9/Cy3-positiver Bakterien nach Inkubation mit der Cy3-gelabelten synthetischen miR-192-5p in PBS, DMEM oder in Liposomen verpackt für alle untersuchten Bakterien dargestellt. Angegeben sind die Mittelwerte sowie Standardabweichung von 4 unabhängigen Experimenten. Zur Ermittlung von statistischen Signifikanzen wurden ein zweiseitiger ungepaarter t-Test durchgeführt ($p < 0,01$ **, $p < 0,001$ ***).

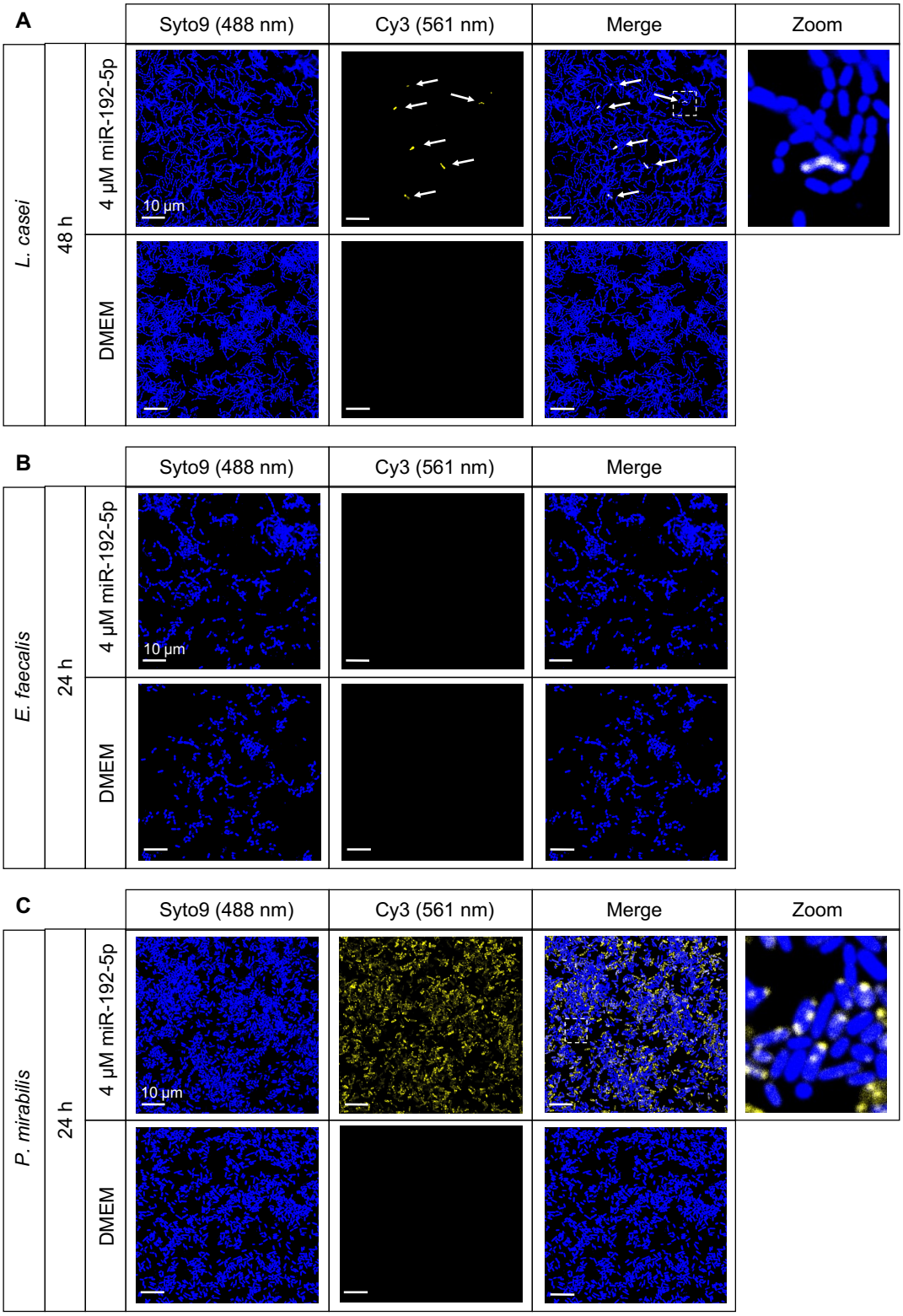

Abbildung 68: Visualisierung der Interaktion von verschiedenen Bakterien mit miR-192-5p in DMEM.
L. casei (**A**), *E. faecalis* (**B**) und *P. mirabilis* (**C**) wurden für 48 h mit 4 µM Cy3-gelabelter synthetischer miR-192-5p oder DMEM als Kontrolle inkubiert. Nach Ende der Inkubationszeit wurden die Bakterien mit SYTO™ 9 angefärbt und fixiert. SYTO™ 9 wurde mit einem Argonlaser bei 488 nm und Cy3 mit einem DPSS Laser bei 561 nm sichtbar gemacht. Zur besseren Veranschaulichung wurden die Bakterien in Blau und die gelabelte miRNA in Gelb dargestellt. Die weißen Pfeile kennzeichnen Bereiche, in denen eine schwache Interaktion der Bakterien mit in Liposomen verpackte Cy3-gelabelter miR-192-5p detektiert werden konnten. Größenstandard: 10 µm

5. Diskussion

Extrazelluläre Vesikel (EVs) sind kleine Lipid-Membranpartikel, die von pro- und eukaryotischen Zellen sezerniert werden und eine wichtige Funktion bei der Zell-Zell-Kommunikation ausüben. Neben Proteinen und Lipiden können auch Nukleinsäuren wie DNA und RNA auf diese Weise zwischen verschiedenen Zellen transportiert werden (Yáñez-Mó et al., 2015). In den letzten Jahren ist vor allem die Kommunikation von Bakterien und ihrem Wirt, was auch als sogenannte *Cross-Kingdom* Kommunikation bezeichnet wird, immer weiter in den Fokus der Forschung gerückt. Im Zuge dessen stellte sich heraus, dass die mit den EVs assoziierten RNAs eine wichtige Rolle bei der Regulation der Genexpression in Empfängerzellen spielen können (Munhoz da Rocha et al., 2020). Trotz der stetig wachsenden Erkenntnisse in diesem Feld gibt es immer noch zu wenig Untersuchungen zur Klärung des Effekts der bakteriellen und eukaryotischen EVs sowie der damit assoziierten RNA bei der spezies-übergreifenden Kommunikation. Darüber hinaus besteht die Möglichkeit, dass eine solche Kommunikation auch bei verschiedenen humanen Erkrankungen relevant sein konnte und zur Entstehung oder Progression dieser beitragen kann. Das Ziel dieser Arbeit war daher, grundlegende Kenntnisse hinsichtlich der bidirektionalen *Cross-Kingdom* Kommunikation von Eukaryoten und Prokaryoten über EVs zu gewinnen.

5.1 Veränderte Zusammensetzung des Darmmikrobioms von Patienten mit M. Parkinson

Die Zusammensetzung des Darmmikrobioms bei Parkinson-Patienten ist seit vielen Jahren ein wichtiges Thema der Forschung, um die Entstehung von M. Parkinson besser verstehen zu können. Es gibt bereits eine ganze Reihe unterschiedlicher Studien, die bestimmte taxonomische Gruppen beschrieben haben, deren Vorkommen sich zwischen Patienten mit M. Parkinson und gesunden Kontrollprobanden stark unterscheidet (Hill-Burns et al., 2017; Hopfner et al., 2017; A. Lin et al., 2018; Romano et al., 2021). Auch im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte deutliche Unterschiede hinsichtlich der Komposition des Darmmikrobioms detektiert werden. Dabei wurde vor allem ein verringertes Vorkommen von Bakterien der Ordnung Clostridiales und unter diesen insbesondere der Familien Ruminococcaceae und Lachnospiraceae beobachtet. Weiterhin konnte für die Spezies *Lachnospiraceae* species *incertae sedis* and *Faecalibacterium prausnitzii* eine verringerte Abundanz bei Patienten mit M. Parkinson im Vergleich zu den gesunden Kontrollprobanden detektiert werden. Diese Ergebnisse decken sich mit einer Vielzahl von Studien, die ebenfalls eine Verringerung der Familien Lachnospiraceae und Ruminococcaceae sowie im

speziellen der Spezies *Faecalibacterium prausnitzii* beobachten konnten (Hill-Burns et al., 2017; Keshavarzian et al., 2015; Wallen et al., 2020). Viele der Bakterien in diesen Gattungen gehören zu den SCFA (*Short chain fatty acid*)-produzierenden Bakterien. SCFA können von Darmepithelzellen als Energiequelle genutzt werden (Roediger, 1982) und besitzen darüber hinaus die Fähigkeit, durch Modulation der Aktivität des enterischen Nervensystems die Motilität des Darms zu beeinflussen (Soret et al., 2010; Yajima, 1985). Zudem konnte bereits ein Zusammenhang zwischen niedrigen SCFA-Konzentrationen durch das verringerte Vorkommen von SCFA-produzierenden Bakterien und Obstipationen bei Patienten mit M. Parkinson gezeigt werden (Fu et al., 2022). Des Weiteren sind SCFA dazu in der Lage, an verschiedene Rezeptoren der Familie der G-Protein gekoppelten Rezeptoren *(G-protein-coupled receptor*, GPCR) zu binden, die vermehrt von Darmepithel- und Immunzellen exprimiert werden. Durch die Bindung von SCFA kommt es zur Aktivierung dieser Rezeptoren, was wiederum wichtig für die Immunantwort sowie die Aufrechterhaltung der Integrität der Darmbarriere ist (D'Souza et al., 2017; Ratajczak et al., 2019). Bei Parkinson-Patienten kommt es hingegen zum Verlust der Integrität der Darmbarriere und demzufolge zu erhöhten Permeabilität, wodurch vermehrt bakterielle Produkte aus dem Darmlumen in den Blutkreislauf und ins Gehirn gelangen können (van IJzendoorn & Derkinderen, 2019). Es wurde zudem ein Zusammenhang zwischen der Präsenz von Alpha-Synuclein Aggregaten und einer erhöhten Darmpermeabilität in einem murinen PD Modell (Kelly et al., 2014) sowie auch in Menschen mit M. Parkinson (Forsyth et al., 2011) beschrieben. Im Einklang damit konnte gezeigt werden, dass einige Mitglieder aus der Familie Enterobacteriaceae das Amyloid Curli produzieren, dessen strukturelle Untereinheit CsgA wiederum die Aggregation von Alpha-Synuclein in Mäusen beschleunigen kann (Sampson et al., 2020; Van Gerven et al., 2015; Yan et al., 2020). Die Abundanz von Bakterien aus der Familie Enterobacteriaceae war wiederum in vielen Studien bei Parkinson-Patienten erhöht (Nakahara et al., 2023; Unger et al., 2016; Wallen et al., 2020), was auch im Rahmen der vorliegenden Arbeit bestätigt werden konnte. Weiterhin zeigten in dieser Arbeit auch Bakterien der Ordnungen Lactobacillales und Bifidobacteriales ein erhöhtes Vorkommen im Darm von Patienten mit M. Parkinson. Auf Ebene der Familien waren der Anteil der Enterococcaceae und Bifidobacteriaceae sowie teilweise auch der Lactobacillaceae erhöht. In der Literatur lassen sich dazu Studien finden, die sowohl ähnliche als auch gegenteilige Beobachtung zeigen (Hill-Burns et al., 2017; Hopfner et al., 2017; Lin et al., 2018; Unger et al., 2016). Interessanterweise werden Bakterien aus den Familien Bifidobacteriaceae und Lactobacillaceae vermehrt antiinflammatorische Eigenschaften zugeschrieben (Aghamohammad et al., 2022; Riedel et al., 2006). Die Gründe für das vermehrte Vorkommen dieser Bakterien im Darm von Parkinson-Patienten sind noch nicht vollständig geklärt. Es wird jedoch angenommen, dass dies möglicherweise eine Folge der Einnahme von Probiotika, die Bakterien der Gattungen *Lactobacillus* und *Bifidobacterium*

enthalten sein kann (Barichella et al., 2016). Darüber hinaus ist auch bekannt, dass Bakterien der Gattung *Lactobacillus* und *Enterococcus* Enzyme produzieren können, mit Hilfe derer sie in der Lage sind Levodopa (L-Dopa), ein Parkinsonmedikament, zu metabolisieren (Jameson & Hsiao, 2019; Rekdal et al., 2019; van Kessel et al., 2019; K. Zhang & Ni, 2014). Es könnte sich auch um eine Art kompensatorischer Mechanismus des Körpers zur Wiederherstellung der intestinalen Homöostase handeln (Wallen et al., 2020). Andere Studien gehen wiederum davon aus, dass die normalerweise kommensalen Bakterien bei immungeschwächten Personen auch als opportunistische Pathogene agieren können (Doron & Snydman, 2015; Suez et al., 2019; Wallen et al., 2020). Zusammenfassend konnten die Ergebnisse dieser Untersuchung zeigen, dass die Zusammensetzung des Darmmikrobioms von Parkinson-Patienten deutliche Unterschiede zu dem von gesunden Kontrollprobanden aufwies.

5.1.1 Kriterien für die Auswahl von *L. casei*, *E. faecalis* und *P. mirabilis*

Auf Basis der Ergebnisse der Metagenom-Analyse sowie der aktuellen Literatur wurden anschließend Bakterien ausgewählt, deren Kommunikation mit Darmepithelzellen näher untersucht werden sollte. Ein Vertreter der Familie Lactobacillaceae ist die Spezies *Lacticaseibacillus casei*, früher *Lactobacillus casei*. Bei *L. casei* handelt sich um Gram-positive Bakterien, die als natürliche Kommensalen des Darmtraktes des Menschen auftreten (C.-H. Huang et al., 2018; Zheng et al., 2020). Wie bereits beschrieben ist aktuell noch unbekannt, weshalb Bakterien mit antiinflammatorischen Eigenschaften im Darm von Patienten mit M. Parkinson vermehrt auftreten. In der Vergangenheit konnte gezeigt werden, dass *L. casei*, wenn es als Probiotikum verabreicht wurde, zur Verminderung von Obstipationen bei Parkinson-Patienten beitragen kann (Cassani et al., 2011). Dies könnte ein Anzeichen dafür sein, dass eine erhöhte Anwesenheit tatsächlich mit positiven Effekten verbunden ist und möglicherweise der Progression von M. Parkinson entgegenwirken könnte. Derzeit gibt es bereits eine ganze Reihe von Studien, die sich mit den Effekten von *L. casei* auf Darmepithelzellen beschäftigen (Eun et al., 2011; Neudeck et al., 2004; Samak et al., 2021). Allerdings wurde in diesen Studien nicht untersucht, ob die von *L. casei* sezernierten MVs sowie die mit ihnen assoziierte RNA eine entscheidende Rolle bei den beobachteten Effekten spielen und damit zur Kommunikation dieses Bakterium mit den humanen Zellen beitragen.
Enterococcus faecalis gehört zu den Vertretern der Familie Enterococcaceae. Bei *E. faecalis* handelt es sich um ein Gram-positives opportunistisches Pathogen, welches zu den natürlichen Bewohnern des Gastrointestinaltrakts gehört (Archambaud et al., 2024). In den letzten Jahren ist bekannt geworden, dass *E. faecalis* mit Hilfe einer bakteriellen Tyrosin-Decarboxylase in der Lage ist das Parkinson-Medikament L-Dopa zu metabolisieren (Jameson

& Hsiao, 2019; Rekdal et al., 2019; van Kessel et al., 2019). L-Dopa wird normalerweise im Darm resorbiert und in den Neuronen im Gehirn zu Dopamin umgewandelt (Contin & Martinelli, 2010). Durch die hohe Abundanz von *E. faecalis* im Darm von Parkinson-Patienten, welche möglicherweise mit der Gabe von L-Dopa verbunden ist, kann das Medikament jedoch keine Wirkung zeigen, da es nach der Umwandlung zu Dopamin im Darm nicht mehr durch die Blut-Hirn-Schranke gelangen kann (Jameson & Hsiao, 2019; Pinder, 1970; van Kessel et al., 2019). Auf diese Weise könnte das Bakterium indirekt die Progression von M. Parkinson fördern. Weiterhin bleibt zu klären, welche Auswirkung das erhöhte Vorkommen von *E. faecalis* und damit einhergehend dessen MVs sowie die mit ihnen assoziierte RNA auf die umliegenden intestinalen Epithelzellen hat.

Ein weiteres Bakterium, welches im Rahmen dieser Arbeit näher untersucht wurde, war *Proteus mirabilis.* Es handelt sich dabei um ein Gram-negatives opportunistisches Pathogen aus der Ordnung der Enterobacterales, welches früher zur Familie der Enterobactericeae gezählt, jedoch seit 2016 der Familie Morganellacaeae zugeordnet wird (Adeolu et al., 2016; Armbruster et al., 2018). Wie die beiden anderen Bakterien, ist auch *P. mirabilis* ein natürlicher Bewohner im Darm von Menschen und Tieren (Armbruster & Mobley, 2012; Wenner & Rettger, 1919). Ein Zusammenhang von *P. mirabilis* mit M. Parkinson ist bereits seit einigen Jahren bekannt. Im Jahr 2018 wurde erstmals berichtet, dass die Abundanz von *P. mirabilis* im murinen PD Modell erhöht war und mit der Ausbildung von verschiedenen Parkinson-assoziierten Merkmalen wie der Schädigung von dopaminergen Neuronen und der Stimulation der Alpha-Synuclein Aggregation in Gehirn und Darm einherging. Die Autoren postulierten, dass vor allem das LPS von *P. mirabilis* eine wichtige Rolle bei den beobachteten Effekten spielt (J. G. Choi et al., 2018). Einige Jahre später konnte gezeigt werden, dass auch das Enzym Urease von *P. mirabilis* eine Neuroinflammation im Gehirn, wie sie auch bei Patienten mit M. Parkinson beobachtet wird, hervorrufen kann (Grahl et al., 2023). Neben Studien, die sich mit murinen PD-Modellen beschäftigen, lässt sich auch ein Bericht finden, der ein erhöhtes Vorkommen der Gattung *Proteus* im Darm von Menschen mit M. Parkinson gezeigt hat (W. Li et al., 2017). Ebenso wie bei *L. casei* und *E. faecalis* lassen sich zum aktuellen Zeitpunkt jedoch kaum Studien finden, die die Beteiligung der *P. mirabilis* OMVs sowie der OMV-RNA bei der Kommunikation des Bakteriums mit Darmepithelzellen, vor allem im Kontext von M. Parkinson, näher untersuchen. Zusammenfassend lässt sich schlussfolgern, dass für alle drei genannten Bakterien ein direkter oder indirekter Zusammenhang mit M. Parkinson bekannt ist. Daher wurde im Folgenden *L. casei*, *E. faecalis* und *P. mirabilis* ausgewählt, um die Kommunikation zwischen den Bakterien und humanen Darmepithelzellen über bakterielle und eukaryotische EVs sowie die damit assoziierte RNA zu untersuchen.

5.2 *L. casei*, *E. faecalis* und *P. mirabilis* sezernieren BEVs

In den letzten Jahren wurde die Sekretion von BEVs bei einer ganzen Reihe von verschiedensten Bakterien wie z. B. *Campylobacter jejuni*, *E. coli*, *Listeria monocytogenes* oder *Staphylococcus aureus* beschrieben (Blenkiron et al., 2016; Karthikeyan et al., 2019; L. H. M. Le et al., 2024; E. Lee et al., 2009). Ebenso konnte bereits auch die Produktion von BEVs durch *L. casei* (Bäuerl et al., 2020; Dean et al., 2019; Müller et al., 2021), *E. faecalis* (Afonina et al., 2021; M. Zhao et al., 2023) und *P. mirabilis* (Gao et al., 2018; Wang et al., 2022) beobachtet werden. Ein Ziel dieser Arbeit war es ebenfalls BEVs aus den Kulturüberständen dieser drei Bakterien zu isolieren. Dafür wurde zu Beginn zunächst das Wachstumsverhalten der Bakterien untersucht, um einen geeigneten Zeitpunkt zu identifizieren, an dem die Überstände für die Isolation der Bakterien gesammelt werden sollten. Basierend auf einer Studie aus dem Jahr 2023 konnte gezeigt werden, dass sich Bakterien im Darm in unterschiedlichen Wachstumsphasen befinden, wobei dies u. a. von Faktoren wie der Wachstumsgeschwindigkeit der Bakterien oder auch von der Defäkationsrate abhängig sein kann (Lim et al., 2023). Im Hinblick darauf, dass Patienten mit M. Parkinson oftmals unter Obstipationen leiden (Su et al., 2017) und die Bakterien daher mehr Zeit im Darm zum Wachsen haben, wurde im Rahmen dieser Arbeit entschieden, dass die bakteriellen Kulturüberstände in der früheren stationären Phase des Bakterienwachstums gesammelt werden sollten.

Die Isolation sowie die nachfolgende Charakterisierung der BEVs orientierte sich an den Richtlinien, welche durch die ISEV (*International Society for Extracellular Vesicles*) in den MISEV (*Minimal information for studies of extracellular vesicles*) zusammengefasst wurden (Lötvall et al., 2014; Théry et al., 2018; Welsh et al., 2024). In einer Studie aus dem Jahr 2016, welche sich mit den weltweit genutzten Techniken zur Isolation und Charakterisierung von EVs auseinandersetzte, war die Ultrazentrifugation mit 81 % die am gängigsten genutzte Methode zur EV Isolation. Andere Methoden wie die SEC (15 %) oder Dichtegradientenzentrifugation (20 %) wurden hingegen seltener verwendet. Zusätzlich gaben 59 % an, verschiedene Kombinationen der genannten Techniken zur Isolation von EVs zu verwenden (Gardiner et al., 2016). Im Rahmen dieser Arbeit wurden die BEVs mittels Ultrazentrifugation isoliert sowie anschließend über eine SEC aufgereinigt, um die Reinheit der BEVs für nachfolgende Untersuchungen zu gewährleisten. Dieser Schritt war nötig, da während der Ultrazentrifugation nicht nur EVs, sondern auch andere Proteine pelletiert werden, welche u. a. zur Verfälschung bei der Bestimmung der Proteinkonzentration oder aber auch zu veränderten Effekten auf die Genexpression der Empfängerzellen führen können.

Im Rahmen der Charakterisierung der verschiedenen BEVs ließen sich gravierende Unterschiede erkennen. Dabei zeigte sich unter anderem, dass die Protein- und damit einhergehend auch die Partikelkonzentration von *L. casei* MVs deutlich höher war als die der *E. faecalis* MVs oder *P. mirabilis* OMVs. Ebenso waren die *L. casei* MVs im Vergleich zu den BEVs der beiden anderen Bakterien etwas größer. Dies könnte damit zusammenhängen, dass *L. casei* ein deutlich langsameres Wachstum als *E. faecalis* und *P. mirabilis* aufwies und die Bakterien durch die längere Kultivierungszeit mehr BEVs in das Kulturmedium sezernieren konnten. Zudem wurden die *L. casei* Bakterien in einem anderen Medium kultiviert, das einen Einfluss auf die Produktion und Größe der BEVs gehabt haben könnte. Darüber hinaus wurden auch die Isolationsbedingungen für die BEVs der drei unterschiedlichen Bakterien individuell angepasst, um eine möglichst hohe und reproduzierbare Ausbeute zu erzielen. Insgesamt konnte jedoch gezeigt werden, dass aus allen Bakterienkulturen erfolgreich BEVs isoliert werden konnten.

5.3 Zeit- und konzentrationsabhängige Internalisierung von BEVs in Caco-2 Zellen

Damit EVs einen Einfluss auf die Genexpression von Empfängerzellen haben können, müssen diese dazu in der Lage sein, mit den EVs zu interagieren bzw. sie zu internalisieren. In den letzten Jahren sind verschiedene Wege beschrieben worden, über die EVs von Empfängerzellen aufgenommen werden können. Es lassen sich Clathrin-abhängige Endozytose und Clathrin-unabhängige Wege unterscheiden. Zu den Clathrin-unabhängigen Wegen gehören neben der Caveolin- oder Lipid Rafts-vermittelten Endozytose auch die Phagozytose, Makropinozytose oder die Fusion mit der Zellmembran (Mulcahy et al., 2014). Während Phagozytose oftmals von spezialisierten Zellen wie etwa Makrophagen, Neutrophilen oder Monozyten genutzt wird, um EVs aufzunehmen (Doherty & McMahon, 2009), wird allgemein davon ausgegangen, dass die Endozytose der gängigste Weg ist, über den EVs in Empfängerzellen gelangen können (Mulcahy et al., 2014). Es konnte bereits gezeigt werden, dass Caco-2 Zellen, welche in dieser Arbeit als Modellzelllinie genutzt wurde, eukaryotische EVs über Endozytose aufnehmen können (Aqil et al., 2017; Wolf et al., 2015). Darüber hinaus gibt es Berichte, dass auch EVs bakteriellen Ursprungs über Endozytose in Caco-2 Zellen aufgenommen werden können (Bielaszewska et al., 2013; Cañas et al., 2016; Martin-Gallausiaux et al., 2020). Es ist also wahrscheinlich, dass auch die in der vorliegenden Arbeit untersuchten BEVs über Endozytose in die Caco-2 Zellen aufgenommen wurden.

Um den genauen Weg, über den die BEVs aufgenommen wurden, bestimmen zu können, könnten verschiedene Inhibitoren eingesetzt werden, welche spezifische Wege der Aufnahme blockieren (Mulcahy et al., 2014).

Die Aufnahme von EVs ist von einer Reihe verschiedener Faktoren wie z. B. die Temperatur abhängig. Verschiedene Arbeitsgruppen konnten so etwa beobachten, dass die Fähigkeit von Zellen EVs aufzunehmen, bei niedrigen Temperaturen rapide abnimmt (Albanese et al., 2021; Bonsergent et al., 2021; Escrevente et al., 2011). Darüber hinaus ist die Aufnahme von EVs sowohl zeit- als auch konzentrationsabhängig und kann je nach Zelltyp unterschiedlich schnell erfolgen (Feng et al., 2010; Mehanny et al., 2020; K. J. Svensson et al., 2013). Auch im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte bei allen untersuchten BEVs mit steigender Inkubationszeit und erhöhter Konzentration von BEVs/Zelle mehr Zellen detektiert werden, die die BEVs internalisiert haben. Es zeigten sich jedoch große Unterschiede hinsichtlich der Aufnahmerate der unterschiedlichen BEVs. Caco-2 Zellen, die mit den BEVs von *E. faecalis* oder *P. mirabilis* inkubiert wurden, zeigten bereits nach 12 h Inkubationszeit deutlich mehr Internalisierung der BEVs als im Vergleich zu den Zellen, die mit den MVs von *L. casei* inkubiert wurden. Diese Beobachtung war vor allem auffällig, da das Verhältnis von *L. casei* MVs/Zelle deutlich höher war als bei den anderen beiden BEVs. Bereits 1991 konnte beobachtet werden, dass *P. mirabilis* und *E. faecalis* dazu in der Lage sind sich an das Darmepithel zu haften, in dieses einzudringen und so auch in andere Organe oder den Blutkreislauf gelangen können (Wells et al., 1990; Wells & Erlandsen, 1991). Es ist somit wahrscheinlich, dass diese beiden Bakterien und damit möglicherweise auch die von ihnen sezernierten BEVs verschiedene Mechanismen oder Virulenzfaktoren besitzen, die ihre Internalisierung fördert.

BEVs enthalten eine Reihe von verschiedenen Pathogen-assoziierten molekularen Mustern (*Pathogen-associated molecular pattern*, PAMP) oder Mikroben-assoziierten molekularen Mustern (*Microbe-associated molecular pattern*, MAMP) wie z. B. LPS, Peptidoglykan oder Lipoproteine, welche die Interaktion der BEVs mit sogenannten „Mustererkennungsrezeptoren“ (*Pattern recognition receptor*, PRR) auf der Plasmamembran von Empfängerzellen ermöglichen (Chronopoulos & Kalluri, 2020). Einer dieser PRRs ist Toll-like Rezeptor 4 (*Toll-like receptor 4*, TLR4), der LPS, einen Bestandteil der äußeren Membran von Gram-negativen Bakterien, erkennen kann (Lu et al., 2008). Die Bindung von LPS an den Rezeptor erfolgt dabei nicht alleine, sondern benötigt die Anwesenheit des Adapterproteins *Myeloid differentiation factor-2* (MD-2) (Shimazu et al., 1999). Infolgedessen kommt es zum Auslösen von *Myeloid differentiation primary response 88* (MyD88)-abhängigen und -unabhängigen Signalkaskaden sowie zur Endozytose des LPS/TLR4/MD-2 Komplexes in Abhängigkeit von CD14 (*Cluster of Differentiation 14*) (Z. Jiang et al., 2005; Takeda & Akira, 2004; Zanoni et al., 2011). Die Anwesenheit von LPS bei dem

Gram-negativen Bakterium *P. mirabilis* und dessen OMVs wurde in der Vergangenheit bereits beschrieben (Rózalski et al., 1997; Szczerbiec et al., 2024; T. Wang et al., 2022). Darüber hinaus ist bekannt, dass intestinale Epithelzellen, wie Caco-2, TLR4 und CD14 exprimieren (Funda et al., 2001; Furrie et al., 2005). Auch im Rahmen dieser Arbeit konnte eine erhöhte Endotoxinkonzentration in den OMVs gemessen werden. Es wäre demzufolge möglich, dass auch das LPS in der Membran die Internalisierung der *P. mirabilis* OMVs in die Caco-2 Zellen gefördert hat. Darüber hinaus ist *P. mirabilis* auch noch in der Lage, weitere Virulenzfaktoren wie Proteasen oder Hämolysin zu produzieren. Bei Hämolysin handelt es sich um ein zytolytisches Protein, welches bei der Invasion des Wirtes beteiligt ist (Chakkour et al., 2024). Aktuell lassen sich jedoch keine Studien dazu finden, ob es auch in den OMVs von *P. mirabilis* transportiert wird.

Neben TLR4 gibt es noch weitere PRRs wie z. B. TLR2. Anders als andere Mitglieder der Familie ist TLR2 dazu in der Lage Heterodimere mit anderen TLRs auszubilden (Farhat et al., 2008; Nagashima et al., 2015; Y. Wang et al., 2014). Über das TLR2/TLR6 Heterodimer können u. a. Lipoteichonsäuren (*Lipoteichoic acid*, LTA), welche Bestandteile der Membran von Gram-positiven Bakterien sind, erkannt werden (Colleselli et al., 2023). Die Bindung des Liganden an den Rezeptor wird von CD14 sowie abhängig vom Liganden durch CD36 (*Cluster of Differentiation 36*) vermittelt (Hoebe et al., 2005; Jimenez-Dalmaroni et al., 2009; Nilsen et al., 2008) Infolgedessen kommt es zur Aktivierung von MyD88-abhängigen Signalwegen und zur Endozytose des Komplexes (Jimenez-Dalmaroni et al., 2009; Nilsen et al., 2008; Takeda & Akira, 2004). Die Expression von TLR2 sowie CD36 wurde ebenfalls schon bei Caco-2 Zellen beschrieben (Furrie et al., 2005; Puig et al., 2015). Da es sich bei *L. casei* und *E. faecalis* um Gram-positive Bakterien handelt, in deren Zellwand ebenfalls LTAs nachgewiesen werden können (D. Lin et al., 2018; Nakano & Fischer, 1978), ist es möglich, dass die MVs der beiden Bakterien auch über die Interaktion mit TLR2 internalisiert worden sind. Die Unterschiede hinsichtlich der Aufnahmerate der MVs könnte mit anderen Faktoren zusammenhängen. So sind in der Peptidoglykan-Schicht von *E. faecalis* u. a. eine große Anzahl verschiedener Polysaccharide lokalisiert, die eine wichtige Rolle bei der Kolonisation und Penetration von intestinalen Epithelzellen spielen (Ramos et al., 2019; Rigottier-Gois et al., 2015; J. Zeng et al., 2004). Darüber hinaus wurde bereits 1994 von Olmsted et al. ein Plasmid-kodiertes Oberflächenprotein beschrieben, welches die Internalisierung von *E. faecalis* in Darmepithelzellen fördert (Olmsted et al., 1994). Diese sogenannte „*Aggregration substance*“ spielt, wie später herausgefunden wurde, mit Cofaktoren wie z. B. LTA eine zentrale Rolle bei der Internalisierung des Bakteriums (Waters et al., 2003, 2004). Da die Zusammensetzung der Membran auch die Zusammensetzung der BEVs widerspiegelt, besteht die Wahrscheinlichkeit, dass diese spezifischen Polysaccharide und die „*Aggregation substance*“ ebenfalls in der Membran der *E. faecalis* MVs enthalten sind.

Zusammenfassend lässt sich daraus schließen, dass sowohl *P. mirabilis* als auch *E. faecalis* verschiedene Virulenzfaktoren besitzen, die die Aufnahme der von ihnen sezernierten BEVs im Vergleich zu den *L. casei* MVs gefördert haben könnten.

5.4 BEVs beherbergen unterschiedliche RNA-Spezies

BEVs können eine Vielzahl von verschiedenen RNA-Molekülen wie sRNAs, mRNAs, tRNAs aber auch rRNAs transportieren (Blenkiron et al., 2016; J. W. Choi et al., 2017; Ghosal et al., 2015; Joshi et al., 2021; Malabirade et al., 2018; Sjöström et al., 2015). In den letzten Jahren konnte gezeigt werden, dass mit BEVs assoziierte sRNAs die Genexpression und damit Sekretion von Zytokinen in Empfängerzellen regulieren können (J. W. Choi et al., 2017; Koeppen et al., 2016; H. Zhang et al., 2020). Ein Ziel der vorliegenden Arbeit war daher, die mit den BEVs von *L. casei*, *E. faecalis* und *P. mirabilis* assoziierten RNAs und deren Effekte auf das Transkriptom von Darmepithelzellen zu analysieren.

Im Rahmen der quantitativen Analyse der RNA aus den verschiedenen BEVs zeigte sich, dass *L. casei* MVs die höchste RNA-Konzentration, gefolgt von *E. faecalis* MVs und zuletzt *P. mirabilis* OMVs aufwiesen. Dies war zu erwarten, da die Partikelkonzentration von *L. casei* MVs im Vergleich zu den anderen deutlich höher war. Um die tatsächlichen RNA Mengen miteinander vergleichen zu können, wurden daher im Folgenden die Menge RNA in 5×10^{10} Partikeln berechnet. Dabei zeigte sich, dass sowohl mit *L. casei* MVs als auch *E. faecalis* MVs eine sehr ähnliche Menge RNA assoziiert war, während die RNA-Menge in den *P. mirabilis* OMVs signifikant niedriger war. Ein möglicher Grund dafür könnte mit dem jeweiligen Ursprung der BEVs zusammenhängen. Wie bereits beschrieben handelt es sich bei *L. casei* und *E. faecalis* um Gram-positive Bakterien, wohingegen *P. mirabilis* ein Gram-negatives Bakterium ist. Lange Zeit wurde davon ausgegangen, dass Gram-negative Bakterien lediglich OMVs produzieren, die aus der äußeren Membran der Bakterien hervorgehen. Die ersten Beobachtungen, dass RNA und DNA in BEVs von Gram-negativen Bakterien gefunden werden können, gehen bis in das Jahr 1989 zurück (Dorward et al., 1989; Dorward & Garon, 1989, 1990; Kadurugamuwa & Beveridge, 1995). Zum Zeitpunkt der Entdeckung, dass Nukleinsäuren in Gram-negativen BEVs zu finden sind, gab es noch keine Erklärung, wie diese durch die innere Membran gelangen konnte. Daher wurde von Kadurugamuwa und Beveridge ein Modell vorgeschlagen, welches die Sekretion einer anderen Art von BEVs bei Gram-negative Bakterien beschrieb. In ihrem Modell kommt es durch sogenannte Autolysine zur Schwächung der Peptidoglykan-Schicht, wodurch die innere Membran in das Periplasma hineinragen kann und zytoplasmatische Bestandteile wie RNA und DNA in die entstehenden Vesikel eindringen können. Am Ende kommt es dann zur

Abschnürung der Vesikel, die sowohl eine innere als auch äußere Membran besitzen, von der Zelloberfläche (Kadurugamuwa & Beveridge, 1995). Die erste experimentelle Bestätigung von Gram-negativen BEVs, wie sowohl eine äußere als auch innere Membran besitzen, erfolgte erst viele Jahre später (Pérez-Cruz et al., 2013). Die Sekretion dieser sogenannte OIMVs konnte bereits bei verschiedenen Bakterien beobachtet werden. Dabei war der Anteil der OIMVs an den gesamten sezernierten BEVs in Abhängigkeit von den jeweils untersuchten Bakterien sehr unterschiedlich und reichte von 0,1 % bis hin zu 49 % (Hagemann et al., 2014; Pérez-Cruz et al., 2013, 2015). In Bezug auf die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit ist es möglich, dass aus den *P. mirabilis* Kulturüberständen sowohl OMVs als auch OIMVs isoliert wurden. Zwar waren im Kryo-TEM keine BEVs sichtbar, die eine doppelte Lipidmembran besaßen, dies muss jedoch nicht bedeuten, dass keine OIMVs in den Proben vorhanden waren. Die Tatsache, dass sie nicht gefunden wurden, hing möglicherweise mit der niedrigen Partikelkonzentration zusammen. Vor dem Hintergrund, dass die RNA möglicherweise nur von OIMVs transportiert wird, würde dies auch erklären, warum die gemessene RNA-Konzentration deutlich geringer war, obwohl sich die Partikelkonzentration verglichen mit *E. faecalis* MVs nicht sehr stark unterschied.

Weiterhin wurde die RNA nicht nur quantitativ, sondern auch qualitativ untersucht. Dabei zeigten sich deutliche Unterschiede hinsichtlich der RNA-Fragmente, welche mit den verschiedenen BEVs assoziiert waren. Allen gemeinsam war jedoch, dass ein großer Anteil der unterschiedlichen RNA-Fragmente sRNAs mit einer Länge unter 200 nt waren. Wie eukaryotische miRNAs besitzen auch bakterielle sRNAs eine regulatorische Funktion. So konnte gezeigt werden, dass z. B. die *micF* RNA von *E. coli* die Produktion des Proteins OmpF inhibieren kann (Delihas & Forst, 2001). Es ist daher auch nicht verwunderlich, dass die sRNAs in BEVs sezerniert werden, um so mit anderen bakteriellen, aber auch humanen Zellen kommunizieren zu können (H.-J. Lee, 2019). Welche Fragmente genau in die BEVs verpackt werden, scheint allerdings kein zufälliger Prozess zu sein. So konnte in einer Studie aus dem Jahr 2018 gezeigt werden, dass sich die RNA-Profile von OMVs, die aus Kulturüberständen von *Salmonella enterica* Servor Typhimurium isoliert wurden, in Abhängigkeit von Kultivierungsbedingungen unterschieden (Malabirade et al., 2018). Der Mechanismus mit Hilfe dessen die Sortierung der RNAs in BEVs erfolgt, ist nach aktuellem Stand der Forschung noch nicht vollständig aufgeklärt. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit haben jedoch gezeigt, dass in BEVs von *L. casei*, *E. faecalis* und *P. mirabilis* sRNAs zu finden sind, die potenziell regulatorische Funktionen in Empfängerzellen ausüben könnten.

5.5 BEVs und BEV-RNA haben keinen negativen Effekt auf die Viabilität von Caco-2 Zellen

BEVs können unterschiedliche Effekte auf Empfängerzellen ausüben. Im Rahmen von Viabilitätsassays konnte z. B. festgestellt werden, dass höheren Konzentrationen von MVs, die von *Listeria monocytogenes* produziert werden, einen negativen Effekt auf die Viabilität von Caco-2 Zellen ausüben (Karthikeyan et al., 2019). Um zu überprüfen, ob die BEVs, welche im Rahmen der vorliegenden Arbeit analysiert wurden, ab einer bestimmten Konzentration ebenfalls zytotoxische Effekte auf die Caco-2 Zellen ausüben würde, wurde die Viabilität der Zellen untersucht. Dies war vor allem auch in Bezug auf eine nachfolgende Analyse wichtig, da bei eventuell auftretenden toxischen Effekten die Konzentration bzw. Inkubationszeit der BEVs angepasst werden müsste.

Die Analyse der Viabilität der Caco-2 Zellen nach Inkubation mit unterschiedlichen Konzentrationen der drei BEVs hat ergeben, dass keine der getesteten Konzentrationen einen negativen Effekt auf die Viabilität der Zellen ausübte. Tatsächlich konnte bei den Caco-2 Zellen, die mit den MVs von *L. casei* inkubiert wurden, sogar ein positiver Effekt auf die Viabilität gemessen werden. Ein ähnlicher Effekt konnte bereits bei einer Reihe anderer BEVs auf ihre Empfängerzellen beobachtet werden (Goes et al., 2020; Mehanny et al., 2020; Schulz et al., 2018). In einer der Studien wurde die Hypothese geäußert, dass die erhöhte Viabilität eine Folge der Bereitstellung von Nährstoffen durch die BEVs sein könnte (Goes et al., 2020). In einer anderen Studie, die ebenfalls die Viabilität von Caco-2 Zellen nach Inkubation mit MVs von *L. casei* untersucht haben, konnte dieser Effekt hingegen nicht beobachtet werden (Kuhn et al., 2020). Im Gegensatz zur vorliegenden Arbeit wurde in dieser Studie die Viabilität jedoch nach 24 h und nicht nach 48 h Inkubation gemessen. Es besteht also die Möglichkeit, dass der hier beobachtete Effekt eventuell erst nach 48 h Inkubation der Caco-2 Zellen mit den *L. casei* MVs messbar ist.

Ebenso wie nach der Inkubation der Caco-2 Zellen mit den BEVs konnte auch nach der Transfektion der BEV-RNA kein negativer Effekt auf die Viabilität der Zellen beobachtet werden. Im Gegensatz zu den MVs von *L. casei* konnte jedoch bei der Transfektion der *L. casei* MV-RNA kein Anstieg der Viabilität beobachtet werden. Dies könnte bedeuten, dass der positive Effekt der *L. casei* MVs auf die Viabilität der Caco-2 Zellen nicht durch die RNA, welche mit den MVs von *L. casei* assoziiert ist, ausgelöst wird.

5.6 BEVs und BEV-RNA führen zu Veränderungen der Genexpression in Caco-2 Zellen

Die Kommunikation von Bakterien und Darmepithelzellen stellt einen wichtigen Aspekt zur Aufrechterhaltung der intestinalen Homöostase dar. Kommt es zur Störung dieses Gleichgewichts, kann dies wiederum die Entstehung von verschiedenen Erkrankungen begünstigen (Ohland & Jobin, 2015). Auch bei M. Parkinson kommt es zur Dysbiose des Darmmikrobioms und somit zur Störung der intestinalen Homöostase (Y. Huang et al., 2021). In den letzten Jahren wurde zunehmend die Rolle von BEVs im Rahmen von verschiedenen Erkrankungen diskutiert (Amatya et al., 2021; Iyaswamy et al., 2023; Q. Shen et al., 2022). Daraus ergibt sich die Frage, ob sie auch bei M. Parkinson eine Rolle spielen. Ein Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher zu untersuchen, welchen Einfluss unterschiedliche BEVs und die mit ihnen assoziierte RNA auf die Genexpression von Darmepithelzellen haben und ob die ausgelösten Veränderungen möglicherweise im Bezug zu M. Parkinson stehen.
Nach Inkubation der Caco-2 Zellen mit BEVs oder Transfektion mit der BEV-RNA der drei unterschiedlichen Bakterien konnte eine Reihe von Genen identifiziert werden, die eine veränderte Expression aufwiesen. Bei genauer Betrachtung der Anzahl der differentiell exprimierten Gene nach Inkubation mit den MVs bzw. nach Transfektion der Zellen mit der MV-RNA von *L. casei* konnte die größte Anzahl veränderter Gene nach 24 h identifiziert werden. Nach 48 h zeigte sich hingegen in beiden Fällen eine deutlich geringere Anzahl der Gene, die eine veränderte Expression aufwiesen. Die Untersuchung zur Internalisierung der *L. casei* MVs in Caco-2 Zellen haben gezeigt, dass nach 24 h etwa 61,7 % und nach 48 h ungefähr 82,1 % der Zellen die MVs aufgenommen haben. Dies könnte einen ersten Hinweis darauf liefern, dass es trotz der kontinuierlichen Aufnahme weiterer *L. casei* MVs zu einer Abschwächung der zellulären Reaktion kam. Nach Inkubation der Caco-2 Zellen mit den MVs von *E. faecalis* konnten mehr differentiell exprimierte Gene nach 24 h Inkubation detektiert werden. Im Vergleich dazu sind in Zellen, die mit der *E. faecalis* MV-RNA transfiziert wurden, nach 10 h eine größere Anzahl differentiell exprimierter Gene identifiziert worden. Dies könnte ebenfalls erste Hinweise darauf liefern, dass die *E. faecalis* MV-RNA dazu in der Lage ist, deutliche Veränderungen in der Genexpression der Caco-2 Zellen hervorzurufen. Im Gegensatz dazu konnten sowohl nach Inkubation als auch nach Transfektion der Caco-2 Zellen mit den OMVs oder der OMV-RNA von *P. mirabilis* nach 24 h mehr Gene detektiert werden, die eine veränderte Expression aufwiesen. Alle Vergleiche hatten jedoch gemeinsam, dass die auftretenden Veränderungen spezifisch für den jeweiligen Zeitpunkt oder die Behandlung waren, da die Mehrheit der gefundenen Gene in nur einer Bedingung dereguliert vorlagen.

Da im Darm von Parkinson-Patienten oftmals Entzündungsprozesse und eine erhöhte Permeabilität der Darmbarriere beobachtet werden (Yang et al., 2022), wurde im Folgenden die Auswertung der differentiell exprimierten Gene vor allem auf Veränderungen in diesen Prozessen fokussiert.

5.6.1 Veränderungen der Expression inflammationsassoziierter Gene

Bei Patienten mit M. Parkinson kommt es im Darm zur veränderten Genexpression, in deren Folge eine erhöhte Expression von proinflammatorischen Zytokinen und Chemokinen beobachtet werden kann (Xiromerisiou et al., 2023). Zytokine agieren als Signalmoleküle und sind in der Lage, die Immunantwort und Entzündungsprozesse zu regulieren. Sie können in verschiedene Gruppen, zu denen u. a. Tumornekrosefaktoren (*Tumor necrosis factor*, TNF), Kolonie-stimulierende Faktoren (*Colony stimulating factor*, CSF), Interferone (IFN) oder Interleukine (IL) gehören, unterteilt werden (C. Liu et al., 2021). Chemokine sind eine spezielle Gruppe von chemotaktischen Zytokinen, die die Migration von Immunzellen stimulieren können und so eine wichtige Rolle bei der Immunantwort spielen. Sie lassen sich ebenfalls in verschiedene Subfamilien einteilen, wobei die Einteilung auf der Position der strukturell wichtigen Cysteinreste im reifen Protein basiert. Es wird zwischen CC-, CXC-, CX3C- und XC-Chemokine unterschieden (Sokol & Luster, 2015).

In verschiedenen Studien konnte in Darmbiopsien von Parkinson-Patienten eine erhöhte Expression von Genen wie *TNF-α*, *IFN-γ*, *IL-1β*, *IL-17A*, *IL-6*, *IL-8* (auch bekannt als *CXCL8*), *CCL2*, *CCL5* sowie dem Chemokinrezeptor *CCR5* gezeigt werden (Devos et al., 2013; Perez-Pardo et al., 2019). Auch im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte eine deregulierte Expression von Zytokinen und Chemokinen beobachtet werden. Nach Inkubation der Caco-2 Zellen mit den *L. casei* MVs wurde eine erhöhte Expression von *CXCL8* (*IL-8*) nach 10 h und 24 h gezeigt. Dazu passend konnte in einer Studie aus dem Jahr 2020 auch eine erhöhte Sekretion von IL-8 durch Caco-2 Zellen, die mit *L. casei* MVs inkubiert wurden, beobachtet werden (Kuhn et al., 2020). Weiterhin konnte in der vorliegenden Arbeit auch eine erhöhte Expression von *CCL2* nach 10 h und *IL-6* nach 24 h beobachtet werden. Für *IL-1β* (*IL-1B*) konnte nach 24 h zunächst eine verringerte und nach 48 h dann ebenfalls eine erhöhte Expression detektiert werden. Zusätzlich zeigten sich bei Inkubation der Zellen mit den *L. casei* MVs noch weitere Veränderungen in anderen Zytokinen und Chemokinen. So konnte nach 10 h z. B. eine erhöhte Expression von *CCL15*, *CCL22*, *CXCL5* und *CXCL11*, sowie nach 24 h und 48 h eine erhöhte Expression von *CCL20* detektiert werden, was einen Einfluss auf die Migration von Immunzellen haben könnte (Sokol & Luster, 2015). Bei CXCL11 handelt es sich um ein Chemokin, dem pro-inflammatorische Eigenschaften zugeschrieben werden (Callahan

et al., 2021; Z. Liu et al., 2011). Nach 24 h konnte hingegen eine verringerte Expression von *CXCL11* beobachtet werden. Dies könnte möglicherweise ein Mechanismus sein, um eine exzessive Immunantwort zu unterbinden. Darüber hinaus zeigte *IL-37* nach 10 h und 24 h eine erhöhte Expression. IL-37 gehört zu den anti-inflammatorischen Zytokinen mit der Fähigkeit, die Immunantwort in intestinalen Epithelzellen zu unterdrücken (Allaire et al., 2021). In einer Studie von Vargoorani et al. konnte beobachtet werden, dass nach Inkubation von Caco-2 Zellen mit *L. casei* MVs die Expression des Gens *TLR9* verringert war. Darüber hinaus zeigten die Autoren mit Hilfe eines ELISA (*Enzyme-linked Immunosorbent Assay*), dass nach Inkubation mit den MVs über Nacht ein erhöhtes Level von IL-4, IL-6 und IL-10 sowie ein verringertes Level von IL-1β, IL-2 und IFN-γ im Überstand gemessen werden konnte (Vargoorani et al., 2020). Eine verringerte Expression von *IL-1β* und eine erhöhte Expression von *IL-6* konnte wie bereits beschrieben in der vorliegenden Arbeit ebenfalls nach 24 h beobachtet werden, wobei jedoch keine Veränderungen in der Expression von *IL-10*, *IL-2* oder *IFN-γ* nach Inkubation der Caco-2 Zellen mit den *L. casei* MVs detektiert werden konnten. Dies könnte unter anderem damit zusammenhängen, dass anders als in dieser Arbeit in der oben genannten Studie von Vargoorani et al. die isolierten MVs keiner zusätzlichen Aufreinigung mittels SEC unterzogen wurden. Es könnte demzufolge sein, dass noch weitere pelletierte Proteine zum beobachteten Effekt in der oben genannten Studie beigetragen haben. Zudem wurde keine verringerte Expression von *TLR9* jedoch aber von *TLR6* nach 24 h Inkubation mit den MVs beobachtet. Über das TLR2/TLR6 Heterodimer können wie bereits beschrieben LTA erkannt werden (Colleselli et al., 2023). Eine verringerte Expression dieses Gens könnte möglicherweise ein Mechanismus sein, damit eine Immunantwort der Caco-2 Zellen durch eine verminderte Erkennung und Aufnahme der MVs der Gram-positiven Bakterien unterdrückt wird. Darüber hinaus konnte im Rahmen der vorliegenden Arbeit auch eine erhöhte Expression von *TLR3*, *TLR7* sowie *TLR8* nach Inkubation mit den *L. casei* MVs für 24 h detektiert werden. TLR3 ist in der Lage, virale dsRNA und TLR7 sowie TLR8 virale ssRNA zu erkennen (Hornung et al., 2008; Takeda & Akira, 2004). In Studien aus den Jahren 2017 und 2018 konnte gezeigt werden, dass die drei TLRs auch bakterielle RNA erkennen können (Campos et al., 2017; Ugolini et al., 2018). Da die vorherigen Analysen der vorliegenden Arbeit gezeigt haben, dass die MVs von *L. casei* RNAs transportieren, könnte es demzufolge sein, dass durch die Anwesenheit der bakteriellen RNA die Expression der drei TLRs erhöht wurde.

Neben den Effekten der *L. casei* MVs wurde in dieser Arbeit auch der Effekt der *L. casei* MV-RNA auf das Transkriptom der Caco-2 Zellen untersucht. Dabei war vor allem nach 24 h auffällig, dass eine Reihe von Genen verändert war, die mit ähnlichen biologischen Prozessen assoziiert sind, bei denen auch nach Inkubation mit den MVs eine Anreicherung beobachtet werden konnte. Dahingehend konnten auch Ähnlichkeiten in der Expression einzelner Gene beobachtet werden. So konnte z. B. ebenfalls eine erhöhte Expression von *CCL15* nach 10 h

sowie eine verringerte Expression von *CXCL11* nach 24 h detektiert werden. Darüber hinaus zeigten sich auch Unterschiede, wie etwa eine verringerte Expression von *CCL2* nach 10 h oder von *CCL20* nach 24 h, wohingegen die Expression dieser Gene nach 10 h, 24 h oder 48 h Inkubation mit den *L. casei* MVs erhöht war. Zudem konnte eine erhöhte Expression von *IL-4* nach 10 h Transfektion der Zellen mit der *L. casei* MV-RNA beobachtet werden. Ein erhöhtes Level von IL-4 im Überstand von Caco-2 Zellen, die mit MVs von *L. casei* inkubiert wurden, konnte bereits in der oben genannten Studie aus dem Jahr 2020 beobachtet werden (Vargoorani et al., 2020). Interessanterweise konnte nach Transfektion der *L. casei* MV-RNA keine erhöhte Expression von TLR3, TLR7 oder TLR8, welche nach Inkubation der Zellen mit den MVs beobachtet werden konnte, detektiert werden. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass möglicherweise weitere Faktoren als nur die bakterielle RNA an der veränderten Expression dieser Gene beteiligt sind.

Die Sekretion von MVs durch *E. faecalis* ist erst vor einigen Jahren beschrieben worden (Afonina et al., 2021). Seither wurden nur wenige Berichte über den Effekt der *E. faecalis* MVs auf unterschiedliche Empfängerzellen, die sich zudem lediglich auf Immunzellen beziehen, veröffentlicht (Afonina et al., 2021; R. Y. Ma et al., 2024; Niu et al., 2024). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte ähnlich wie bei der Inkubation der Caco-2 Zellen mit den *L. casei* MVs eine erhöhte Expression von *CXCL8* und *IL-37* nach 10 h beobachtet werden. Zudem war die Expression von *IL-6* verringert. Die erhöhte Expression von *CXCL8* könnte möglicherweise der Aktivierung der Migration von Immunzellen dienen (Sokol & Luster, 2015), während die erhöhte Expression des anti-inflammatorischen *IL-37* (Allaire et al., 2021) und die verringerte Expression des pro-inflammatorischen *IL-6* (L. Wang et al., 2003) das übermäßige Aktivieren einer Immunantwort unterbindet. In einer Studie aus dem Jahr 2024 konnte gezeigt werden, dass *E. faecalis* MVs bei Makrophagen eine erhöhte Sekretion von IL-6 induzieren (Niu et al., 2024). Es ist somit möglich, dass MVs in Abhängigkeit von den Empfängerzellen unterschiedliche Effekte ausüben können. Nach 24 h zeigte wiederum *IL-17C* eine erhöhte Expression. Dabei handelt es sich um ein Mitglied der IL-17 Zytokin-Familie, welches die Expression weiterer pro-inflammatorischer Zytokine und Chemokine stimulieren kann (Ramirez-Carrozzi et al., 2011). Ebenso war auch die Expression von *IL-27*, welches sowohl pro- als auch anti-inflammatorische Fähigkeiten aufweist (W.-D. Xu et al., 2024), erhöht. Gleichzeitig konnte nach 24 h Inkubation der Caco-2 Zellen mit den *E. faecalis* MVs jedoch auch eine verringerte Expression des Chemokinrezeptors *CXCR3* sowie dessen Ligand *CXCL11* (Lacotte et al., 2009) detektiert werden, wobei es sich um einen Mechanismus zur Unterdrückung einer übermäßigen Immunantwort handeln könnte.

Im Gegensatz dazu zeigten sich vor allem nach 10 h Transfektion der Caco-2 Zellen mit der *E. faecalis* MV-RNA deutliche Veränderungen in der Expression von Zytokinen und Chemokinen. Die erhöhte Expression von verschiedenen Chemokinen wie *CCL17*, *CCL5*,

CXCL1, *CXCL17*, und *CXCL3* könnte wiederum zur Aktivierung der Migration von Immunzellen führen (Sokol & Luster, 2015). Daneben wurde eine verringerte Expression von weiteren Chemokinen und Zytokinen wie etwa *CXCL11* und *IL-1β*, denen pro-inflammatorische Eigenschaften zugeschrieben werden (Callahan et al., 2021; Coccia et al., 2012; Z. Liu et al., 2011), beobachtet, die darauf schließen lassen, dass gleichzeitig Mechanismen in den Caco-2 Zellen ausgelöst wurden, die eine übermäßige Immunantwort unterdrücken sollten. Darüber hinaus war auch die Expression von *TLR3* nach Transfektion mit der *E. faecalis* MV-RNA erhöht. Es bereits erwähnt wäre es möglich, dass durch die Transfektion der Caco-2 Zellen mit der *E. faecalis* MV-RNA die Expression von *TLR3* gesteigert wurde, damit dieser wiederum zur Erkennung bakterieller RNA beitragen kann.

Nach der Inkubation der Caco-2 Zellen mit den OMVs von *P. mirabilis* konnte nach 10 h eine erhöhte Expression von verschiedenen Chemokinen beobachtet werden. Darunter befanden sich vor allem Chemokine mit pro-inflammatorischen Eigenschaften wie CXCL5, CXCL8, CXCL10 und CXCL11 (Callahan et al., 2021; Z. Liu et al., 2011; Pande et al., 2021; Zhu et al., 2021). Darüber hinaus zeigten einige dieser Gene auch nach 24 h eine erhöhte Expression, was darauf hinweist, dass über einen längeren Zeitraum Chemokine vermehrt exprimiert werden, die die Migration von Immunzellen beeinflussen können (Sokol & Luster, 2015). Darüber hinaus konnte sowohl nach 10 h als auch nach 24 h eine erhöhte Expression von *TLR7* sowie nach 24 h von *TLR3* detektiert werden. Eine erhöhte Expression dieser beiden Gene, welche wie bereits erwähnt in der Lage, sind bakterielle RNA zu erkennen (Campos et al., 2017), konnte auch nach Inkubation der Zellen mit den *L. casei* MVs beobachtet werden. Es könnte wiederum vermutet werden, dass die bakterielle RNA, welche mit den OMVs assoziiert ist, die erhöhte Expression von *TLR3* und *TLR7* hervorgerufen hat. Eine andere Studie zeigte, dass die Expression von *TLR7* in dendritischen Zellen durch die Bindung von LPS an TLR4 gesteigert werden kann (Lombardi et al., 2009). Da im Rahmen der vorliegenden Arbeit gezeigt werden konnte, dass die *P. mirabilis* OMVs ebenfalls eine erhöhte LPS-Konzentration aufweisen, könnte es sein, dass dadurch die Expression von *TLR7* induziert wurde.

Die Transfektion der OMV-RNA von *P. mirabilis* hatte nach 10 h zunächst keine signifikante Anreicherung von Prozessen zur Folge, die mit einer veränderten Immunantwort verbunden waren. Trotzdem konnten einige Gene wie *CXCL5* und *IL-1β* detektiert werden, deren Expression nach 10 h zunächst verringert war. Im Gegensatz dazu zeigten *CXCL5* sowie *CCL2* und *IL-6* nach 24 h eine erhöhte Expression, was darauf hindeutet, dass auch die *P. mirabilis* OMV-RNA allein dazu in der Lage war, die Expression von Zytokinen und Chemokinen zu beeinflussen, was wiederum die Migration von Immunzellen zur Folge haben könnte (Sokol & Luster, 2015).

Zusammenfassend zeigte Analyse des Transkriptoms der Caco-2 Zellen nach Inkubation mit verschiedenen BEVs oder Transfektion mit BEV-RNA, dass sowohl die BEVs als auch die BEV-RNA allein in der Lage ist, spezifische Veränderungen in der Genexpression hervorzurufen. Darüber hinaus war zu beobachten, dass die BEVs der drei unterschiedlichen Bakterien jeweils einen unterschiedlichen Effekt auf die Darmepithelzellen ausgeübt haben.

5.6.2 Veränderungen der Expression von Genen der intestinalen Barriere

Eine wichtige Funktion der Darmepithelzellen ist es, das Eindringen von Pathogenen zu verhindern (Garcia-Hernandez et al., 2017). Um dies zu gewährleisten, sind die Zellen eng über *Tight junctions* (TJs) miteinander verbunden. Es handelt sich dabei um Zell-Zell-Verbindungen, die aus Transmembranproteinen und zytoplasmatischen Proteinen aufgebaut sind. Zu den Transmembranproteinen gehören u. a. *TJ-associated MARVEL proteins* (TAMPs) wie Occludin oder Tricellulin, *junctional adhesion molecules* (JAMs) sowie die Familie der Claudine. Die zytoplasmatischen Adaptorproteine umfassen z. B. *Zonula occludens* (ZO) Proteine, Cingulin oder die *membrane-associated guanylate kinase inverted* (MAGI) (Garcia-Hernandez et al., 2017; Zihni et al., 2016).

Bei Parkinson-Patienten kommt es oftmals zum Verlust der Barrierefunktion, wodurch bakterielle Produkte in den Blutstrom und ins Gehirn gelangen können (van IJzendoorn & Derkinderen, 2019). In diesem Zusammenhang konnte im Darm von Patienten mit M. Parkinson eine veränderte Expression oder Lokalisation von Occludin und ZO-1 beobachtet werden (Clairembault et al., 2015; Perez-Pardo et al., 2019). In einer Studie aus dem Jahr 2020 konnte darüber hinaus gezeigt werden, dass im Darm von Ratten, bei denen durch die Injektion von 6-Hydroxydopamin (6-OHDA) die Degeneration von dopaminergen Neuronen ausgelöst wurde, eine verringerte Expression von Claudin-1 zu beobachten war (Pellegrini et al., 2020). Ebenso wurde auch in Darmbiopsien von Parkinson-Patienten weniger Claudin-1 gefunden (Bellini et al., 2023). Claudine besitzen eine Schlüsselrolle bei der Regulation der Permeabilität der TJs und lassen sich in die Barriere-bildenden (*tight*) und Poren-formenden (*leaky*) Claudine unterteilen (Garcia-Hernandez et al., 2017). Auch in dieser Arbeit wurde eine veränderte Expression von verschiedenen Mitgliedern der Familie der Claudine beobachtet. Nach Inkubation der Caco-2 Zellen mit *L. casei* MVs konnte nach 10 h zunächst eine verringerte Expression von *CLDN10* detektiert werden. In einer Studie aus dem Jahr 2023 konnte gezeigt werden, dass durch die verminderte Expression von *CLDN10* das Eindringen von Bakterien in Kolonkarzinomzellen gefördert wurde (Y. Zhang et al., 2023).

Es könnte somit sein, dass die verringerte Expression von *CLDN10*, welche im Rahmen der vorliegenden Arbeit beobachtet wurde, einen Mechanismus darstellt, der das Eindringen der *L. casei* MVs in die Epithelzellen erleichtern könnte. Weiterhin konnte nach 24 h bzw. 48 h eine verringerte Expression von *CLDN6*, *CLDN11, CLDN14* und *CLDN18* beobachtet werden, welche zu den Barriere-bildenden Claudinen gehören (Garcia-Hernandez et al., 2017; Günzel & Fromm, 2012). Darüber hinaus kann IL-1β, dessen Expression wie im vorherigen Abschnitt beschrieben nach 24 h zunächst verringert und nach 48 h erhöht war, ebenfalls die Permeabilität von TJs in Caco-2 Zellen erhöhen (Al-Sadi & Ma, 2007). Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass es durch die Inkubation der Caco-2 Zellen mit den MVs möglicherweise zur Erhöhung der TJ Permeabilität gekommen sein könnte. Im Einklang mit dieser Aussage konnte in einer Studie aus dem Jahr 2020 gezeigt werden, dass nach Inkubation von Caco-2 Zellen mit *L. casei* MVs innerhalb der ersten 6 h eine deutliche Reduktion des transepithelialen elektrischen Widerstands (*transepithelial electrical resistance*, TEER) beobachtet werden kann (Kuhn et al., 2020). Der TEER-Wert lässt wiederum Rückschlüsse auf die Integrität der zellulären Barriere zu (Srinivasan et al., 2015). Im Gegensatz dazu wurde nach Transfektion der Caco-2 Zellen mit der *L. casei* MV-RNA eine erhöhte Expression von *CLDN6* und *CLDN14* detektiert. Es ist somit wahrscheinlich, dass die verringerte Expression durch andere Komponenten der MVs und nicht durch die transportierten RNA hervorgerufen wurde. In der Vergangenheit wurde bereits gezeigt, dass die Administration von *L. casei* eine Erhöhung der Expression von Claudin-1 im Rahmen von Erkrankungs- oder Infektionsmodellen zur Folge hatte (Dou et al., 2021; Tian et al., 2023). Eine veränderte Expression von Claudin-1 konnte im Rahmen dieser Arbeit jedoch weder nach Inkubation der Caco-2 Zellen mit den MVs noch nach Transfektion der MV-RNA beobachtet werden. Es ist somit möglich, dass sowohl *L. casei* Bakterien als auch die von ihnen sezernierten MVs und die darin enthaltene MV-RNA jeweils unterschiedliche Effekten in Empfängerzellen hervorrufen können.

Bei der Inkubation der Zellen mit *E. faecalis* MVs konnte nach 24 h eine verringerte Expression von *CLDN2* detektiert werden. Claudin-2 gehört du den Poren-formenden Claudinen, dessen erhöhte Expression mit einer erhöhten Permeabilität der TJ einhergeht (Luettig et al., 2015). Die verminderte Expression, welche im Rahmen der vorliegenden Arbeit beobachtet wurde, könnte eine Gegenreaktion der Zellen auf die Inkubation mit den *E. faecalis* MVs sein, um so die Barriere-Eigenschaften zu schützen. Nach Transfektion der Caco-2 Zellen mit der *E. faecalis* MV-RNA konnte wie auch nach Inkubation mit der *L. casei* MVs eine verringerte Expression von *CLDN10* beobachtet werden. Zudem konnte nach Transfektion mit der *E. faecalis* MV-RNA auch eine erhöhte Expression von *CLDN18* detektiert werden. In einer Studie, die *E. faecalis* als Nahrungszusatz bei Nilbuntbarschen (*Oreochromis niloticus*) verwendet hat, konnte eine erhöhte Expression von *CLDN1* beobachtet werden (H. Li et al.,

2020). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte jedoch keine veränderte Expression von *CLDN1* nach Inkubation oder Transfektion der Caco-2 Zellen mit den MVs oder der MV-RNA von *E. faecalis* beobachtet werden.

Bei Inkubation der Caco-2 Zellen mit den OMVs von *P. mirabilis* konnte nach 24 h eine erhöhte Expression von *CLDN18* detektiert werden. Interessanterweise war die Expression jedoch nach 10 h Transfektion der Zellen mit der OMV-RNA verringert, was darauf schließen lässt, dass die OMVs und die OMV-RNA nicht zwangsläufig zu denselben Effekten in den Empfängerzellen führen. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnten entweder nach Inkubation mit den BEVs oder der Transfektion mit der BEV-RNA aller drei untersuchten Bakterien eine Veränderung der Expression von *CLDN18* beobachtet werden. Dabei war jedoch keine eindeutige Tendenz sichtbar, da sowohl eine erhöhte als auch verringerte Expression nach Inkubation mit den BEVs oder nach Transfektion mit der BEV-RNA detektiert wurde. Bisher konnte bereits gezeigt werden, dass Claudin-18 in der Lunge und im Magen exprimiert wird (Niimi et al., 2001) und in letzterem die Permeabilität der Zellen für Anionen beeinflusst (Caron et al., 2021). Zudem konnte im Darmgewebe von Patienten mit kolorektalen Karzinomen eine erhöhte Expression von *CLDN18* beobachtet werden, welche mit einer schlechteren Prognose verbunden war (Matsuda et al., 2010). Weiterhin konnten nach Transfektion der Caco-2 Zellen mit der *P. mirabilis* OMV-RNA auch eine verringerte Expression von *CLDN6* und *CLDN14* nach 10 h bzw. von *CLDN10* nach 24 h beobachtet werden. Wie bei *CLDN18* konnte auch bei *CLDN10* in dieser Arbeit entweder nach Inkubation mit den BEVs oder der Transfektion mit der BEV-RNA aller drei untersuchten Bakterien eine veränderte Expression des Gens detektiert werden. In einer Studie aus dem Jahr 2021 konnte gezeigt werden, dass im Darm von Mäusen, bei denen Colitis ausgelöst wurde, nach Inkubation mit *P. mirabilis* ein verringertes Proteinlevel von Claudin-3 detektiert werden konnte (J. Zhang et al., 2021). Eine veränderte Expression des entsprechenden Gens konnte jedoch im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht detektiert werden. Wie bereits erwähnt, könnte dies einen Hinweis darauf liefern, dass die Bakterien, die sezernierten OMVs und die OMV-RNA in der Lage sind, unterschiedliche Effekte in den jeweiligen Empfängerzellen auszulösen.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen somit, dass sowohl die BEVs als auch die BEV-RNA zu spezifischen Veränderungen in der Expression von Claudinen geführt hat, die eine wichtige Funktion bei der Regulation der Permeabilität von TJs haben.

5.6.3 Veränderungen in der Genexpression durch *P. mirabilis* OMVs sind unabhängig von den Effekten des LPS

In der Vergangenheit konnte mehrfach beschrieben werden, dass LPS die Aggregation von Alpha-Synuclein induzieren kann, was wiederum eine Erklärung sein könnte, wie das Darmmikrobiom zur Pathogenese von M. Parkinson beiträgt (Bhattacharyya et al., 2019; C. Kim et al., 2016). Darüber hinaus kann LPS die Permeabilität von TJs in Darmepithelzellen erhöhen (Guo et al., 2013; Nighot et al., 2017). LPS ist auch in der äußeren Membran von OMVs zu finden (Schwechheimer & Kuehn, 2015). Im Jahr 2017 konnte zudem von Dauros-Singorenko et al. die Anwesenheit von LPS in RNA, welche aus OMVs isoliert wurde, beobachtet werden (Dauros-Singorenko et al., 2017), weswegen im Folgenden die Vermutung geäußert wurde, dass ein Teil der beobachteten Veränderungen in der Genexpression der Empfängerzellen auf das LPS zurückgeführt werden könnte (Dauros-Singorenko et al., 2018). Die Messung der Endotoxin-Konzentration in der vorliegenden Arbeit hat gezeigt, dass sowohl in den OMVs von *P. mirabilis* als auch in der daraus isolierten RNA LPS nachgewiesen werden konnte. In der vorliegenden Arbeit als auch in der oben genannten Studie von Dauros-Singorenko et al. von 2017 wurden zur Isolation von RNA aus den OMVs eine Phenol-basierte Methode genutzt. LPS lässt sich ebenfalls mit Hilfe von Phenol-basierten Methoden isolieren (Davis & Goldberg, 2012). Es ist somit wahrscheinlich, dass im Rahmen der RNA Isolation gleichzeitig das in den OMVs enthaltene LPS mit aufgereinigt und aufkonzentriert wurde. In einer Studie, die den Effekt von *E. coli* OMV-RNA auf das Transkriptom von Epithelzellen der Harnblase untersuchte, konnte beobachtet werden, dass die von der OMV-RNA und vom LPS alleine hervorgerufenen Veränderungen große Ähnlichkeiten zueinander aufwiesen, was wiederum die oben genannte Hypothese bestätigen würde (Dauros-Singorenko et al., 2020). Die Ergebnisse zur Analyse des Transkriptoms der Caco-2 Zellen nach Inkubation oder Transfektion mit *P. mirabilis* OMVs oder OMV-RNA im Vergleich zu *P. mirabilis* LPS haben jedoch gezeigt, dass die beobachteten Effekte nicht nur durch das LPS allein, sondern auch durch die OMVs oder die OMV-RNA hervorgerufen wurden. Dies war z. B. bei *CXCL8* und *CXCL10* zu beobachten. Ein Grund, weswegen in der vorliegenden Arbeit keine starke Reaktion auf das LPS beobachtet werden konnte, könnte mit der niedrigen Konzentration von LPS in den OMVs und der OMV-RNA zusammenhängen. Diese lagen in der vorliegenden Arbeit bei ca. 0,2 ng/ml für die OMVs und 1 ng/ml für die OMV-RNA. Im Vergleich dazu lag die eingesetzte LPS-Konzentration in der oben genannten Studie jedoch bei bis zu 1000 ng/ml (Dauros-Singorenko et al., 2020). Tatsächlich konnte in einer anderen Studie aus dem Jahr 2013 jedoch beschrieben werden, dass selbst sehr geringe Konzentrationen zwischen 0 und 1 ng/ml ausreichen, um die Permeabilität der TJs sowie die Expression von TLR4 zu erhöhen. Bei einer Konzentration von 0,3 ng/ml dauerte es jedoch im Durchschnitt fünf Tage

bis dieser Effekt beobachtet werden konnte (Guo et al., 2013). Es ist somit möglich, dass bei einer längeren Inkubationszeit mit dem *P. mirabilis* LPS auch im Rahmen der vorliegenden Arbeit weitere Veränderungen der Genexpression hätten beobachtet werden können. In einer weiteren Studie, welche den Effekt von *P. mirabilis* OMVs auf Makrophagen aus dem Knochenmark untersuchte, konnte gezeigt werden, dass die Viabilität der Zellen durch die Inkubation mit den OMVs, jedoch nicht nach Inkubation mit dem *P. mirabilis* LPS abnahm (T. Wang et al., 2022). Die OMVs hatten demzufolge ebenfalls einen anderen Effekt als das LPS allein. Zusammenfassend haben die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit gezeigt, dass Veränderungen in der Genexpression der Caco-2 Zellen, welche innerhalb der ersten 24 h beobachtet wurden, wahrscheinlich von anderen Komponenten der OMVs und nicht zwangsläufig durch das LPS hervorgerufen wurden.

5.7 Präsenz von EVs in konditioniertem und unkonditioniertem Zellkulturmedium

Die aktuelle Forschung zur eukaryotischen EVs ist größtenteils noch immer auf die Verwendung von Zellkultursystemen angewiesen. Obwohl dies eine weit verbreitete Methode darstellt, bringt sie verschiedene Herausforderungen mit sich. Standardmäßig wird in der Zellkultur FCS als Zusatz verwendet, da dieses eine Vielzahl an Proteinen, Aminosäuren oder Hormonen enthält, um so das Wachstum der Zellen optimal zu unterstützen (Schrödel, 2007). Die Gewinnung von FCS erfolgt aus dem Blut von ungeborenen Kälbern (Schrödel, 2007). Wie in allen extrazellulären Flüssigkeiten, so sind auch im Blut zirkulierende EVs zu finden, die von den umliegenden Zellen in dieses sezerniert wurden (Alberro et al., 2021). Diese EVs gelangen anschließend mit dem FCS in das Zellkultursystem. Durch die Anwesenheit der EVs aus dem FCS kann wiederum die Analyse von EVs, die aus den jeweiligen Zellen in der Kultur stammen und eigentlich analysiert werden sollen, erschwert werden. Dies beginnt bereits mit der Messung der Partikelzahl, da die bovinen EVs aus dem FCS zusammen mit den EVs, die von den kultivierten Zellen sezerniert werden, über Ultrazentrifugation pelletiert werden und während der Aufreinigung über SEC in denselben Fraktionen eluieren. Dies konnte auch im Rahmen der vorliegenden Arbeit beobachtet werden. Sowohl die Caco-2 (+FCS) EVs als auch die DMEM (+FCS) EVs waren nach der SEC in den denselben Fraktionen lokalisiert. Die Messung der Partikelkonzentration zeigte zwar, dass die Menge der EVs im konditionierten Medium (Caco-2 (+FCS) EVs) signifikant höher als die im unkonditionierten Medium (DMEM (+FCS) EVs) war, trotzdem lässt sich anhand dessen keine genaue Differenz zwischen FCS-EVs und den Caco-2 EVs berechnen. Dies ist unter anderem damit zu begründen, dass bovine EVs aus dem FCS auch von den Zellen in der Zellkultur

aufgenommen werden können (Shelke et al., 2014). Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit haben somit gezeigt, dass auch aus dem FCS-haltigen Kulturmedium, welches für die Kultivierung der Caco-2 Zellen genutzt wurde, EVs isoliert werden konnten.

5.8 EVs aus konditioniertem und unkonditioniertem Zellkulturmedium weisen unterschiedliche miRNA-Expressionsprofile auf

Neben der Analyse von EVs im Allgemeinen kann auch die Analyse von mit EVs assoziierten miRNAs aus der Zellkultur mit besonderen Schwierigkeiten verbunden sein. Dies hat vor allem den Grund, dass FCS-EVs bovine miRNAs transportieren, die aufgrund evolutionär konservierter Sequenzen fälschlicherweise als humane miRNAs annotiert werden könnten (Wei et al., 2016). Im Folgenden könnten verschiedene miRNAs, die eigentlich mit den FCS-EVs in das Zellkultursystem eingebracht wurden, als von den kultivierten Zellen in EVs sezernierte miRNAs zugeordnet werden. In der Vergangenheit wurden daher verschiedene Möglichkeiten vorgestellt, um die Herausforderung von FCS-EVs als Verunreinigung bei der Analyse von EVs zu umgehen. Im Jahr 2006 wurde von Théry et al. vorgeschlagen, entweder komplett Serum-freies Medium zu verwenden, 1 % BSA statt FCS einzusetzen oder FCS-EV depletiertes Medium zu nutzen, wenn die Zellen Serum zum Wachstum benötigen. Zur Depletion von EVs soll das FCS-haltige Medium über Nacht ultrazentrifugiert und anschließend lediglich der Überstand für die Zellkultur verwendet werden (Théry et al., 2006). Mehrere Studien konnten jedoch zeigen, dass selbst nach bis zu 18 h Ultrazentrifugation immer noch EVs im Überstand gefunden werden können (Eitan et al., 2015; Lehrich et al., 2018; Shelke et al., 2014). Darüber hinaus kann die Reduktion von FCS-EVs oder FCS im Allgemeinen weitere Hindernisse mit sich bringen, durch die die Analyse der EVs und ihres Inhalts weiter erschwert wird. Diese umfassen unter anderem negative Effekte auf das Wachstum oder auf die Zelldifferenzierung (Angelini et al., 2016; Aswad et al., 2016; Eitan et al., 2015; Ochieng et al., 2009). Außerdem gibt es Berichte darüber, dass sich auch die Biogenese oder der Inhalt der EVs verändern kann (J. Li et al., 2015; Sun et al., 2014; Vallabhaneni et al., 2015). Weitere Ansätze beschäftigen sich mit der Verwendung von Serum-freien, alternativen Zellkulturzusätzen wie etwa Insulin-Transferrin-Selenium (ITS) (X. Liu et al., 2019; Mainzer et al., 2014). Derzeit existieren bereits Studien, die ITS oder ITS-X (Insulin-Transferrin-Selenium-Ethanolamin) auch als Supplement in Zellkultursystemen einsetzen, die für die Produktion von EVs genutzt werden (Bost et al., 2022; Schulz et al., 2020).

Allerdings gibt es zum aktuellen Zeitpunkt immer noch unzureichende Informationen darüber, inwiefern ITS einen Einfluss auf die Produktion oder den Inhalt von EVs hat. Im Rahmen dieser Arbeit wurde daher ein alternativer Ansatz genutzt, um miRNAs zu identifizieren, die in EVs aus Caco-2 Zellen ins Medium sezerniert werden, ohne dass zuvor eine Reduktion des FCS nötig war. Dafür wurden nicht nur Caco-2 (+FCS) EVs, also aus dem konditionierten Medium, sondern auch aus DMEM (+FCS) EVs, also dem unkonditionierten Medium, isoliert. Da das unkonditionierte Medium nicht mit den Zellen in Kontakt gekommen ist und daher in diesem nur EV-miRNAs bovinen Ursprungs detektiert werden sollten, kann es in diesem Versuch als eine Art Hintergrundkontrolle fungieren. Auf diese Weise sollten sich miRNAs identifizieren lassen, die mit großer Wahrscheinlichkeit in EVs der Caco-2 Zellen sezerniert wurden.
Im Folgenden wurde daher zunächst RNA aus den EVs des konditionierten und unkonditionierten Mediums isoliert. Bei der initialen Analyse der RNA-Qualität war dabei sichtbar, dass die EVs aus beiden Konditionen relativ ähnliche RNA-Fragmente transportierten. Den größten Teil machten dabei die sRNAs, zu denen auch die miRNAs gehören, mit einer Länge unter 200 nt aus. Deutliche Unterschiede zeigten sich anschließend bei der Analyse der miRNA-Expressionsprofile im Rahmen der Sequenzierung. Dabei konnten einige miRNAs identifiziert werden, die mit großer Wahrscheinlichkeit von den Caco-2 Zellen sezerniert wurden, und solche, die möglicherweise durch Zugabe des FCS in das Zellkultursystem eingebracht wurden. Im Rahmen der Datenanalyse konnte die miR-451a identifiziert werden, welche eine stark erhöhte Expression in den EVs aus dem unkonditionierten Medium gezeigt hat. In der Vergangenheit haben eine Vielzahl an Studien gezeigt, dass diese miRNA in EVs, die von verschiedenen Zelltypen sezerniert werden, detektiert werden kann (Ji et al., 2014; Koppers-Lalic et al., 2014; Li et al., 2013; Villarroya-Beltri et al., 2013). Wie bereits erwähnt, wird das FCS aus dem Blut von ungeborenen Kälbern gewonnen (Schrödel, 2007). Die meisten der im Blut zirkulierenden Zellen sind Erythrozyten (Pretini et al., 2019). Analysen des miRNA-Expressionsprofils von Erythrozyten konnten zeigen, dass miR-451a besonders hoch in diesen Zellen exprimiert wird (Doss et al., 2015; C. W. Wu et al., 2017). Tatsächlich konnte darüber hinaus gezeigt werden, dass miR-451a auch in EVs, welche direkt aus dem FCS isoliert wurden, detektiert werden kann (Wei et al., 2016). Die Wahrscheinlichkeit ist daher groß, dass diese miRNA über das FCS in das Zellkultursystem eingebracht wurde und daher vermehrt in den EVs aus dem unkonditionierten Medium detektiert wurden. Neben miR-451a zeigten auch miR-26a-5p und miR-144-3p eine erhöhte Expression in den EVs aus dem unkonditionierten Medium. Für die miR-26a-5p konnte ebenfalls eine erhöhte Expression in EVs aus Zellen, die mit FCS-haltigem Medium kultiviert wurden, beobachtet werden (Wei et al., 2016). MiR-144-3p ist ebenso wie miR-451a Teil des miR-144/miR-451 Clusters, welches eine essentielle Funktion bei der Erythropoese, also der Bildung von Erythrozyten, hat (T. Wang et al., 2019). Damit einhergehend konnte auch für die

miR-144-3p eine erhöhte Expression in Erythrozyten beschrieben werden (C. W. Wu et al., 2017). Damit zeigte sich auch für miR-144-3p und miR-26-5p eine hohe Wahrscheinlichkeit, dass sie aus dem FCS stammen und nicht von den Caco-2 Zellen in EVs sezerniert wurden.
Im Gegensatz dazu zeigten sowohl miR-192-5p als auch miR-483-5p eine besonders hohe Expression in den EVs aus dem konditionierten Medium. Bei der miR-483-5p handelt es sich um eine onkogene miRNA, die in kolorektalen Karzinomen überexprimiert wird (Cui et al., 2016). Da es sich bei den Caco-2 Zellen um eine Zelllinie aus dem kolorektalen Adenokarzinom handelt (Fogh et al., 1977), besteht die Wahrscheinlichkeit, dass diese miRNA deshalb sehr hoch exprimiert und in den EVs zu finden ist. Neben der miR-483-5p zeigte miR-192-5p allerdings noch eine weitaus höhere Expression in den EVs. Es handelt sich dabei um eine miRNA, die u. a. im Darm erhöht exprimiert wird (Rishik et al., 2024) und dessen Expression auch in kolorektalen Karzinomen erhöht ist (Della Vittoria Scarpati et al., 2014). Es ist somit ebenfalls wahrscheinlich, dass miR-192-5p in EVs aus den Caco-2 Zellen sezerniert wurde. Darüber hinaus besteht eine Verbindung von miR-192-5p mit der Alterung und verschiedenen Erkrankungen des Nervensystems (Rahman et al., 2019; Tang et al., 2019; Trelinska et al., 2016; Tsukamoto et al., 2020). Ebenso wurde auch ein Zusammenhang der miRNA mit M. Parkinson beschrieben (He et al., 2017; Kang et al., 2019; Khoo et al., 2012; Y. Li et al., 2024; Shi et al., 2024). Mit diesem Hintergrund und der Tatsache, dass die miR-192-5p eine hohe Expression in den EVs der Caco-2 Zellen gezeigt wurde, wurde diese als Kandidat für die nachfolgende Analyse zur Interaktion mit den M. Parkinson-assoziierten Bakterien ausgewählt.

5.9 Bakterien zeigen unterschiedliche Fähigkeit zur Aufnahme von humanen EV-miRNAs

Im Jahr 2016 entdeckten Liu et al., dass humane miRNAs in der Lage sind, das Wachstum und die Genexpression von Bakterien zu verändern (S. Liu et al., 2016). Damit tat sich ein ganz neues Forschungsfeld auf. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde daher ebenfalls untersucht, ob die humane miR-192-5p in Bakterien aufgenommen werden und dort das Wachstum der Bakterien beeinflussen kann. Interessanterweise zeigte sich bei der Analyse der Aufnahme deutlich, dass lediglich *P. mirabilis* dazu in der Lage war, eine größere Menge der miRNA zu internalisieren. Auf der anderen Seite waren bei *L. casei* und *E. faecalis* nur wenig bis keine Internalisierung der miR-192-5p detektierbar. Aktuell existierten nur wenige Studien, die sich mit dem Effekt von eukaryotischen miRNAs auf Bakterien beschäftigen. Von diesen fokussieren sich drei auf Gram-negative Bakterien (C. Li et al., 2023; S. Liu et al., 2016, 2019) und zwei auf Gram-positive Bakterien (Santos et al., 2020; L. Zhao et al., 2022).

Auffällig ist dabei, dass zwar alle Studien einen Effekt auf das Wachstum der Bakterien beschrieben, jedoch nur die Studien, die sich mit den Gram-negativen Bakterien befassten, die tatsächliche Internalisierung der miRNA gezeigt haben. Während in der Studie von Santos et al. die Aufnahme der miRNA nicht gezeigt wird (Santos et al., 2020), wurde bei der anderen Studie von Zhao et al. zwar die Internalisierung der miRNA analysiert, allerdings wurde dafür das Gram-negative Bakterium *E. coli* verwendet (L. Zhao et al., 2022). Es liegt die Vermutung nahe, dass die Fähigkeit der Bakterien, die miRNA zu internalisieren, möglicherweise mit dem Aufbau der bakteriellen Zellwand und verschiedenen Mechanismen zur Aufnahme von Nukleinsäuren aus dem extrazellulären Raum zusammenhängen könnte.
Gram-negative Bakterien besitzen sowohl eine äußere als auch eine innere Membran sowie eine dazwischen im Periplasma liegende Schicht aus Peptidoglykan (Silhavy et al., 2010). Bei vielen dieser Bakterien können in der Zellwand sogenannte Typ IV Pili (T4P) gefunden werden. Sie dienen u. a. zur Fortbewegung, Adhäsion an z. B. eukaryotische Zellen und können für die Aufnahme von DNA verantwortlich sein (Mattick, 2002; Piepenbrink, 2019). In der Vergangenheit wurden T4P auch bei *P. mirabilis* beschrieben (Silverblatt & Ofek, 1978). Es wäre demzufolge möglich, dass *P. mirabilis* im Rahmen dieser Untersuchungen die synthetische doppelsträngige miRNA erkannt und über T4P aufgenommen haben könnte. Hinzu kommt, dass Pili meist an den Polen der Bakterien zu finden sind (Bradley, 1980; Kaiser, 1979). Die CLSM-Aufnahmen von *P. mirabilis* in der vorliegenden Arbeit zeigten ebenfalls, dass die Signale für die Cy3-gelabelte miR-192-5p vermehrt in den Polen der Bakterien detektiert werden können. Dies könnte ein weiterer Hinweis darauf sein, dass die synthetische miRNA über T4P aufgenommen wurde.
Im Gegensatz zu den Gram-negativen Bakterien besteht die Zellwand bei Gram-positiven Bakterien aus einer dicken Schicht Peptidoglykan sowie einer darunter liegenden zytoplasmatischen Membran (Silhavy et al., 2010). Tatsächlich konnten in einigen wenigen Gram-positiven Bakterien wie z. B. *Clostridium perfringens* ebenfalls T4P gefunden werden (Varga et al., 2006). Im Gegensatz dazu wurde die Anwesenheit von T4P bei *E. faecalis* oder *L. casei* zum aktuellen Zeitpunkt noch nicht beschrieben, was möglicherweise ein Grund sein könnten, warum die beiden Bakterien in der vorliegenden Arbeit keine oder kaum Aufnahme der miRNA gezeigt haben. Die dicke Peptidoglykan-Schicht stellt zudem eine von Natur aus schwer überwindbare Barriere dar. Darüber hinaus besitzt *E. faecalis* sogenannte DNA-Abwehrsysteme, wodurch wiederum die Aufnahme von fremder DNA verhindert werden kann (Krause et al., 2022).

Eine weitere Erklärung für die unterschiedliche Aufnahme der miR-192-5p könnte sein, dass Bakterien einen spezifischen Mechanismus besitzen, mit dem sie zwischen verschiedenen miRNAs unterscheiden können und so nur bestimmte miRNAs, die eventuell für sie von Vorteil sind, internalisieren. Für diese Hypothese spricht eine Studie von Liu et al., in der beobachtet werden konnten, dass *Fusobacterium nucleatum* eine erhöhte Aufnahme von Cy3-gelabelter miR-515-5p jedoch nicht von Cy3-gelabelter miR-1226-5p gezeigt hat. Die miR-515-5p wiederum hatte einen positiven Effekt auf das Wachstum der Bakterien (S. Liu et al., 2016). Auch bei der Analyse des Wachstumsverhaltens der drei hier untersuchten Bakterien konnte zunächst ebenfalls ein positiver Effekt auf das Wachstum von *P. mirabilis* beobachtet werden. Dieser war jedoch nur bei Messung der OD sichtbar und ließ sich im Rahmen der Analyse des prozentualen Anteils lebender Bakterien nicht bestätigen. Es ist somit möglich, dass die Erhöhung der OD durch andere bisher noch unbekannte Faktoren unabhängig von der Viabilität der Bakterien beeinflusst wurde. Gegen die Hypothese spricht weiterhin, dass andere Studien nicht nur einen positiven Einfluss, sondern ebenfalls einen negativen Effekt auf das Wachstum durch die miRNA beobachtet haben (C. Li et al., 2023; Santos et al., 2020; L. Zhao et al., 2022). Über die genauen Mechanismen, die die Aufnahme von miRNAs in Bakterien steuern können, kann aufgrund fehlender Studien zum aktuellen Zeitpunkt nur spekuliert werden.

5.10 Steigerung der Aufnahme von humanen EV-miRNAs in Bakterien durch die Verpackung in artifizielle Liposomen

Im Rahmen der Analyse des miRNA-Expressionsprofils von Caco-2 EVs konnte gezeigt werden, dass miR-192-5p in EVs von Caco-2 Zellen sezerniert wird. Daher stellte sich die Frage, ob die Verpackung der miRNA in artifizielle Liposomen die Fähigkeit der Bakterien zur Aufnahme der miRNA ändern würde. Interessanterweise zeigte sich sowohl bei *L. casei* und vor allem bei *E. faecalis* eine signifikante Steigerung des prozentualen Anteils der Bakterien, die die miRNA aufgenommen haben. Besonders bemerkenswert war, dass sich die CLSM-Bilder von *E. faecalis*, die für 24 h mit der in artifizielle Liposomen verpackten miRNA inkubiert wurden, und die Bildern der Bakterien, die mit den Caco-2 (-FCS) EVs inkubiert wurden, sehr ähnelten. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass die Verpackung der miRNA tatsächlich einen großen Einfluss auf die Aufnahme haben konnte. Dahingehend konnte erst vor einigen Jahren gezeigt werden, dass es durch die Verwendung von Lipid-Polymer Nanopartikeln möglich war, Ampicillin in *E. faecalis* einzuschleusen, wohingegen das freie Ampicillin nicht von *E. faecalis* aufgenommen werden konnte (C. H. Tan et al., 2021).

Trotz der vermehrten Aufnahme der verpackten im Gegensatz zur freien miR-192-5p konnte jedoch keine veränderten Auswirkung auf das Wachstum von *L. casei* und *E. faecalis* beobachtet werden. Der erhöhte prozentuale Anteil lebender *L. casei* nach Inkubation mit der verpackten miR-192-5p war lediglich im Vergleich zu den artifiziellen Liposomen selbst sichtbar, nicht jedoch im Vergleich zur eigentlichen Kontrolle. Zudem zeigte *L. casei* morphologische Veränderungen, die durch die artifiziellen Liposomen verursacht wurde. Diese Veränderungen könnten möglicherweise eine Reaktion auf Stress sein, der durch die Liposomen hervorgerufen wird. Veränderungen in der Komposition der Zellwand oder Morphologie nach Induktion von Stress wurden bei *L. casei* bereits vermehrt beobachtet (Gandhi & Shah, 2016; Parlindungan et al., 2018; Piuri et al., 2005). Wie bereits erwähnt, ähnelten sich die CLSM-Aufnahme von *E. faecalis*, die mit der verpackten miR-192-5p und den Caco-2 (-FCS) EVs inkubiert wurden. Die Analyse des Wachstumsverhaltens hat gezeigt, dass *E. faecalis*, die zusammen mit Caco-2 (-FCS) EVs, Caco-2 (+FCS) EVs oder DMEM (+FCS) EVs kultiviert wurde, länger in der stationären Phase verblieben und sich damit der Eintritt der Bakterien in die Absterbephase verzögert habt. Ähnliche Beobachtungen konnten bereits bei *E. coli* und *Lactobacillus plantarum* gemacht werden, die ein verbessertes Wachstum in Anwesenheit von EVs, welche aus Milch isoliert wurden, gezeigt haben (Yu et al., 2019). Wenn *E. faecalis* im Rahmen der vorliegenden Arbeit mit der in artifizielle Liposomen verpackten miR-192-5p inkubiert wurden, blieb jedoch der prozentuale Anteil lebender Bakterien, ähnlich wie nach Kultivierung der Bakterien mit der freien miRNA unverändert. Dahingehend muss erwähnt werden, dass nach Kultivierung von *E. faecalis* mit den EVs die OD gemessen wurde, während nach der Kultivierung von *E. faecalis* mit der verpackten miRNA jedoch der prozentuale Anteil lebender Bakterien in den Kulturen gemessen wurde. Es wäre daher möglich, dass das Wachstum der Bakterien gar nicht wirklich erhöht, sondern nur die Viabilität der Bakterien durch die zusätzliche Bereitstellung von Nährstoffen in Form der EVs verlängert wurde. Auch bei *P. mirabilis* konnte eine vermehrte Internalisierung der verpackten miR-192-5p beobachtet werden. Diese war jedoch anders als bei *L. casei* und *E. faecalis* unabhängig von der Verpackung, sondern wahrscheinlich mit dem DMEM, welches für die Präparation der artifiziellen Liposomen genutzt wurde, verbunden. Die Inhaltsstoffe des DMEM könnten möglicherweise einen Einfluss auf den Metabolismus der Bakterien haben und so dafür gesorgt haben, dass diese vermehrt Moleküle aus der Umgebung aufnehmen. Zusätzlich zeigte sich bei der Analyse der Viabilität auch, dass die artifiziellen Liposomen selbst einen Effekt auf die Viabilität von *P. mirabilis* hatten. Diese Ergebnisse stehen im Gegensatz zu den Beobachtungen bei *L. casei*, die im Rahmen der vorliegenden Arbeit einen verringerten Anteil lebender Bakterien nach Inkubation mit den Liposomen aufwiesen.

Zum aktuellen Zeitpunkt existieren keine Studien, die sich mit der vergleichenden Aufnahme von freien und verpackten humanen miRNAs in Bakterien beschäftigen. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit konnten allerdings zeigen, dass es potenzielle Wege gibt, durch die die Aufnahme der humanen miRNA in Bakterien moduliert werden kann. Die Beobachtung, dass Liposomen die Aufnahme von miR-192-5p in *L. casei* und *E. faecalis* steigern konnte, könnte zudem erste Hinweise darauf liefern, dass Gram-positive Bakterien z. B. im Darm vermehrt mit in EVs verpackten miRNAs interagieren, während Gram-negative Bakterien wie *P. mirabilis* sowohl freie als auch verpackte miRNAs aufnehmen können.

5.11 Ausblick und Fazit

Die Kommunikation von Bakterien und humanen Zellen über EVs ist ein relativ neues Forschungsfeld, bei dem viele Aspekte noch weitgehend ungeklärt sind. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit haben die individuelle Wirkung von unterschiedlichen EVs und den damit assoziierten RNAs auf verschiedene Aspekte der *Cross-Kingdom* Kommunikation gezeigt.
Diese umfassten die unterschiedliche Aufnahmerate von BEVs in die Darmepithelzellen, Effekte auf die Zellviabilität sowie Veränderungen in der Genexpression der Zellen. Vor allem letzteres hat gezeigt, dass sowohl die unterschiedlichen BEVs als auch die damit assoziierte RNA in der Lage ist, spezifische Veränderungen in der Expression einzelner Gene hervorzurufen. Obwohl in den letzten Jahren eine größere Anzahl von Studien zu EVs und EV-vermittelten Effekten auf verschiedene Empfängerzellen durchgeführt wurden, ist ein Vergleich zwischen diesen aufgrund von Unterschieden in Kulturbedingungen oder Isolationsmethoden der EVs schwierig. Ebenso konnte in Bezug auf die Effekte von BEVs gezeigt werden, dass diese nicht zwangsläufig den Effekten entsprechen, die die Bakterien, von denen sie sezerniert werden, auf die Empfängerzellen ausüben (Karthikeyan et al., 2023; Vargoorani et al., 2020). Dies betont nochmal zusätzlich die Notwendigkeit von individuellen Analysen der jeweiligen BEVs, um den Effekt dieser besser verstehen zu können.
Weiterhin zeigten die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit, dass Bakterien dazu in der Lage sind, humane miRNAs zu internalisieren, und dass die Fähigkeit zur Aufnahme durch das Verpacken der miRNA in artifizielle Liposomen verändert werden kann. Im Jahr 2019 wurde von Hewel et al. ein Modell aufgestellt, welches die Rolle von humanen miRNAs bei der Kommunikation mit Bakterien in Zusammenhang mit der Progression von neurodegenerativen Erkrankungen thematisierte. Die Autoren konnten mit Hilfe von *in silico* Analysen zeigen, dass miRNAs, welche im Zuge der Erkrankung an M. Parkinson oder M. Alzheimer dereguliert waren, Bindestellen im Genom verschiedener Bakterienspezies aufwiesen. Die entsprechenden Genprodukte, welche potenziell durch diese miRNAs beeinflusst werden

könnten, waren z. B. mit der Biofilmbildung oder der Biosynthese von Lipopolysacchariden assoziiert. Auf diese Weise könnten die bei neurodegenerativen Erkrankungen deregulierten miRNAs, wenn sie ins Darmlumen sezerniert und von den Bakterien aufgenommen werden, einen Effekt auf spezifische Signalwege in den Darmbakterien und damit möglicherweise auf die Erkrankung selbst ausüben (Hewel et al., 2019).

In der vorliegenden Arbeit wurde die Kommunikation von Bakterien und humanen Zellen jeweils unabhängig voneinander betrachtet. In weiterführenden Analysen könnte z. B. untersucht werden, wie sich der Inhalt der EVs, die von Darmepithelzellen sezerniert werden, verändert, nachdem die Zellen zuvor mit verschiedenen BEVs inkubiert wurden. Um darüber hinaus weitere Einblicke in die komplexe Wirkung von BEVs auf Darmepithelzellen zu erhalten, wäre der Einsatz von Co-Kultur Modell mit Immunzellen denkbar, um die Effekte auf die interzelluläre Kommunikation untersuchen zu können (Kleiveland, 2015).

Die im Rahmen dieser Arbeit neugewonnen Erkenntnisse können als Basis für die weitere Entschlüsselung der *Cross-Kingdom* Kommunikation von Bakterien und humanen Zellen über EVs und EV-RNAs dienen, um deren potenzielle Rolle bei der Entstehung von Erkrankungen besser verstehen zu können.

Literaturverzeichnis

Aaij, C., & Borst, P. (1972). The gel electrophoresis of DNA. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Nucleic Acids and Protein Synthesis*, *269*(2), 192–200. https://doi.org/10.1016/0005-2787(72)90426-1

Aarsland, D., Zaccai, J., & Brayne, C. (2005). A systematic review of prevalence studies of dementia in Parkinson's disease. *Movement Disorders*, *20*(10), 1255–1263. https://doi.org/10.1002/mds.20527

Adams-Carr, K. L., Bestwick, J. P., Shribman, S., Lees, A., Schrag, A., & Noyce, A. J. (2016). Constipation preceding Parkinson's disease: a systematic review and meta-analysis. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*, *87*(7), 710–716. https://doi.org/10.1136/jnnp-2015-311680

Adeolu, M., Alnajar, S., Naushad, S., & S. Gupta, R. (2016). Genome-based phylogeny and taxonomy of the 'Enterobacteriales': proposal for Enterobacterales ord. nov. divided into the families Enterobacteriaceae, Erwiniaceae fam. nov., Pectobacteriaceae fam. nov., Yersiniaceae fam. nov., Hafniaceae fam. nov., Morganellaceae fam. nov., and Budviciaceae fam. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, *66*(12), 5575–5599. https://doi.org/10.1099/ijsem.0.001485

Afonina, I., Tien, B., Nair, Z., Matysik, A., Lam, L. N., Veleba, M., Jie, A. K. J., Rashid, R., Cazenave-Gassiot, A., Wenk, M., Wai, S. N., & Kline, K. A. (2021). The composition and function of Enterococcus faecalis membrane vesicles . *MicroLife*, *2*. https://doi.org/10.1093/femsml/uqab002

Aghamohammad, S., Sepehr, A., Miri, S. T., Najafi, S., Pourshafie, M. R., & Rohani, M. (2022). Anti-inflammatory and immunomodulatory effects of Lactobacillus spp. as a preservative and therapeutic agent for IBD control. *Immunity, Inflammation and Disease*, *10*(6). https://doi.org/10.1002/iid3.635

Albanese, M., Chen, Y.-F. A., Hüls, C., Gärtner, K., Tagawa, T., Mejias-Perez, E., Keppler, O. T., Göbel, C., Zeidler, R., Shein, M., Schütz, A. K., & Hammerschmidt, W. (2021). MicroRNAs are minor constituents of extracellular vesicles that are rarely delivered to target cells. *PLOS Genetics*, *17*(12), e1009951. https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1009951

Alberro, A., Iparraguirre, L., Fernandes, A., & Otaegui, D. (2021). Extracellular vesicles in blood: Sources, effects and applications. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 22, Issue 15). MDPI. https://doi.org/10.3390/ijms22158163

Allaire, J. M., Poon, A., Crowley, S. M., Han, X., Sharafian, Z., Moore, N., Stahl, M., Bressler, B., Lavoie, P. M., Jacobson, K., Li, X., & Vallance, B. A. (2021). Interleukin-37 regulates innate immune signaling in human and mouse colonic organoids. *Scientific Reports*, *11*(1), 8206. https://doi.org/10.1038/s41598-021-87592-2

Al-Sadi, R. M., & Ma, T. Y. (2007). IL-1β Causes an Increase in Intestinal Epithelial Tight Junction Permeability. *The Journal of Immunology*, *178*(7), 4641–4649. https://doi.org/10.4049/jimmunol.178.7.4641

Altindis, E., Fu, Y., & Mekalanos, J. J. (2014). Proteomic analysis of Vibrio cholerae outer membrane vesicles. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *111*(15). https://doi.org/10.1073/pnas.1403683111

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

Ambros, V., Bartel, B., Bartel, D. P., Burge, C. B., Carrington, J. C., Chen, X., Dreyfuss, G., Eddy, S. R., Griffiths-Jones, S., Marshall, M., Matzke, M., Ruvkun, G., & Tuschl, T. (2003).

A uniform system for microRNA annotation. *RNA*, *9*(3), 277–279. https://doi.org/10.1261/rna.2183803

Andreu, Z., & Yáñez-Mó, M. (2014). Tetraspanins in extracellular vesicle formation and function. *Frontiers in Immunology*, *5*(SEP). https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00442

Angelini, F., Ionta, V., Rossi, F., Miraldi, F., Messina, E., & Giacomello, A. (2016). Foetal bovine serum-derived exosomes affect yield and phenotype of human cardiac progenitor cell culture. *BioImpacts*, *6*(1), 15–24. https://doi.org/10.15171/bi.2016.03

Anthony, W. E., Wang, B., Sukhum, K. V., D'Souza, A. W., Hink, T., Cass, C., Seiler, S., Reske, K. A., Coon, C., Dubberke, E. R., Burnham, C.-A. D., Dantas, G., & Kwon, J. H. (2022). Acute and persistent effects of commonly used antibiotics on the gut microbiome and resistome in healthy adults. *Cell Reports*, *39*(2), 110649. https://doi.org/10.1016/j.celrep.2022.110649

Aqil, F., Munagala, R., Jeyabalan, J., Agrawal, A. K., & Gupta, R. (2017). Exosomes for the Enhanced Tissue Bioavailability and Efficacy of Curcumin. *AAPS Journal*, *19*(6), 1691–1702. https://doi.org/10.1208/s12248-017-0154-9

Archambaud, C., Nunez, N., da Silva, R. A. G., Kline, K. A., & Serror, P. (2024). Enterococcus faecalis: an overlooked cell invader. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, *88*(3). https://doi.org/10.1128/mmbr.00069-24

Armbruster, C. E., & Mobley, H. L. T. (2012). Merging mythology and morphology: the multifaceted lifestyle of Proteus mirabilis. *Nature Reviews Microbiology*, *10*(11), 743–754. https://doi.org/10.1038/nrmicro2890

Armbruster, C. E., Mobley, H. L. T., & Pearson, M. M. (2018). Pathogenesis of Proteus mirabilis Infection. *EcoSal Plus*, *8*(1). https://doi.org/10.1128/ecosalplus.esp-0009-2017

Armingol, E., Officer, A., Harismendy, O., & Lewis, N. E. (2021). Deciphering cell–cell interactions and communication from gene expression. In *Nature Reviews Genetics* (Vol. 22, Issue 2, pp. 71–88). Nature Research. https://doi.org/10.1038/s41576-020-00292-x

Aswad, H., Jalabert, A., & Rome, S. (2016). Depleting extracellular vesicles from fetal bovine serum alters proliferation and differentiation of skeletal muscle cells in vitro. *BMC Biotechnology*, *16*(1), 32. https://doi.org/10.1186/s12896-016-0262-0

Backes, C., Keller, A., Kuentzer, J., Kneissl, B., Comtesse, N., Elnakady, Y. A., Muller, R., Meese, E., & Lenhof, H.-P. (2007). GeneTrail--advanced gene set enrichment analysis. *Nucleic Acids Research*, *35*(Web Server), W186–W192. https://doi.org/10.1093/nar/gkm323

Bäckhed, F., Ley, R. E., Sonnenburg, J. L., Peterson, D. A., & Gordon, J. I. (2005). Host-bacterial mutualism in the human intestine. In *Science* (Vol. 307, Issue 5717, pp. 1915–1920). https://doi.org/10.1126/science.1104816

Baldereschi, M., Di Carlo, A., Rocca, W. A., Vanni, P., Maggi, S., Perissinotto, E., Grigoletto, F., Amaducci, L., & Inzitari, D. (2000). Parkinson's disease and parkinsonism in a longitudinal study. *Neurology*, *55*(9), 1358–1363. https://doi.org/10.1212/WNL.55.9.1358

Balestrino, R., & Schapira, A. H. V. (2020). Parkinson disease. *European Journal of Neurology*, *27*(1), 27–42. https://doi.org/10.1111/ene.14108

Barichella, M., Pacchetti, C., Bolliri, C., Cassani, E., Iorio, L., Pusani, C., Pinelli, G., Privitera, G., Cesari, I., Faierman, S. A., Caccialanza, R., Pezzoli, G., & Cereda, E. (2016). Probiotics and prebiotic fiber for constipation associated with Parkinson disease. *Neurology*, *87*(12), 1274–1280. https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000003127

Barichella, M., Severgnini, M., Cilia, R., Cassani, E., Bolliri, C., Caronni, S., Ferri, V., Cancello, R., Ceccarani, C., Faierman, S., Pinelli, G., De Bellis, G., Zecca, L., Cereda, E., Consolandi, C., & Pezzoli, G. (2019). Unraveling gut microbiota in Parkinson's disease

and atypical parkinsonism. *Movement Disorders*, *34*(3), 396–405. https://doi.org/10.1002/mds.27581

Bartel, D. P. (2004). MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*, *116*(2), 281–297. https://doi.org/10.1016/S0092-8674(04)00045-5

Battistelli, M., & Falcieri, E. (2020). Apoptotic Bodies: Particular Extracellular Vesicles Involved in Intercellular Communication. *Biology*, *9*(1), 21. https://doi.org/10.3390/biology9010021

Bäuerl, C., Coll-Marqués, J. M., Tarazona-González, C., & Pérez-Martínez, G. (2020). Lactobacillus casei extracellular vesicles stimulate EGFR pathway likely due to the presence of proteins P40 and P75 bound to their surface. *Scientific Reports*, *10*(1). https://doi.org/10.1038/s41598-020-75930-9

Becker, A., Schmartz, G. P., Gröger, L., Grammes, N., Galata, V., Philippeit, H., Weiland, J., Ludwig, N., Meese, E., Tierling, S., Walter, J., Schwiertz, A., Spiegel, J., Wagenpfeil, G., Faßbender, K., Keller, A., & Unger, M. M. (2022). Effects of Resistant Starch on Symptoms, Fecal Markers, and Gut Microbiota in Parkinson's Disease — The RESISTA-PD Trial. *Genomics, Proteomics & Bioinformatics*, *20*(2), 274–287. https://doi.org/10.1016/j.gpb.2021.08.009

Bellini, G., Benvenuti, L., Ippolito, C., Frosini, D., Segnani, C., Rettura, F., Pancetti, A., Bertani, L., D'Antongiovanni, V., Palermo, G., Del Prete, E., Antonioli, L., Nardini, V., Morganti, R., Pellegrini, C., Bernardini, N., Ceravolo, R., Fornai, M., & Bellini, M. (2023). Intestinal histomorphological and molecular alterations in patients with Parkinson's disease. *European Journal of Neurology*, *30*(11), 3440–3450. https://doi.org/10.1111/ene.15607

Bethlem, J., & den Hartog Jager, W. A. (1960). The incidence and characteristics of Lewy bodies in idiopathic paralysis agitans (Parkinson's disease) . *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*, *23*(1), 74–80. https://doi.org/10.1136/jnnp.23.1.74

Bhardwaj, V., Heyne, S., Sikora, K., Rabbani, L., Rauer, M., Kilpert, F., Richter, A. S., Ryan, D. P., & Manke, T. (2019). snakePipes: facilitating flexible, scalable and integrative epigenomic analysis. *Bioinformatics*, *35*(22), 4757–4759. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btz436

Bhattacharyya, D., Mohite, G. M., Krishnamoorthy, J., Gayen, N., Mehra, S., Navalkar, A., Kotler, S. A., Ratha, B. N., Ghosh, A., Kumar, R., Garai, K., Mandal, A. K., Maji, S. K., & Bhunia, A. (2019). Lipopolysaccharide from Gut Microbiota Modulates α-Synuclein Aggregation and Alters Its Biological Function. *ACS Chemical Neuroscience*, *10*(5), 2229–2236. https://doi.org/10.1021/acschemneuro.8b00733

Bielaszewska, M., Rüter, C., Kunsmann, L., Greune, L., Bauwens, A., Zhang, W., Kuczius, T., Kim, K. S., Mellmann, A., Schmidt, M. A., & Karch, H. (2013). Enterohemorrhagic Escherichia coli Hemolysin Employs Outer Membrane Vesicles to Target Mitochondria and Cause Endothelial and Epithelial Apoptosis. *PLoS Pathogens*, *9*(12), e1003797. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003797

Blenkiron, C., Simonov, D., Muthukaruppan, A., Tsai, P., Dauros, P., Green, S., Hong, J., Print, C. G., Swift, S., & Phillips, A. R. (2016). Uropathogenic Escherichia coli releases extracellular vesicles that are associated with RNA. *PLoS ONE*, *11*(8). https://doi.org/10.1371/journal.pone.0160440

Bollu, P. C., & Sahota, P. (2017). Sleep and Parkinson Disease. In *Science Of Medicine Missouri Medicine |September* (Vol. 114).

Bonsergent, E., Grisard, E., Buchrieser, J., Schwartz, O., Théry, C., & Lavieu, G. (2021). Quantitative characterization of extracellular vesicle uptake and content delivery within mammalian cells. *Nature Communications*, *12*(1), 1864. https://doi.org/10.1038/s41467-021-22126-y

Bost, J. P., Saher, O., Hagey, D., Mamand, D. R., Liang, X., Zheng, W., Corso, G., Gustafsson, O., Görgens, A., Smith, C. E., Zain, R., El Andaloussi, S., & Gupta, D. (2022). Growth Media Conditions Influence the Secretion Route and Release Levels of Engineered Extracellular Vesicles. *Advanced Healthcare Materials*, *11*(5). https://doi.org/10.1002/adhm.202101658

Boulos, L., Prévost, M., Barbeau, B., Coallier, J., & Desjardins, R. (1999). LIVE/DEAD® BacLight™: application of a new rapid staining method for direct enumeration of viable and total bacteria in drinking water. *Journal of Microbiological Methods*, *37*(1), 77–86. https://doi.org/10.1016/S0167-7012(99)00048-2

Braak, H., Rüb, U., Gai, W. P., & Del Tredici, K. (2003). Idiopathic Parkinson's disease: Possible routes by which vulnerable neuronal types may be subject to neuroinvasion by an unknown pathogen. *Journal of Neural Transmission*, *110*(5), 517–536. https://doi.org/10.1007/s00702-002-0808-2

Braak, H., Tredici, K. Del, Rüb, U., de Vos, R. A. I., Jansen Steur, E. N. H., & Braak, E. (2003). Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease. *Neurobiology of Aging*, *24*(2), 197–211. https://doi.org/10.1016/S0197-4580(02)00065-9

Bradley, D. E. (1980). A function of Pseudomonas aeruginosa PAO polar pili: twitching motility. *Canadian Journal of Microbiology*, *26*(2), 146–154. https://doi.org/10.1139/m80-022

Breen, D. P., Halliday, G. M., & Lang, A. E. (2019). Gut–brain axis and the spread of α-synuclein pathology: Vagal highway or dead end? *Movement Disorders*, *34*(3), 307–316. https://doi.org/10.1002/mds.27556

Brown, R. (1828). XXVII. A brief account of microscopical observations made in the months of June, July and August 1827, on the particles contained in the pollen of plants; and on the general existence of active molecules in organic and inorganic bodies. *The Philosophical Magazine*, *4*(21), 161–173. https://doi.org/10.1080/14786442808674769

Brown, R. G., Landau, S., Hindle, J. V., Playfer, J., Samuel, M., Wilson, K. C., Hurt, C. S., Anderson, R. J., Carnell, J., Dickinson, L., Gibson, G., van Schaick, R., Sellwood, K., Thomas, B. A., & Burn, D. J. (2011). Depression and anxiety related subtypes in Parkinson's disease. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*, *82*(7), 803–809. https://doi.org/10.1136/jnnp.2010.213652

Bryant, W. A., Stentz, R., Gall, G. Le, Sternberg, M. J. E., Carding, S. R., & Wilhelm, T. (2017). In Silico analysis of the small molecule content of outer membrane vesicles produced by Bacteroides thetaiotaomicron indicates an extensive metabolic link between microbe and host. *Frontiers in Microbiology*, *8*(DEC). https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02440

Buffet-Bataillon, S., Bouguen, G., Fleury, F., Cattoir, V., & Le Cunff, Y. (2022). Gut microbiota analysis for prediction of clinical relapse in Crohn's disease. *Scientific Reports*, *12*(1). https://doi.org/10.1038/s41598-022-23757-x

Burgess, R. R. (2018). A brief practical review of size exclusion chromatography: Rules of thumb, limitations, and troubleshooting. *Protein Expression and Purification*, *150*, 81–85. https://doi.org/10.1016/j.pep.2018.05.007

Burnette, W. N. (1981). "Western Blotting": Electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Analytical Biochemistry*, *112*(2), 195–203. https://doi.org/10.1016/0003-2697(81)90281-5

Callahan, V., Hawks, S., Crawford, M. A., Lehman, C. W., Morrison, H. A., Ivester, H. M., Akhrymuk, I., Boghdeh, N., Flor, R., Finkielstein, C. V., Allen, I. C., Weger-Lucarelli, J., Duggal, N., Hughes, M. A., & Kehn-Hall, K. (2021). The Pro-Inflammatory Chemokines CXCL9, CXCL10 and CXCL11 Are Upregulated Following SARS-CoV-2 Infection in an AKT-Dependent Manner. *Viruses*, *13*(6), 1062. https://doi.org/10.3390/v13061062

Campos, P. C., Gomes, M. T. R., Guimarães, E. S., Guimarães, G., & Oliveira, S. C. (2017). TLR7 and TLR3 Sense Brucella abortus RNA to Induce Proinflammatory Cytokine Production but They Are Dispensable for Host Control of Infection. *Frontiers in Immunology*, *8*. https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00028

Cañas, M.-A., Giménez, R., Fábrega, M.-J., Toloza, L., Baldomà, L., & Badia, J. (2016). Outer Membrane Vesicles from the Probiotic Escherichia coli Nissle 1917 and the Commensal ECOR12 Enter Intestinal Epithelial Cells via Clathrin-Dependent Endocytosis and Elicit Differential Effects on DNA Damage. *PLOS ONE*, *11*(8), e0160374. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0160374

Caron, T. J., Scott, K. E., Sinha, N., Muthupalani, S., Baqai, M., Ang, L.-H., Li, Y., Turner, J. R., Fox, J. G., & Hagen, S. J. (2021). Claudin-18 Loss Alters Transcellular Chloride Flux but not Tight Junction Ion Selectivity in Gastric Epithelial Cells. *Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology*, *11*(3), 783–801. https://doi.org/10.1016/j.jcmgh.2020.10.005

Cassani, E., Privitera, G., Pezzoli, G., Pusani, C., Madio, C., Iorio, L., & Barichella, M. (2011). Use of probiotics for the treatment of constipation in Parkinson's disease patients. *Minerva Gastroenterologica e Dietologica*, *57*(2), 117–121.

Chakkour, M., Hammoud, Z., Farhat, S., El Roz, A., Ezzeddine, Z., & Ghssein, G. (2024). Overview of Proteus mirabilis pathogenicity and virulence. Insights into the role of metals. *Frontiers in Microbiology*, *15*. https://doi.org/10.3389/fmicb.2024.1383618

Chargaff, E., & West, R. (1946). The biological significance of the thromboplastic protein of blood. *The Journal of Biological Chemistry*, *166*(1), 189–197. https://doi.org/10.1016/s0021-9258(17)34997-9

Chiou, N.-T., Kageyama, R., & Ansel, K. M. (2018). Selective Export into Extracellular Vesicles and Function of tRNA Fragments during T Cell Activation. *Cell Reports*, *25*(12), 3356-3370.e4. https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.11.073

Chissoe, W. F., Vezey, E. L., & Skvarla, J. J. (1994). Hexamethyldisilazane as a drying agent for pollen scanning electron microscopy. *Biotechnic and Histochemistry*, *69*(4), 192–198. https://doi.org/10.3109/10520299409106286

Choi, J. G., Kim, N., Ju, I. G., Eo, H., Lim, S. M., Jang, S. E., Kim, D. H., & Oh, M. S. (2018). Oral administration of Proteus mirabilis damages dopaminergic neurons and motor functions in mice. *Scientific Reports*, *8*(1). https://doi.org/10.1038/s41598-018-19646-x

Choi, J. W., Kim, S. C., Hong, S. H., & Lee, H. J. (2017). Secretable Small RNAs via Outer Membrane Vesicles in Periodontal Pathogens. *Journal of Dental Research*, *96*(4), 458–466. https://doi.org/10.1177/0022034516685071

Chomczynski, P., & Sacchi, N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical Biochemistry*, *162*(1), 156–159. https://doi.org/10.1016/0003-2697(87)90021-2

Chomczynski, P., & Sacchi, N. (2006). The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction: Twenty-something years on. *Nature Protocols*, *1*(2), 581–585. https://doi.org/10.1038/nprot.2006.83

Chronopoulos, A., & Kalluri, R. (2020). Emerging role of bacterial extracellular vesicles in cancer. *Oncogene*, *39*(46), 6951–6960. https://doi.org/10.1038/s41388-020-01509-3

Clairembault, T., Leclair-Visonneau, L., Coron, E., Bourreille, A., Le Dily, S., Vavasseur, F., Heymann, M.-F., Neunlist, M., & Derkinderen, P. (2015). Structural alterations of the intestinal epithelial barrier in Parkinson's disease. *Acta Neuropathologica Communications*, *3*(1), 12. https://doi.org/10.1186/s40478-015-0196-0

Coccia, M., Harrison, O. J., Schiering, C., Asquith, M. J., Becher, B., Powrie, F., & Maloy, K. J. (2012). IL-1β mediates chronic intestinal inflammation by promoting the accumulation of IL-17A secreting innate lymphoid cells and CD4+ Th17 cells. *Journal of Experimental Medicine*, *209*(9), 1595–1609. https://doi.org/10.1084/jem.20111453

Cohen, J. (2013). *Statistical Power Analysis for the Behavioral Sciences*. Routledge. https://doi.org/10.4324/9780203771587

Colleselli, K., Stierschneider, A., & Wiesner, C. (2023). An Update on Toll-like Receptor 2, Its Function and Dimerization in Pro- and Anti-Inflammatory Processes. *International Journal of Molecular Sciences*, *24*(15), 12464. https://doi.org/10.3390/ijms241512464

Colombo, M., Raposo, G., & Théry, C. (2014). Biogenesis, secretion, and intercellular interactions of exosomes and other extracellular vesicles. In *Annual review of cell and developmental biology* (Vol. 30, pp. 255–289). https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-101512-122326

Contin, M., & Martinelli, P. (2010). Pharmacokinetics of levodopa. *Journal of Neurology*, *257*(S2), 253–261. https://doi.org/10.1007/s00415-010-5728-8

Crawford, N. (1971). The Presence of Contractile Proteins in Platelet Microparticles Isolated from Human and Animal Platelet-free Plasma. *British Journal of Haematology*, *21*(1), 53–69. https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.1971.tb03416.x

Cui, H., Liu, Y., Jiang, J., Liu, Y., Yang, Z., Wu, S., Cao, W., Cui, I. H., & Yu, C. (2016). IGF2-derived miR-483 mediated oncofunction by suppressing DLC-1 and associated with colorectal cancer. *Oncotarget*, *7*(30), 48456–48466. https://doi.org/10.18632/oncotarget.10309

Cvitkovitch, D. G., Li, Y.-H., & Ellen, R. P. (2003). Quorum sensing and biofilm formation in Streptococcal infections. *Journal of Clinical Investigation*, *112*(11), 1626–1632. https://doi.org/10.1172/JCI20430

Damier, P., Hirsch, E. C., Agid, Y., & Graybiel, A. M. (1999). The substantia nigra of the human brain. II. Patterns of loss of dopamine-containing neurons in Parkinson's disease. *Brain*, *122*(8), 1437–1448. https://doi.org/10.1093/brain/122.8.1437

Dash, N. R., Al Bataineh, M. T., Alili, R., Al Safar, H., Alkhayyal, N., Prifti, E., Zucker, J. D., Belda, E., & Clément, K. (2023). Functional alterations and predictive capacity of gut microbiome in type 2 diabetes. *Scientific Reports*, *13*(1). https://doi.org/10.1038/s41598-023-49679-w

Dauros-Singorenko, P., Blenkiron, C., Phillips, A., & Swift, S. (2018). The functional RNA cargo of bacterial membrane vesicles. In *FEMS Microbiology Letters* (Vol. 365, Issue 5). Oxford University Press. https://doi.org/10.1093/femsle/fny023

Dauros-Singorenko, P., Chang, V., Whitcombe, A., Simonov, D., Hong, J., Phillips, A., Swift, S., & Blenkiron, C. (2017). Isolation of membrane vesicles from prokaryotes: a technical and biological comparison reveals heterogeneity. *Journal of Extracellular Vesicles*, *6*(1). https://doi.org/10.1080/20013078.2017.1324731

Dauros-Singorenko, P., Hong, J., Swift, S., Phillips, A., & Blenkiron, C. (2020). Effect of the Extracellular Vesicle RNA Cargo From Uropathogenic Escherichia coli on Bladder Cells. *Frontiers in Molecular Biosciences*, *7*. https://doi.org/10.3389/fmolb.2020.580913

David, L. A., Maurice, C. F., Carmody, R. N., Gootenberg, D. B., Button, J. E., Wolfe, B. E., Ling, A. V., Devlin, A. S., Varma, Y., Fischbach, M. A., Biddinger, S. B., Dutton, R. J., & Turnbaugh, P. J. (2014). Diet rapidly and reproducibly alters the human gut microbiome. *Nature*, *505*(7484), 559–563. https://doi.org/10.1038/nature12820

Davies, J., Denyer, T., & Hadfield, J. (2016). Bioanalyzer Chips can be Used Interchangeably For Many Analyses Of DNA or RNA. *BioTechniques*, *60*(4), 197–199. https://doi.org/10.2144/000114403

Davis, Jr. , M. R., & Goldberg, J. B. (2012). Purification and Visualization of Lipopolysaccharide from Gram-negative Bacteria by Hot Aqueous-phenol Extraction. *Journal of Visualized Experiments*, *63*. https://doi.org/10.3791/3916

Davis, M. P. A., van Dongen, S., Abreu-Goodger, C., Bartonicek, N., & Enright, A. J. (2013). Kraken: A set of tools for quality control and analysis of high-throughput sequence data. *Methods*, *63*(1), 41–49. https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2013.06.027

Dean, S. N., Leary, D. H., Sullivan, C. J., Oh, E., & Walper, S. A. (2019). Isolation and characterization of Lactobacillus-derived membrane vesicles. *Scientific Reports*, *9*(1). https://doi.org/10.1038/s41598-018-37120-6

Deatheragea, B. L., & Cooksona, B. T. (2012). Membrane vesicle release in bacteria, eukaryotes, and archaea: A conserved yet underappreciated aspect of microbial life. In *Infection and Immunity* (Vol. 80, Issue 6, pp. 1948–1957). https://doi.org/10.1128/IAI.06014-11

Delihas, N., & Forst, S. (2001). MicF: an antisense RNA gene involved in response of Escherichia coli to global stress factors. *Journal of Molecular Biology*, *313*(1), 1–12. https://doi.org/10.1006/jmbi.2001.5029

Della Vittoria Scarpati, G., Calura, E., Di Marino, M., Romualdi, C., Beltrame, L., Malapelle, U., Troncone, G., De Stefano, A., Pepe, S., De Placido, S., D'Incalci, M., Marchini, S., & Carlomagno, C. (2014). Analysis of Differential miRNA Expression in Primary Tumor and Stroma of Colorectal Cancer Patients. *BioMed Research International*, *2014*, 1–8. https://doi.org/10.1155/2014/840921

Desjardins, P., & Conklin, D. (2010). NanoDrop Microvolume Quantitation of Nucleic Acids. *Journal of Visualized Experiments*, *1*. https://doi.org/10.3791/2565

Devos, D., Lebouvier, T., Lardeux, B., Biraud, M., Rouaud, T., Pouclet, H., Coron, E., Bruley des Varannes, S., Naveilhan, P., Nguyen, J.-M., Neunlist, M., & Derkinderen, P. (2013). Colonic inflammation in Parkinson's disease. *Neurobiology of Disease*, *50*, 42–48. https://doi.org/10.1016/j.nbd.2012.09.007

Dobin, A., Davis, C. A., Schlesinger, F., Drenkow, J., Zaleski, C., Jha, S., Batut, P., Chaisson, M., & Gingeras, T. R. (2013). STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinformatics*, *29*(1), 15–21. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts635

Doherty, G. J., & McMahon, H. T. (2009). Mechanisms of Endocytosis. *Annual Review of Biochemistry*, *78*(1), 857–902. https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.78.081307.110540

Doron, S., & Snydman, D. R. (2015). Risk and Safety of Probiotics. *Clinical Infectious Diseases*, *60*(suppl_2), S129–S134. https://doi.org/10.1093/cid/civ085

Dorward, D. W., & Garon, C. F. (1989). DNA-binding proteins in cells and membrane blebs of Neisseria gonorrhoeae. *Journal of Bacteriology*, *171*(8), 4196–4201. https://doi.org/10.1128/jb.171.8.4196-4201.1989

Dorward, D. W., & Garon, C. F. (1990). DNA Is Packaged within Membrane-Derived Vesicles of Gram-Negative but Not Gram-Positive Bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, *56*(6), 1960–1962. https://doi.org/10.1128/aem.56.6.1960-1962.1990

Dorward, D. W., Garon, C. F., & Judd, R. C. (1989). Export and intercellular transfer of DNA via membrane blebs of Neisseria gonorrhoeae. *Journal of Bacteriology*, *171*(5), 2499–2505. https://doi.org/10.1128/jb.171.5.2499-2505.1989

Doss, J. F., Corcoran, D. L., Jima, D. D., Telen, M. J., Dave, S. S., & Chi, J. T. (2015). A comprehensive joint analysis of the long and short RNA transcriptomes of human erythrocytes. *BMC Genomics*, *16*(1). https://doi.org/10.1186/s12864-015-2156-2

Dou, X., Qiao, L., Chang, J., Yan, S., Song, X., Chen, Y., Xu, Q., & Xu, C. (2021). Lactobacillus casei ATCC 393 and it's metabolites alleviate dextran sulphate sodium-induced ulcerative colitis in mice through the NLRP3-(Caspase-1)/IL-1β pathway. *Food & Function*, *12*(23), 12022–12035. https://doi.org/10.1039/D1FO02405A

D'Souza, W. N., Douangpanya, J., Mu, S., Jaeckel, P., Zhang, M., Maxwell, J. R., Rottman, J. B., Labitzke, K., Willee, A., Beckmann, H., Wang, Y., Li, Y., Schwandner, R., Johnston, J. A., Towne, J. E., & Hsu, H. (2017). Differing roles for short chain fatty acids and GPR43 agonism in the regulation of intestinal barrier function and immune responses. *PLOS ONE*, *12*(7), e0180190. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0180190

Eckburg, P. B., Bik, E. M., Bernstein, C. N., Purdom, E., Dethlefsen, L., Sargent, M., Gill, S. R., Nelson, K. E., & Relman, D. A. (2005). Diversity of the Human Intestinal Microbial Flora. *Science*, *308*(5728), 1635–1638. https://doi.org/10.1126/science.1110591

Eddy, S. R. (2001). Non–coding RNA genes and the modern RNA world. *Nature Reviews Genetics*, *2*(12), 919–929. https://doi.org/10.1038/35103511

Eitan, E., Zhang, S., Witwer, K. W., & Mattson, M. P. (2015). Extracellular vesicle–depleted fetal bovine and human sera have reduced capacity to support cell growth. *Journal of Extracellular Vesicles*, *4*(1). https://doi.org/10.3402/jev.v4.26373

El Andaloussi, S., Mäger, I., Breakefield, X. O., & Wood, M. J. A. (2013). Extracellular vesicles: Biology and emerging therapeutic opportunities. In *Nature Reviews Drug Discovery* (Vol. 12, Issue 5, pp. 347–357). https://doi.org/10.1038/nrd3978

Escrevente, C., Keller, S., Altevogt, P., & Costa, J. (2011). Interaction and uptake of exosomes by ovarian cancer cells. *BMC Cancer*, *11*(1), 108. https://doi.org/10.1186/1471-2407-11-108

Eun, C. S., Kim, Y. S., Han, D. S., Choi, J. H., Lee, A. R., & Park, Y. K. (2011). Lactobacillus casei prevents impaired barrier function in intestinal epithelial cells. *APMIS*, *119*(1), 49–56. https://doi.org/10.1111/j.1600-0463.2010.02691.x

Evans, W. H. (2015). Cell communication across gap junctions: A historical perspective and current developments. In *Biochemical Society Transactions* (Vol. 43, pp. 450–459). Portland Press Ltd. https://doi.org/10.1042/BST20150056

Ewels, P., Magnusson, M., Lundin, S., & Käller, M. (2016). MultiQC: summarize analysis results for multiple tools and samples in a single report. *Bioinformatics*, *32*(19), 3047–3048. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btw354

Farhat, K., Riekenberg, S., Heine, H., Debarry, J., Lang, R., Mages, J., Buwitt-Beckmann, U., Röschmann, K., Jung, G., Wiesmüller, K.-H., & Ulmer, A. J. (2008). Heterodimerization of TLR2 with TLR1 or TLR6 expands the ligand spectrum but does not lead to differential signaling. *Journal of Leukocyte Biology*, *83*(3), 692–701. https://doi.org/10.1189/jlb.0807586

Fehlmann, T., Kern, F., Laham, O., Backes, C., Solomon, J., Hirsch, P., Volz, C., Müller, R., & Keller, A. (2021). miRMaster 2.0: multi-species non-coding RNA sequencing analyses at scale. *Nucleic Acids Research*, *49*(W1), W397–W408. https://doi.org/10.1093/nar/gkab268

Felgner, P. L., Gadek, T. R., Holm, M., Roman, R., Chan, H. W., Wenz, M., Northrop, J. P., & Ringold, G. M. (1987). Lipofection: A highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure (liposomes/cationic lipid vesicles/gene transfer). In *Proc. Nati. Acad. Sci. USA* (Vol. 84).

Feng, D., Zhao, W.-L., Ye, Y.-Y., Bai, X.-C., Liu, R.-Q., Chang, L.-F., Zhou, Q., & Sui, S.-F. (2010). Cellular Internalization of Exosomes Occurs Through Phagocytosis. *Traffic*, *11*(5), 675–687. https://doi.org/10.1111/j.1600-0854.2010.01041.x

Fernandes, A. D., Macklaim, J. M., Linn, T. G., Reid, G., & Gloor, G. B. (2013). ANOVA-Like Differential Expression (ALDEx) Analysis for Mixed Population RNA-Seq. *PLoS ONE*, *8*(7), e67019. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0067019

Fernley, J. M., & Lees, A. J. (1991). Aging and Parkinson's Disease: Sustantia Nigra Regional Selectivity. *Brain*, *114*(5), 2283–2301. https://doi.org/10.1093/brain/114.5.2283

Fogh, J., Wright, W. C., & Loveless, J. D. (1977). Absence of HeLa Cell Contamination in 169 Cell Lines Derived From Human Tumors2. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*, *58*(2), 209–214. https://doi.org/10.1093/jnci/58.2.209

Forsyth, C. B., Shannon, K. M., Kordower, J. H., Voigt, R. M., Shaikh, M., Jaglin, J. A., Estes, J. D., Dodiya, H. B., & Keshavarzian, A. (2011). Increased Intestinal Permeability Correlates with Sigmoid Mucosa alpha-Synuclein Staining and Endotoxin Exposure Markers in Early Parkinson's Disease. *PLoS ONE*, *6*(12), e28032. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0028032

Fu, S.-C., Shih, L.-C., Wu, P.-H., Hsieh, Y.-C., Lee, C.-H., Lin, S.-H., & Wang, H. (2022). Exploring the Causal Effect of Constipation on Parkinson's Disease Through Mediation Analysis of Microbial Data. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, *12*. https://doi.org/10.3389/fcimb.2022.871710

Funda, D. P., Tučková, L., Farré, M. A., Iwase, T., Moro, I., & Tlaskalová-Hogenová, H. (2001). CD14 Is Expressed and Released as Soluble CD14 by Human Intestinal Epithelial Cells In Vitro: Lipopolysaccharide Activation of Epithelial Cells Revisited. *Infection and Immunity*, *69*(6), 3772–3781. https://doi.org/10.1128/IAI.69.6.3772-3781.2001

Furrie, E., Macfarlane, S., Thomson, G., & Macfarlane, G. T. (2005). Toll-like receptors-2, -3 and -4 expression patterns on human colon and their regulation by mucosal-associated bacteria. *Immunology*, *115*(4), 565–574. https://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2005.02200.x

Gallagher, S. R. (2006). One-Dimensional SDS Gel Electrophoresis of Proteins. *Current Protocols in Immunology*, *75*(1). https://doi.org/10.1002/0471142735.im0804s75

Gandhi, A., & Shah, N. P. (2016). Effect of salt stress on morphology and membrane composition of Lactobacillus acidophilus, Lactobacillus casei, and Bifidobacterium bifidum, and their adhesion to human intestinal epithelial-like Caco-2 cells. *Journal of Dairy Science*, *99*(4), 2594–2605. https://doi.org/10.3168/jds.2015-10718

Gao, H., Gao, Y., Yang, C., Dong, D., Yang, J., Peng, G., Peng, J., Wang, Y., Pan, C., & Dong, W. (2018). Influence of outer membrane vesicles of Proteus mirabilis isolated from boar semen on sperm function. *Veterinary Microbiology*, *224*, 34–42. https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2018.08.017

Garcia-Hernandez, V., Quiros, M., & Nusrat, A. (2017). Intestinal epithelial claudins: expression and regulation in homeostasis and inflammation. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *1397*(1), 66–79. https://doi.org/10.1111/nyas.13360

Gardiner, C., Di Vizio, D., Sahoo, S., Théry, C., Witwer, K. W., Wauben, M., & Hill, A. F. (2016). Techniques used for the isolation and characterization of extracellular vesicles: results of a worldwide survey. *Journal of Extracellular Vesicles*, *5*(1). https://doi.org/10.3402/jev.v5.32945

Gasser, T. (2005). Genetics of Parkinson's disease. *Current Opinion in Neurology*, *18*(4), 363–369. https://doi.org/10.1097/01.wco.0000170951.08924.3d

Gerstner, N., Kehl, T., Lenhof, K., Müller, A., Mayer, C., Eckhart, L., Grammes, N. L., Diener, C., Hart, M., Hahn, O., Walter, J., Wyss-Coray, T., Meese, E., Keller, A., & Lenhof, H.-P. (2020). GeneTrail 3: advanced high-throughput enrichment analysis. *Nucleic Acids Research*, *48*(W1), W515–W520. https://doi.org/10.1093/nar/gkaa306

Gezer, U., Özgür, E., Cetinkaya, M., Isin, M., & Dalay, N. (2014). Long non-coding RNAs with low expression levels in cells are enriched in secreted exosomes. *Cell Biology International*, *38*(9), 1076–1079. https://doi.org/10.1002/cbin.10301

Ghosal, A., Upadhyaya, B. B., Fritz, J. V., Heintz-Buschart, A., Desai, M. S., Yusuf, D., Huang, D., Baumuratov, A., Wang, K., Galas, D., & Wilmes, P. (2015). The extracellular RNA complement of Escherichia coli. *MicrobiologyOpen*, *4*(2), 252–266. https://doi.org/10.1002/mbo3.235

Goes, A., Lapuhs, P., Kuhn, T., Schulz, E., Richter, R., Panter, F., Dahlem, C., Koch, M., Garcia, R., Kiemer, A. K., Müller, R., & Fuhrmann, G. (2020). Myxobacteria-Derived Outer Membrane Vesicles: Potential Applicability Against Intracellular Infections. *Cells*, *9*(1), 194. https://doi.org/10.3390/cells9010194

Grahl, M. V. C., Andrade, B. da S., Perin, A. P. A., Neves, G. A., Duarte, L. de S., Uberti, A. F., Hohl, K. S., Follmer, C., & Carlini, C. R. (2023). Could the Urease of the Gut Bacterium Proteus mirabilis Play a Role in the Altered Gut–Brain Talk Associated with Parkinson's Disease? *Microorganisms*, *11*(8), 2042. https://doi.org/10.3390/microorganisms11082042

Green, M. R., & Sambrook, J. (2016). Precipitation of DNA with Ethanol. *Cold Spring Harbor Protocols*, *2016*(12), pdb.prot093377. https://doi.org/10.1101/pdb.prot093377

Green, M. R., & Sambrook, J. (2019). Analysis of DNA by Agarose Gel Electrophoresis. *Cold Spring Harbor Protocols*, *2019*(1), pdb.top100388. https://doi.org/10.1101/pdb.top100388

Greenfield, J. G., & Bosanquet, F. D. (1953). The brain-stem lesions in Parkinsonism. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*, *16*(4), 213–226. https://doi.org/10.1136/jnnp.16.4.213

Gudala, K., Kanukula, R., & Bansal, D. (2015). Reduced Risk of Parkinson's Disease in Users of Calcium Channel Blockers: A Meta-Analysis. *International Journal of Chronic Diseases*, *2015*, 1–7. https://doi.org/10.1155/2015/697404

Guescini, M., Genedani, S., Stocchi, V., & Agnati, L. F. (2010). Astrocytes and Glioblastoma cells release exosomes carrying mtDNA. *Journal of Neural Transmission*, *117*(1), 1–4. https://doi.org/10.1007/s00702-009-0288-8

Günzel, D., & Fromm, M. (2012). Claudins and Other Tight Junction Proteins. In *Comprehensive Physiology* (pp. 1819–1852). Wiley. https://doi.org/10.1002/cphy.c110045

Guo, S., Al-Sadi, R., Said, H. M., & Ma, T. Y. (2013). Lipopolysaccharide Causes an Increase in Intestinal Tight Junction Permeability in Vitro and in Vivo by Inducing Enterocyte Membrane Expression and Localization of TLR-4 and CD14. *The American Journal of Pathology*, *182*(2), 375–387. https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2012.10.014

György, B., Szabó, T. G., Pásztói, M., Pál, Z., Misják, P., Aradi, B., László, V., Pállinger, É., Pap, E., Kittel, Á., Nagy, G., Falus, A., & Buzás, E. I. (2011). Membrane vesicles, current state-of-the-art: Emerging role of extracellular vesicles. In *Cellular and Molecular Life Sciences* (Vol. 68, Issue 16, pp. 2667–2688). https://doi.org/10.1007/s00018-011-0689-3

Haehner, A., Boesveldt, S., Berendse, H. W., Mackay-Sim, A., Fleischmann, J., Silburn, P. A., Johnston, A. N., Mellick, G. D., Herting, B., Reichmann, H., & Hummel, T. (2009). Prevalence of smell loss in Parkinson's disease - A multicenter study. *Parkinsonism and Related Disorders*, *15*(7), 490–494. https://doi.org/10.1016/j.parkreldis.2008.12.005

Hagemann, S., Stöger, L., Kappelmann, M., Hassl, I., Ellinger, A., & Velimirov, B. (2014). DNA-bearing membrane vesicles produced by Ahrensia kielensis and Pseudoalteromonas marina. *Journal of Basic Microbiology*, *54*(10), 1062–1072. https://doi.org/10.1002/jobm.201300376

Hammer, B. K., & Bassler, B. L. (2003). Quorum sensing controls biofilm formation in Vibrio cholerae. *Molecular Microbiology*, *50*(1), 101–104. https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2003.03688.x

Handly, L. N., Pilko, A., & Wollman, R. (2015). Paracrine communication maximizes cellular response fidelity in wound signaling. *ELife*, *4*. https://doi.org/10.7554/eLife.09652

Haraszti, R. A., Didiot, M., Sapp, E., Leszyk, J., Shaffer, S. A., Rockwell, H. E., Gao, F., Narain, N. R., DiFiglia, M., Kiebish, M. A., Aronin, N., & Khvorova, A. (2016). High-resolution proteomic and lipidomic analysis of exosomes and microvesicles from different cell sources. *Journal of Extracellular Vesicles*, *5*(1). https://doi.org/10.3402/jev.v5.32570

Hasegawa, S., Goto, S., Tsuji, H., Okuno, T., Asahara, T., Nomoto, K., Shibata, A., Fujisawa, Y., Minato, T., Okamoto, A., Ohno, K., & Hirayama, M. (2015). Intestinal dysbiosis and lowered serum lipopolysaccharide-binding protein in Parkinson's disease. *PLoS ONE*, *10*(11). https://doi.org/10.1371/journal.pone.0142164

He, R., Xie, X., Lv, L., Huang, Y., Xia, X., Chen, X., & Zhang, L. (2017). Comprehensive investigation of aberrant microRNAs expression in cells culture model of MnCl2-induced neurodegenerative disease. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *486*(2), 342–348. https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2017.03.041

Heumann, D., & Roger, T. (2002). Initial responses to endotoxins and Gram-negative bacteria. *Clinica Chimica Acta*, *323*(1–2), 59–72. https://doi.org/10.1016/S0009-8981(02)00180-8

Hewel, C., Kaiser, J., Wierczeiko, A., Linke, J., Reinhardt, C., Endres, K., & Gerber, S. (2019). Common miRNA Patterns of Alzheimer's Disease and Parkinson's Disease and Their Putative Impact on Commensal Gut Microbiota. *Frontiers in Neuroscience*, *13*. https://doi.org/10.3389/fnins.2019.00113

Hill-Burns, E. M., Debelius, J. W., Morton, J. T., Wissemann, W. T., Lewis, M. R., Wallen, Z. D., Peddada, S. D., Factor, S. A., Molho, E., Zabetian, C. P., Knight, R., & Payami, H. (2017). Parkinson's disease and Parkinson's disease medications have distinct signatures of the gut microbiome. *Movement Disorders*, *32*(5), 739–749. https://doi.org/10.1002/mds.26942

Hjertén, S. (1964). The preparation of agarose spheres for chromatography of molecules and particles. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Specialized Section on Biophysical Subjects*, *79*(2), 393–398. https://doi.org/10.1016/0926-6577(64)90020-8

Hjertén, S., & Mosbach, R. (1962). "Molecular-sieve" chromatography of proteins on columns of cross-linked polyacrylamide. *Analytical Biochemistry*, *3*(2), 109–118. https://doi.org/10.1016/0003-2697(62)90100-8

Hobson, P., & Meara, J. (2004). Risk and incidence of dementia in a cohort of older subjects with Parkinson's disease in the United Kingdom. *Movement Disorders*, *19*(9), 1043–1049. https://doi.org/10.1002/mds.20216

Hoebe, K., Georgel, P., Rutschmann, S., Du, X., Mudd, S., Crozat, K., Sovath, S., Shamel, L., Hartung, T., Zähringer, U., & Beutler, B. (2005). CD36 is a sensor of diacylglycerides. *Nature*, *433*(7025), 523–527. https://doi.org/10.1038/nature03253

Hoekstra, D., van der Laan, J. W., de Leij, L., & Witholt, B. (1976). Release of outer membrane fragments from normally growing Escherichia coli. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, *455*(3), 889–899. https://doi.org/10.1016/0005-2736(76)90058-4

Hopfner, F., Künstner, A., Müller, S. H., Künzel, S., Zeuner, K. E., Margraf, N. G., Deuschl, G., Baines, J. F., & Kuhlenbäumer, G. (2017). Gut microbiota in Parkinson disease in a northern German cohort. *Brain Research*, *1667*, 41–45. https://doi.org/10.1016/j.brainres.2017.04.019

Hopfner, F., Wod, M., Höglinger, G. U., Blaabjerg, M., Rösler, T. W., Kuhlenbäumer, G., Christensen, K., Deuschl, G., & Pottegård, A. (2019). Use of β2-adrenoreceptor agonist and antagonist drugs and risk of Parkinson disease. *Neurology*, *93*(2). https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000007694

Hornung, V., Barchet, W., Schlee, M., & Hartmann, G. (2008). *RNA Recognition via TLR7 and TLR8* (pp. 71–86). https://doi.org/10.1007/978-3-540-72167-3_4

Houser, M. C., & Tansey, M. G. (2017). The gut-brain axis: is intestinal inflammation a silent driver of Parkinson's disease pathogenesis? *Npj Parkinson's Disease*, *3*(1), 3. https://doi.org/10.1038/s41531-016-0002-0

Hsu, L. J., Sagara, Y., Arroyo, A., Rockenstein, E., Sisk, A., Mallory, M., Wong, J., Takenouchi, T., Hashimoto, M., & Masliah, E. (2000). α-Synuclein Promotes Mitochondrial Deficit and Oxidative Stress. *The American Journal of Pathology*, *157*(2), 401–410. https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)64553-1

Huang, C.-H., Li, S.-W., Huang, L., & Watanabe, K. (2018). Identification and Classification for the Lactobacillus casei Group. *Frontiers in Microbiology*, *9*. https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01974

Huang, Y., Liao, J., Liu, X., Zhong, Y., Cai, X., & Long, L. (2021). Review: The Role of Intestinal Dysbiosis in Parkinson's Disease. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, *11*. https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.615075

Hughes, D. T., & Sperandio, V. (2008). Inter-kingdom signalling: Communication between bacteria and their hosts. In *Nature Reviews Microbiology* (Vol. 6, Issue 2, pp. 111–120). https://doi.org/10.1038/nrmicro1836

Hurbain, I., & Sachse, M. (2011). The future is cold: cryo-preparation methods for transmission electron microscopy of cells. *Biology of the Cell*, *103*(9), 405–420. https://doi.org/10.1042/BC20110015

Hutvágner, G., & Zamore, P. D. (2002). A microRNA in a Multiple-Turnover RNAi Enzyme Complex. *Science*, *297*(5589), 2056–2060. https://doi.org/10.1126/science.1073827

Iwanaga, S., Morita, T., Harada, T., Nakamura, S., Niwa, M., Takada, K., Kimura, T., & Sakakibara, S. (1978). Chromogenic Substrates for Horseshoe Crab Clotting Enzyme. *Pathophysiology of Haemostasis and Thrombosis*, *7*(2–3), 183–188. https://doi.org/10.1159/000214260

Iyaswamy, A., Lu, K., Guan, X.-J., Kan, Y., Su, C., Liu, J., Jaganathan, R., Vasudevan, K., Paul, J., Thakur, A., & Li, M. (2023). Impact and Advances in the Role of Bacterial Extracellular Vesicles in Neurodegenerative Disease and Its Therapeutics. *Biomedicines*, *11*(7), 2056. https://doi.org/10.3390/biomedicines11072056

Jameson, K. G., & Hsiao, E. Y. (2019). A novel pathway for microbial metabolism of levodopa. *Nature Medicine*, *25*(8), 1195–1197. https://doi.org/10.1038/s41591-019-0544-x

Jandhyala, S. M., Talukdar, R., Subramanyam, C., Vuyyuru, H., Sasikala, M., & Reddy, D. N. (2015). Role of the normal gut microbiota. *World Journal of Gastroenterology*, *21*(29), 8836–8847. https://doi.org/10.3748/wjg.v21.i29.8787

Jenjaroenpun, P., Kremenska, Y., Nair, V. M., Kremenskoy, M., Joseph, B., & Kurochkin, I. V. (2013). Characterization of RNA in exosomes secreted by human breast cancer cell lines using next-generation sequencing. *PeerJ*, *1*, e201. https://doi.org/10.7717/peerj.201

Ji, H., Chen, M., Greening, D. W., He, W., Rai, A., Zhang, W., & Simpson, R. J. (2014). Deep Sequencing of RNA from Three Different Extracellular Vesicle (EV) Subtypes Released from the Human LIM1863 Colon Cancer Cell Line Uncovers Distinct Mirna-Enrichment Signatures. *PLoS ONE*, *9*(10), e110314. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0110314

Jiang, L., Paone, S., Caruso, S., Atkin-Smith, G. K., Phan, T. K., Hulett, M. D., & Poon, I. K. H. (2017). Determining the contents and cell origins of apoptotic bodies by flow cytometry. *Scientific Reports*, *7*(1). https://doi.org/10.1038/s41598-017-14305-z

Jiang, Z., Georgel, P., Du, X., Shamel, L., Sovath, S., Mudd, S., Huber, M., Kalis, C., Keck, S., Galanos, C., Freudenberg, M., & Beutler, B. (2005). CD14 is required for MyD88-independent LPS signaling. *Nature Immunology*, *6*(6), 565–570. https://doi.org/10.1038/ni1207

Jimenez-Dalmaroni, M. J., Xiao, N., Corper, A. L., Verdino, P., Ainge, G. D., Larsen, D. S., Painter, G. F., Rudd, P. M., Dwek, R. A., Hoebe, K., Beutler, B., & Wilson, I. A. (2009). Soluble CD36 Ectodomain Binds Negatively Charged Diacylglycerol Ligands and Acts as a Co-Receptor for TLR2. *PLoS ONE*, *4*(10), e7411. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0007411

Johnstone, R. M., Adam, M., Hammond, J. R., Orr, L., & Turbide, C. (1987). Vesicle formation during reticulocyte maturation. Association of plasma membrane activities with released vesicles (exosomes). *Journal of Biological Chemistry*, *262*(19), 9412–9420. https://doi.org/10.1016/s0021-9258(18)48095-7

Jones, L. J., Yue, S. T., Cheung, C.-Y., & Singer, V. L. (1998). RNA Quantitation by Fluorescence-Based Solution Assay: RiboGreen Reagent Characterization. *Analytical Biochemistry*, *265*(2), 368–374. https://doi.org/10.1006/abio.1998.2914

Joshi, B., Singh, B., Nadeem, A., Askarian, F., Wai, S. N., Johannessen, M., & Hegstad, K. (2021). Transcriptome Profiling of Staphylococcus aureus Associated Extracellular Vesicles Reveals Presence of Small RNA-Cargo. *Frontiers in Molecular Biosciences*, *7*. https://doi.org/10.3389/fmolb.2020.566207

Kadurugamuwa, J. L., & Beveridge, T. J. (1995). Virulence Factors Are Released from Pseudomonas aeruginosa in Association with Membrane Vesicles during Normal Growth and Exposure to Gentamicin: a Novel Mechanism of Enzyme Secretion. In *JOURNAL OF BACTERIOLOGY* (Vol. 177, Issue 14).

Kahlert, C., Melo, S. A., Protopopov, A., Tang, J., Seth, S., Koch, M., Zhang, J., Weitz, J., Chin, L., Futreal, A., & Kalluri, R. (2014). Identification of Double-stranded Genomic DNA Spanning All Chromosomes with Mutated KRAS and p53 DNA in the Serum Exosomes of Patients with Pancreatic Cancer. *Journal of Biological Chemistry*, *289*(7), 3869–3875. https://doi.org/10.1074/jbc.C113.532267

Kaiser, D. (1979). Social gliding is correlated with the presence of pili in Myxococcus xanthus. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *76*(11), 5952–5956. https://doi.org/10.1073/pnas.76.11.5952

Kalluri, R., & LeBleu, V. S. (2020). The biology, function, and biomedical applications of exosomes. *Science*, *367*(6478). https://doi.org/10.1126/science.aau6977

Kang, C., Wang, L., Kang, M., Liu, X., Fu, Y., & Gao, J. (2019). Baicalin alleviates 6-hydroxydopamine-induced neurotoxicity in PC12 cells by down-regulation of microRNA-192-5p. *Brain Research*, *1708*, 84–92. https://doi.org/10.1016/j.brainres.2018.12.015

Karthikeyan, R., Gayathri, P., Gunasekaran, P., Jagannadham, M. V., & Rajendhran, J. (2019). Comprehensive proteomic analysis and pathogenic role of membrane vesicles of Listeria monocytogenes serotype 4b reveals proteins associated with virulence and their possible interaction with host. *International Journal of Medical Microbiology*, *309*(3–4), 199–212. https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2019.03.008

Karthikeyan, R., Gayathri, P., Ramasamy, S., Suvekbala, V., Jagannadham, M. V., & Rajendhran, J. (2023). Transcriptome responses of intestinal epithelial cells induced by membrane vesicles of Listeria monocytogenes. *Current Research in Microbial Sciences*, *4*. https://doi.org/10.1016/j.crmicr.2023.100185

Kelly, L. P., Carvey, P. M., Keshavarzian, A., Shannon, K. M., Shaikh, M., Bakay, R. A. E., & Kordower, J. H. (2014). Progression of intestinal permeability changes and alpha-synuclein expression in a mouse model of Parkinson's disease. *Movement Disorders*, *29*(8), 999–1009. https://doi.org/10.1002/mds.25736

Keshavarzian, A., Green, S. J., Engen, P. A., Voigt, R. M., Naqib, A., Forsyth, C. B., Mutlu, E., & Shannon, K. M. (2015). Colonic bacterial composition in Parkinson's disease. *Movement Disorders*, *30*(10), 1351–1360. https://doi.org/10.1002/mds.26307

Khoo, S. K., Petillo, D., Kang, U. J., Resau, J. H., Berryhill, B., Linder, J., Forsgren, L., Neuman, L. A., & Tan, A. C. (2012). Plasma-Based Circulating MicroRNA Biomarkers for Parkinson's Disease. *Journal of Parkinson's Disease*, *2*(4), 321–331. https://doi.org/10.3233/JPD-012144

Kim, C., Lv, G., Lee, J. S., Jung, B. C., Masuda-Suzukake, M., Hong, C.-S., Valera, E., Lee, H.-J., Paik, S. R., Hasegawa, M., Masliah, E., Eliezer, D., & Lee, S.-J. (2016). Exposure to bacterial endotoxin generates a distinct strain of α-synuclein fibril. *Scientific Reports*, *6*(1), 30891. https://doi.org/10.1038/srep30891

Kim, T. K., & Eberwine, J. H. (2010). Mammalian cell transfection: The present and the future. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, *397*(8), 3173–3178. https://doi.org/10.1007/s00216-010-3821-6

Klein, M. O., Battagello, D. S., Cardoso, A. R., Hauser, D. N., Bittencourt, J. C., & Correa, R. G. (2019). Dopamine: Functions, Signaling, and Association with Neurological Diseases. *Cellular and Molecular Neurobiology*, *39*(1), 31–59. https://doi.org/10.1007/s10571-018-0632-3

Kleiveland, C. R. (2015). Co-culture Caco-2/Immune Cells. In *The Impact of Food Bioactives on Health* (pp. 197–205). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-16104-4_18

Knox, K. W., Vesk, M., & Work, E. (1966). Relation Between Excreted Lipopolysaccharide Complexes and Surface Structures of a Lysine-Limited Culture of Escherichia coli. In *JOURNAL OF BACTERIOLOGY*. https://journals.asm.org/journal/jb

Koeppen, K., Hampton, T. H., Jarek, M., Scharfe, M., Gerber, S. A., Mielcarz, D. W., Demers, E. G., Dolben, E. L., Hammond, J. H., Hogan, D. A., & Stanton, B. A. (2016). A Novel Mechanism of Host-Pathogen Interaction through sRNA in Bacterial Outer Membrane Vesicles. *PLOS Pathogens*, *12*(6), e1005672. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005672

Koppers-Lalic, D., Hackenberg, M., Bijnsdorp, I. V., van Eijndhoven, M. A. J., Sadek, P., Sie, D., Zini, N., Middeldorp, J. M., Ylstra, B., de Menezes, R. X., Würdinger, T., Meijer, G. A., & Pegtel, D. M. (2014). Nontemplated Nucleotide Additions Distinguish the Small RNA Composition in Cells from Exosomes. *Cell Reports*, *8*(6), 1649–1658. https://doi.org/10.1016/j.celrep.2014.08.027

Krause, A. L., Stinear, T. P., & Monk, I. R. (2022). Barriers to genetic manipulation of Enterococci: Current Approaches and Future Directions. *FEMS Microbiology Reviews*, *46*(6). https://doi.org/10.1093/femsre/fuac036

Kuhn, T., Koch, M., & Fuhrmann, G. (2020). Probiomimetics—Novel Lactobacillus-Mimicking Microparticles Show Anti-Inflammatory and Barrier-Protecting Effects in Gastrointestinal Models. *Small*, *16*(40). https://doi.org/10.1002/smll.202003158

Kumar, P., Nagarajan, A., & Uchil, P. D. (2018). Analysis of cell viability by the lactate dehydrogenase assay. *Cold Spring Harbor Protocols*, *2018*(6), 465–468. https://doi.org/10.1101/pdb.prot095497

Kunsmann, L., Rüter, C., Bauwens, A., Greune, L., Glüder, M., Kemper, B., Fruth, A., Wai, S. N., He, X., Lloubes, R., Schmidt, M. A., Dobrindt, U., Mellmann, A., Karch, H., & Bielaszewska, M. (2015). Virulence from vesicles: Novel mechanisms of host cell injury by Escherichia coli O104:H4 outbreak strain. *Scientific Reports*, *5*. https://doi.org/10.1038/srep13252

Kurtzke, J. F., & Goldberg, I. D. (1988). Parkinsonism death rates by race, sex, and geography. *Neurology*, *38*(10), 1558–1558. https://doi.org/10.1212/WNL.38.10.1558

Lacotte, S., Brun, S., Muller, S., & Dumortier, H. (2009). CXCR3, Inflammation, and Autoimmune Diseases. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *1173*(1), 310–317. https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2009.04813.x

Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature*, *227*(5259), 680–685. https://doi.org/10.1038/227680a0

Lathe, G. H., & Ruthven, C. R. J. (1956). The separation of substances and estimation of their relative molecular sizes by the use of columns of starch in water. *Biochemical Journal*, *62*(4), 665–674. https://doi.org/10.1042/bj0620665

Le, L. H. M., Elgamoudi, B., Colon, N., Cramond, A., Poly, F., Ying, L., Korolik, V., & Ferrero, R. L. (2024). Campylobacter jejuni extracellular vesicles harboring cytolethal distending toxin bind host cell glycans and induce cell cycle arrest in host cells. *Microbiology Spectrum*, *12*(3). https://doi.org/10.1128/spectrum.03232-23

Le, M. T. N., Hamar, P., Guo, C., Basar, E., Perdigão-Henriques, R., Balaj, L., & Lieberman, J. (2014). miR-200–containing extracellular vesicles promote breast cancer cell metastasis. *Journal of Clinical Investigation*, *124*(12), 5109–5128. https://doi.org/10.1172/JCI75695

LeBlanc, J. G., Milani, C., de Giori, G. S., Sesma, F., van Sinderen, D., & Ventura, M. (2013). Bacteria as vitamin suppliers to their host: a gut microbiota perspective. *Current Opinion in Biotechnology*, *24*(2), 160–168. https://doi.org/10.1016/j.copbio.2012.08.005

Lee, E., Bang, J. Y., Park, G. W., Choi, D., Kang, J. S., Kim, H., Park, K., Lee, J., Kim, Y., Kwon, K., Kim, K., & Gho, Y. S. (2007). Global proteomic profiling of native outer membrane vesicles derived from Escherichia coli. *PROTEOMICS*, *7*(17), 3143–3153. https://doi.org/10.1002/pmic.200700196

Lee, E., Choi, D., Kim, D., Kim, J., Park, J. O., Kim, S., Kim, S., Desiderio, D. M., Kim, Y., Kim, K., & Gho, Y. S. (2009). Gram-positive bacteria produce membrane vesicles: Proteomics-based characterization of Staphylococcus aureus-derived membrane vesicles. *PROTEOMICS*, *9*(24), 5425–5436. https://doi.org/10.1002/pmic.200900338

Lee, H.-J. (2019). Microbe-Host Communication by Small RNAs in Extracellular Vesicles: Vehicles for Transkingdom RNA Transportation. *International Journal of Molecular Sciences*, *20*(6), 1487. https://doi.org/10.3390/ijms20061487

Lee, P. Y., Costumbrado, J., Hsu, C.-Y., & Kim, Y. H. (2012). Agarose Gel Electrophoresis for the Separation of DNA Fragments. *Journal of Visualized Experiments*, *62*. https://doi.org/10.3791/3923

Lehrich, B. M., Liang, Y., & Fiandaca, M. S. (2021). Foetal bovine serum influence on in vitro extracellular vesicle analyses. *Journal of Extracellular Vesicles*, *10*(3). https://doi.org/10.1002/jev2.12061

Lehrich, B. M., Liang, Y., Khosravi, P., Federoff, H. J., & Fiandaca, M. S. (2018). Fetal bovine serum-derived extracellular vesicles persist within vesicle-depleted culture media.

International Journal of Molecular Sciences, *19*(11). https://doi.org/10.3390/ijms19113538

Leite, G., Pimentel, M., Barlow, G. M., Chang, C., Hosseini, A., Wang, J., Parodi, G., Sedighi, R., Rezaie, A., & Mathur, R. (2021). Age and the aging process significantly alter the small bowel microbiome. *Cell Reports*, *36*(13). https://doi.org/10.1016/j.celrep.2021.109765

Levin, J., & Bang, F. B. (1964). The Role of Endotoxin in the Extracellular Coagulation of Limulus Blood. *Bulletin of the Johns Hopkins Hospital*, *115*, 265–274.

Levy, M., Kolodziejczyk, A. A., Thaiss, C. A., & Elinav, E. (2017). Dysbiosis and the immune system. In *Nature Reviews Immunology* (Vol. 17, Issue 4, pp. 219–232). Nature Publishing Group. https://doi.org/10.1038/nri.2017.7

Ley, R. E., Peterson, D. A., & Gordon, J. I. (2006). Ecological and evolutionary forces shaping microbial diversity in the human intestine. In *Cell* (Vol. 124, Issue 4, pp. 837–848). Elsevier B.V. https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.02.017

Li, C. C., Eaton, S. A., Young, P. E., Lee, M., Shuttleworth, R., Humphreys, D. T., Grau, G. E., Combes, V., Bebawy, M., Gong, J., Brammah, S., Buckland, M. E., & Suter, C. M. (2013). Glioma microvesicles carry selectively packaged coding and non-coding RNAs which alter gene expression in recipient cells. *RNA Biology*, *10*(8), 1333–1344. https://doi.org/10.4161/rna.25281

Li, C., Lin, Y., Lin, R., Chen, Z., Zhou, Q., Luo, C., & Mo, Z. (2023). Host miR-129-5p reverses effects of ginsenoside Rg1 on morphine reward possibly mediated by changes in B. vulgatus and serotonin metabolism in hippocampus. *Gut Microbes*, *15*(2). https://doi.org/10.1080/19490976.2023.2254946

Li, H., Luo, L., Zhou, Y., Ling, H., Yang, Q., & Qi, D. (2020). Dietary administration of Enterococcus faecalis affects the growth, disease resistance and immune function of tilapia (Oreochromis niloticus). *Aquaculture Reports*, *18*, 100440. https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2020.100440

Li, J., Lee, Y., Johansson, H. J., Mäger, I., Vader, P., Nordin, J. Z., Wiklander, O. P. B., Lehtiö, J., Wood, M. J. A., & Andaloussi, S. EL. (2015). Serum-free culture alters the quantity and protein composition of neuroblastoma-derived extracellular vesicles. *Journal of Extracellular Vesicles*, *4*(1). https://doi.org/10.3402/jev.v4.26883

Li, W., Wu, X., Hu, X., Wang, T., Liang, S., Duan, Y., Jin, F., & Qin, B. (2017). Structural changes of gut microbiota in Parkinson's disease and its correlation with clinical features. *Science China Life Sciences*, *60*(11), 1223–1233. https://doi.org/10.1007/s11427-016-9001-4

Li, Y., Cao, Y., Liu, W., Chen, F., Zhang, H., Zhou, H., Zhao, A., Luo, N., Liu, J., & Wu, L. (2024). Candidate biomarkers of EV-microRNA in detecting REM sleep behavior disorder and Parkinson's disease. *Npj Parkinson's Disease*, *10*(1), 18. https://doi.org/10.1038/s41531-023-00628-4

Liao, S., Klein, M. I., Heim, K. P., Fan, Y., Bitoun, J. P., Ahn, S. J., Burne, R. A., Koo, H., Brady, L. J., & Wen, Z. T. (2014). Streptococcus mutans extracellular DNA is upregulated during growth in biofilms, actively released via membrane vesicles, and influenced by components of the protein secretion machinery. *Journal of Bacteriology*, *196*(13), 2355–2366. https://doi.org/10.1128/JB.01493-14

Liao, Y., Smyth, G. K., & Shi, W. (2014). featureCounts: an efficient general purpose program for assigning sequence reads to genomic features. *Bioinformatics*, *30*(7), 923–930. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btt656

Lim, J. J., Diener, C., Wilson, J., Valenzuela, J. J., Baliga, N. S., & Gibbons, S. M. (2023). Growth phase estimation for abundant bacterial populations sampled longitudinally from

human stool metagenomes. *Nature Communications*, *14*(1), 5682. https://doi.org/10.1038/s41467-023-41424-1

Lin, A., Zheng, W., He, Y., Tang, W., Wei, X., He, R., Huang, W., Su, Y., Huang, Y., Zhou, H., & Xie, H. (2018). Gut microbiota in patients with Parkinson's disease in southern China. *Parkinsonism & Related Disorders*, *53*, 82–88. https://doi.org/10.1016/j.parkreldis.2018.05.007

Lin, C. H., Chen, C. C., Chiang, H. L., Liou, J. M., Chang, C. M., Lu, T. P., Chuang, E. Y., Tai, Y. C., Cheng, C., Lin, H. Y., & Wu, M. S. (2019). Altered gut microbiota and inflammatory cytokine responses in patients with Parkinson's disease. *Journal of Neuroinflammation*, *16*(1). https://doi.org/10.1186/s12974-019-1528-y

Lin, D., Gao, Y., Zhao, L., Chen, Y., An, S., & Peng, Z. (2018). Enterococcus faecalis lipoteichoic acid regulates macrophages autophagy via PI3K/Akt/mTOR pathway. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *498*(4), 1028–1036. https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2018.03.109

Lin, Y., Xu, J., Hu, J., Wang, L., Ong, S. L., Leadbetter, J. R., & Zhang, L. (2003). Acyl-homoserine lactone acylase from Ralstonia strain XJ12B represents a novel and potent class of quorum-quenching enzymes. *Molecular Microbiology*, *47*(3), 849–860. https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2003.03351.x

Lionnet, A., Leclair-Visonneau, L., Neunlist, M., Murayama, S., Takao, M., Adler, C. H., Derkinderen, P., & Beach, T. G. (2018). Does Parkinson's disease start in the gut? *Acta Neuropathologica*, *135*(1), 1–12. https://doi.org/10.1007/s00401-017-1777-8

Liu, C., Chu, D., Kalantar-Zadeh, K., George, J., Young, H. A., & Liu, G. (2021). Cytokines: From Clinical Significance to Quantification. *Advanced Science*, *8*(15). https://doi.org/10.1002/advs.202004433

Liu, S., Da Cunha, A. P., Rezende, R. M., Cialic, R., Wei, Z., Bry, L., Comstock, L. E., Gandhi, R., & Weiner, H. L. (2016). The Host Shapes the Gut Microbiota via Fecal MicroRNA. *Cell Host and Microbe*, *19*(1), 32–43. https://doi.org/10.1016/j.chom.2015.12.005

Liu, S., Rezende, R. M., Moreira, T. G., Tankou, S. K., Cox, L. M., Wu, M., Song, A., Dhang, F. H., Wei, Z., Costamagna, G., & Weiner, H. L. (2019). Oral Administration of miR-30d from Feces of MS Patients Suppresses MS-like Symptoms in Mice by Expanding Akkermansia muciniphila. *Cell Host and Microbe*, *26*(6), 779-794.e8. https://doi.org/10.1016/j.chom.2019.10.008

Liu, X., Zhang, T., Wang, R., Shi, P., Pan, B., & Pang, X. (2019). Insulin-Transferrin-Selenium as a Novel Serum-free Media Supplement for the Culture of Human Amnion Mesenchymal Stem Cells. *Annals of Clinical and Laboratory Science*, *49*(1), 63–71.

Liu, Z., Chen, X., Wang, X., Chen, X., Song, C.-H., Du, Y., Su, J., Yaseen, S. A., & Yang, P.-C. (2011). Chemokine CXCL11 links microbial stimuli to intestinal inflammation. *Clinical and Experimental Immunology*, *164*(3), 396–406. https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2011.04382.x

Lombardi, V., Van Overtvelt, L., Horiot, S., & Moingeon, P. (2009). Human Dendritic Cells Stimulated via TLR7 and/or TLR8 Induce the Sequential Production of Il-10, IFN-γ, and IL-17A by Naive CD4+ T Cells. *The Journal of Immunology*, *182*(6), 3372–3379. https://doi.org/10.4049/jimmunol.0801969

Lötvall, J., Hill, A. F., Hochberg, F., Buzás, E. I., Vizio, D. Di, Gardiner, C., Gho, Y. S., Kurochkin, I. V., Mathivanan, S., Quesenberry, P., Sahoo, S., Tahara, H., Wauben, M. H., Witwer, K. W., & Théry, C. (2014). Minimal experimental requirements for definition of extracellular vesicles and their functions: A position statement from the International Society for Extracellular Vesicles. In *Journal of Extracellular Vesicles* (Vol. 3, Issue 1). Co-Action Publishing. https://doi.org/10.3402/jev.v3.26913

Love, M. I., Huber, W., & Anders, S. (2014). Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biology*, *15*(12), 550. https://doi.org/10.1186/s13059-014-0550-8

Lu, Y.-C., Yeh, W.-C., & Ohashi, P. S. (2008). LPS/TLR4 signal transduction pathway. *Cytokine*, *42*(2), 145–151. https://doi.org/10.1016/j.cyto.2008.01.006

Luettig, J., Rosenthal, R., Barmeyer, C., & Schulzke, J. (2015). Claudin-2 as a mediator of leaky gut barrier during intestinal inflammation. *Tissue Barriers*, *3*(1–2), e977176. https://doi.org/10.4161/21688370.2014.977176

Lyon, G. J., Wright, J. S., Christopoulos, A., Novick, R. P., & Muir, T. W. (2002). Reversible and specific extracellular antagonism of receptor-histidine kinase signaling. *Journal of Biological Chemistry*, *277*(8), 6247–6253. https://doi.org/10.1074/jbc.M109989200

Lytle, J. R., Yario, T. A., & Steitz, J. A. (2007). Target mRNAs are repressed as efficiently by microRNA-binding sites in the 5′ UTR as in the 3′ UTR. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *104*(23), 9667–9672. https://doi.org/10.1073/pnas.0703820104

Ma, R. Y., Deng, Z. L., Du, Q. Y., Dai, M. Q., Luo, Y. Y., Liang, Y. E., Dai, X. Z., Guo, S. M., & Zhao, W. H. (2024). Enterococcus faecalis Extracellular Vesicles Promote Apical Periodontitis. *Journal of Dental Research*. https://doi.org/10.1177/00220345241230867

Ma, X., Lu, X., Zhang, W., Yang, L., Wang, D., Xu, J., Jia, Y., Wang, X., Xie, H., Li, S., Zhang, M., He, Y., Jin, P., & Sheng, J. (2022). Gut microbiota in the early stage of Crohn's disease has unique characteristics. *Gut Pathogens*, *14*(1). https://doi.org/10.1186/s13099-022-00521-0

MacDonald, I. A., & Kuehna, M. J. (2013). Stress-induced outer membrane vesicle production by Pseudomonas aeruginosa. *Journal of Bacteriology*, *195*(13), 2971–2981. https://doi.org/10.1128/JB.02267-12

Macfarlane, S., & Macfarlane, G. T. (2003). Regulation of short-chain fatty acid production. *Proceedings of the Nutrition Society*, *62*(1), 67–72. https://doi.org/10.1079/PNS2002207

Mainzer, C., Barrichello, C., Debret, R., Remoué, N., Sigaudo-Roussel, D., & Sommer, P. (2014). Insulin–transferrin–selenium as an alternative to foetal serum for epidermal equivalents. *International Journal of Cosmetic Science*, *36*(5), 427–435. https://doi.org/10.1111/ics.12141

Malabirade, A., Habier, J., Heintz-Buschart, A., May, P., Godet, J., Halder, R., Etheridge, A., Galas, D., Wilmes, P., & Fritz, J. V. (2018). The RNA Complement of Outer Membrane Vesicles From Salmonella enterica Serovar Typhimurium Under Distinct Culture Conditions. *Frontiers in Microbiology*, *9*. https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02015

Malone, R. W., Felgner, P. L., & Verma, I. M. (1989). Cationic liposome-mediated RNA transfection. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *86*(16), 6077–6081. https://doi.org/10.1073/pnas.86.16.6077

Maredia, R., Devineni, N., Lentz, P., Dallo, S. F., Yu, J., Guentzel, N., Chambers, J., Arulanandam, B., Haskins, W. E., & Weitao, T. (2012). Vesiculation from Pseudomonas aeruginosa under SOS. *The Scientific World Journal*, *2012*. https://doi.org/10.1100/2012/402919

Martin-Gallausiaux, C., Malabirade, A., Habier, J., & Wilmes, P. (2020). Fusobacterium nucleatum Extracellular Vesicles Modulate Gut Epithelial Cell Innate Immunity via FomA and TLR2. *Frontiers in Immunology*, *11*. https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.583644

Matsuda, M., Sentani, K., Noguchi, T., Hinoi, T., Okajima, M., Matsusaki, K., Sakamoto, N., Anami, K., Naito, Y., Oue, N., & Yasui, W. (2010). Immunohistochemical analysis of colorectal cancer with gastric phenotype: Claudin-18 is associated with poor prognosis.

Pathology International, *60*(10), 673–680. https://doi.org/10.1111/j.1440-1827.2010.02587.x

Mattick, J. S. (2002). Type IV Pili and Twitching Motility. *Annual Review of Microbiology*, *56*(1), 289–314. https://doi.org/10.1146/annurev.micro.56.012302.160938

McBroom, A. J., & Kuehn, M. J. (2007). Release of outer membrane vesicles by Gram-negative bacteria is a novel envelope stress response. *Molecular Microbiology*, *63*(2), 545–558. https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2006.05522.x

McInerney-Leo, A., Gwinn-Hardy, K., & Nussbaum Bethesda, R. L. (2004). *Prevalence of Parkinson's Disease in Populations of African Ancestry: A Review*.

McMurdie, P. J., & Holmes, S. (2013). phyloseq: An R Package for Reproducible Interactive Analysis and Graphics of Microbiome Census Data. *PLoS ONE*, *8*(4), e61217. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061217

Mehanny, M., Koch, M., Lehr, C.-M., & Fuhrmann, G. (2020). Streptococcal Extracellular Membrane Vesicles Are Rapidly Internalized by Immune Cells and Alter Their Cytokine Release. *Frontiers in Immunology*, *11*. https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.00080

Milanese, A., Mende, D. R., Paoli, L., Salazar, G., Ruscheweyh, H.-J., Cuenca, M., Hingamp, P., Alves, R., Costea, P. I., Coelho, L. P., Schmidt, T. S. B., Almeida, A., Mitchell, A. L., Finn, R. D., Huerta-Cepas, J., Bork, P., Zeller, G., & Sunagawa, S. (2019). Microbial abundance, activity and population genomic profiling with mOTUs2. *Nature Communications*, *10*(1), 1014. https://doi.org/10.1038/s41467-019-08844-4

Minciacchi, V. R., You, S., Spinelli, C., Morley, S., Zandian, M., Aspuria, P.-J., Cavallini, L., Ciardiello, C., Sobreiro, M. R., Morello, M., Kharmate, G., Jang, S. C., Kim, D.-K., Hosseini-Beheshti, E., Guns, E. T., Gleave, M., Gho, Y. S., Mathivanan, S., Yang, W., … Di Vizio, D. (2015). Large oncosomes contain distinct protein cargo and represent a separate functional class of tumor-derived extracellular vesicles. *Oncotarget*, *6*(13), 11327–11341. https://doi.org/10.18632/oncotarget.3598

Miranda, K. C., Bond, D. T., Levin, J. Z., Adiconis, X., Sivachenko, A., Russ, C., Brown, D., Nusbaum, C., & Russo, L. M. (2014). Massively Parallel Sequencing of Human Urinary Exosome/Microvesicle RNA Reveals a Predominance of Non-Coding RNA. *PLoS ONE*, *9*(5), e96094. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0096094

Miska, E. A. (2005). How microRNAs control cell division, differentiation and death. *Current Opinion in Genetics & Development*, *15*(5), 563–568. https://doi.org/10.1016/j.gde.2005.08.005

Mittal, S., Bjørnevik, K., Im, D. S., Flierl, A., Dong, X., Locascio, J. J., Abo, K. M., Long, E., Jin, M., Xu, B., Xiang, Y. K., Rochet, J.-C., Engeland, A., Rizzu, P., Heutink, P., Bartels, T., Selkoe, D. J., Caldarone, B. J., Glicksman, M. A., … Scherzer, C. R. (2017). β2-Adrenoreceptor is a regulator of the α-synuclein gene driving risk of Parkinson's disease. *Science*, *357*(6354), 891–898. https://doi.org/10.1126/science.aaf3934

Mittelbrunn, M., Gutiérrez-Vázquez, C., Villarroya-Beltri, C., González, S., Sánchez-Cabo, F., González, M. Á., Bernad, A., & Sánchez-Madrid, F. (2011). Unidirectional transfer of microRNA-loaded exosomes from T cells to antigen-presenting cells. *Nature Communications*, *2*(1), 282. https://doi.org/10.1038/ncomms1285

Mizuno, Y., Yoshino, H., Ikebe, S., Hattori, N., Kobayashi, T., Shimoda-Matsubayashi, S., Matsumine, H., & Kondo, T. (1998). Mitochondrial dysfunction in parkinson's disease. *Annals of Neurology*, *44*(S1). https://doi.org/10.1002/ana.410440715

Moore, J. C. (1964). Gel permeation chromatography. I. A new method for molecular weight distribution of high polymers. *Journal of Polymer Science Part A: General Papers*, *2*(2), 835–843. https://doi.org/10.1002/pol.1964.100020220

Moretti, F., Thermann, R., & Hentze, M. W. (2010). Mechanism of translational regulation by miR-2 from sites in the 5′ untranslated region or the open reading frame. *RNA*, *16*(12), 2493–2502. https://doi.org/10.1261/rna.2384610

Muangpaisan, W., Hori, H., & Brayne, C. (2009). Systematic Review of the Prevalence and Incidence of Parkinson's Disease in Asia. *Journal of Epidemiology*, *19*(6), 281–293. https://doi.org/10.2188/jea.JE20081034

Muegge, B. D., Kuczynski, J., Knights, D., Clemente, J. C., González, A., Fontana, L., Henrissat, B., Knight, R., & Gordon, J. I. (2011). Diet Drives Convergence in Gut Microbiome Functions Across Mammalian Phylogeny and Within Humans. *Science*, *332*(6032), 970–974. https://doi.org/10.1126/science.1198719

Mueller, O., Hahnenberger, K., Dittmann, M., Yee, H., Dubrow, R., Nagle, R., & Ilsley, D. (2000). A microfluidic system for high-speed reproducible DNA sizing and quantitation. *Electrophoresis*, *21*(1), 128–134. https://doi.org/10.1002/(SICI)1522-2683(20000101)21:1<128::AID-ELPS128>3.0.CO;2-M

Mulcahy, L. A., Pink, R. C., & Carter, D. R. F. (2014). Routes and mechanisms of extracellular vesicle uptake. In *Journal of Extracellular Vesicles* (Vol. 3, Issue 1). Co-Action Publishing. https://doi.org/10.3402/jev.v3.24641

Müller, L., Kuhn, T., Koch, M., & Fuhrmann, G. (2021). Stimulation of Probiotic Bacteria Induces Release of Membrane Vesicles with Augmented Anti-inflammatory Activity. *ACS Applied Bio Materials*, *4*(5), 3739–3748. https://doi.org/10.1021/acsabm.0c01136

Munhoz da Rocha, I. F., Amatuzzi, R. F., Lucena, A. C. R., Faoro, H., & Alves, L. R. (2020). Cross-Kingdom Extracellular Vesicles EV-RNA Communication as a Mechanism for Host–Pathogen Interaction. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, *10*. https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.593160

Nachum, R., & Berzofsky, R. N. (1985). Chromogenic Limulus amoebocyte lysate assay for rapid detection of gram-negative bacteriuria. *Journal of Clinical Microbiology*, *21*(5), 759–763. https://doi.org/10.1128/jcm.21.5.759-763.1985

Nagashima, H., Iwatani, S., Cruz, M., Jiménez Abreu, J. A., Uchida, T., Mahachai, V., Vilaichone, R., Graham, D. Y., & Yamaoka, Y. (2015). Toll-like Receptor 10 in Helicobacter pylori Infection. *Journal of Infectious Diseases*, *212*(10), 1666–1676. https://doi.org/10.1093/infdis/jiv270

Nair, A., Chauhan, P., Saha, B., & Kubatzky, K. F. (2019). Conceptual Evolution of Cell Signaling. *International Journal of Molecular Sciences*, *20*(13), 3292. https://doi.org/10.3390/ijms20133292

Nakahara, K., Nakane, S., Ishii, K., Ikeda, T., & Ando, Y. (2023). Gut microbiota of Parkinson's disease in an appendectomy cohort: a preliminary study. *Scientific Reports*, *13*(1). https://doi.org/10.1038/s41598-023-29219-2

Nakamura, T., Morita, T., & Iwanaga, S. (1986). Lipopolysaccharide-sensitive serine-protease zymogen (factor C) found in Limulus hemocytes. *European Journal of Biochemistry*, *154*(3), 511–521. https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1986.tb09427.x

Nakano, M., & Fischer, W. (1978). Trihexosyldiacylglycerol and Acyltrihexosyldiacylglycerol as Lipid Anchors of the Lipoteichoic Acid of Lactobacillus casei DSM 20021. *Biological Chemistry*, *359*(1), 1–12. https://doi.org/10.1515/bchm.1978.359.1.1

Neudeck, B. L., Loeb, J. M., & Faith, N. G. (2004). Lactobacillus casei Alters hPEPT1-Mediated Glycylsarcosine Uptake in Caco-2 Cells. *The Journal of Nutrition*, *134*(5), 1120–1123. https://doi.org/10.1093/jn/134.5.1120

Nighot, M., Al-Sadi, R., Guo, S., Rawat, M., Nighot, P., Watterson, M. D., & Ma, T. Y. (2017). Lipopolysaccharide-Induced Increase in Intestinal Epithelial Tight Permeability Is

Mediated by Toll-Like Receptor 4/Myeloid Differentiation Primary Response 88 (MyD88) Activation of Myosin Light Chain Kinase Expression. *The American Journal of Pathology*, *187*(12), 2698–2710. https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2017.08.005

Niimi, T., Nagashima, K., Ward, J. M., Minoo, P., Zimonjic, D. B., Popescu, N. C., & Kimura, S. (2001). claudin-18, a Novel Downstream Target Gene for the T/EBP/NKX2.1 Homeodomain Transcription Factor, Encodes Lung- and Stomach-Specific Isoforms through Alternative Splicing. *Molecular and Cellular Biology*, *21*(21), 7380–7390. https://doi.org/10.1128/MCB.21.21.7380-7390.2001

Nilsen, N. J., Deininger, S., Nonstad, U., Skjeldal, F., Husebye, H., Rodionov, D., von Aulock, S., Hartung, T., Lien, E., Bakke, O., & Espevik, T. (2008). Cellular trafficking of lipoteichoic acid and Toll-like receptor 2 in relation to signaling; role of CD14 and CD36. *Journal of Leukocyte Biology*, *84*(1), 280–291. https://doi.org/10.1189/jlb.0907656

Niu, C., Huang, J., Wei, L., Wang, J., & Ran, S. (2024). Proinflammatory Effect of Membrane Vesicles Derived from Enterococcus faecalis at Neutral and Alkaline pH. *Journal of Endodontics*. https://doi.org/10.1016/j.joen.2024.08.018

Nolte-'t Hoen, E. N. M., Buermans, H. P. J., Waasdorp, M., Stoorvogel, W., Wauben, M. H. M., & 't Hoen, P. A. C. (2012). Deep sequencing of RNA from immune cell-derived vesicles uncovers the selective incorporation of small non-coding RNA biotypes with potential regulatory functions. *Nucleic Acids Research*, *40*(18), 9272–9285. https://doi.org/10.1093/nar/gks658

Noyce, A. J., Bestwick, J. P., Silveira-Moriyama, L., Hawkes, C. H., Giovannoni, G., Lees, A. J., & Schrag, A. (2012). Meta-analysis of early nonmotor features and risk factors for Parkinson disease. *Annals of Neurology*, *72*(6), 893–901. https://doi.org/10.1002/ana.23687

Ochieng, J., Pratap, S., Khatua, A. K., & Sakwe, A. M. (2009). Anchorage-independent growth of breast carcinoma cells is mediated by serum exosomes. *Experimental Cell Research*, *315*(11), 1875–1888. https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2009.03.010

Ohland, C. L., & Jobin, C. (2015). Microbial Activities and Intestinal Homeostasis: A Delicate Balance Between Health and Disease. *Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology*, *1*(1), 28–40. https://doi.org/10.1016/j.jcmgh.2014.11.004

Olmsted, S. B., Dunny, G. M., Erlandsen, S. L., & Wells, C. L. (1994). A Plasmid-Encoded Surface Protein On Enterococcus Faecalis Augments Its Internalization By Cultured Intestinal Epithelial Cells. *Journal of Infectious Diseases*, *170*(6), 1549–1556. https://doi.org/10.1093/infdis/170.6.1549

Orench-Rivera, N., & Kuehn, M. J. (2016). Environmentally controlled bacterial vesicle-mediated export. *Cellular Microbiology*, *18*(11), 1525–1536. https://doi.org/10.1111/cmi.12676

Ou, F., McGoverin, C., Swift, S., & Vanholsbeeck, F. (2019). Rapid and cost-effective evaluation of bacterial viability using fluorescence spectroscopy. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, *411*(16), 3653–3663. https://doi.org/10.1007/s00216-019-01848-5

Palacios, N., Gao, X., McCullough, M. L., Schwarzschild, M. A., Shah, R., Gapstur, S., & Ascherio, A. (2012). Caffeine and risk of Parkinson's disease in a large cohort of men and women. *Movement Disorders*, *27*(10), 1276–1282. https://doi.org/10.1002/mds.25076

Palleja, A., Mikkelsen, K. H., Forslund, S. K., Kashani, A., Allin, K. H., Nielsen, T., Hansen, T. H., Liang, S., Feng, Q., Zhang, C., Pyl, P. T., Coelho, L. P., Yang, H., Wang, J., Typas, A., Nielsen, M. F., Nielsen, H. B., Bork, P., Wang, J., … Pedersen, O. (2018). Recovery of gut microbiota of healthy adults following antibiotic exposure. *Nature Microbiology*, *3*(11), 1255–1265. https://doi.org/10.1038/s41564-018-0257-9

Pande, R., Parikh, A., Shenoda, B., Ramanathan, S., Alexander, G. M., Schwartzman, R. J., & Ajit, S. K. (2021). Hsa-miR-605 regulates the proinflammatory chemokine CXCL5 in complex regional pain syndrome. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, *140*, 111788. https://doi.org/10.1016/j.biopha.2021.111788

Park, S.-Y., Kang, H.-O., Jang, H.-S., Lee, J.-K., Koo, B.-T., & Yum, D.-Y. (2005). Identification of Extracellular N-Acylhomoserine Lactone Acylase from a Streptomyces sp. and Its Application to Quorum Quenching. *Applied and Environmental Microbiology*, *71*(5), 2632–2641. https://doi.org/10.1128/AEM.71.5.2632-2641.2005

Parkinson, J. (1817). An Essay on the Shaking Palsy. *The Journal of Neuropsychiatry and Clinical Neurosciences*, *14*(2), 223–236. https://doi.org/10.1176/jnp.14.2.223

Parlindungan, E., Dekiwadia, C., Tran, K. T. M., Jones, O. A. H., & May, B. K. (2018). Morphological and ultrastructural changes in Lactobacillus plantarum B21 as an indicator of nutrient stress. *LWT*, *92*, 556–563. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.02.072

Paskevicius, T., Farraj, R. A., Michalak, M., & Agellon, L. B. (2023). Calnexin, More Than Just a Molecular Chaperone. *Cells*, *12*(3), 403. https://doi.org/10.3390/cells12030403

Pellegrini, C., Ippolito, C., Segnani, C., Dolfi, A., Errede, M., Virgintino, D., Fornai, M., Antonioli, L., Garelli, F., Nericcio, A., Colucci, R., Cerri, S., Blandini, F., Blandizzi, C., & Bernardini, N. (2020). Pathological remodelling of colonic wall following dopaminergic nigrostriatal neurodegeneration. *Neurobiology of Disease*, *139*, 104821. https://doi.org/10.1016/j.nbd.2020.104821

Pérez-Cruz, C., Carrión, O., Delgado, L., Martinez, G., López-Iglesias, C., & Mercade, E. (2013). New type of outer membrane vesicle produced by the gram-negative bacterium Shewanella vesiculosa M7T: Implications for DNA content. *Applied and Environmental Microbiology*, *79*(6), 1874–1881. https://doi.org/10.1128/AEM.03657-12

Pérez-Cruz, C., Delgado, L., López-Iglesias, C., & Mercade, E. (2015). Outer-Inner Membrane Vesicles Naturally Secreted by Gram-Negative Pathogenic Bacteria. *PLOS ONE*, *10*(1), e0116896. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0116896

Perez-Pardo, P., Dodiya, H. B., Engen, P. A., Forsyth, C. B., Huschens, A. M., Shaikh, M., Voigt, R. M., Naqib, A., Green, S. J., Kordower, J. H., Shannon, K. M., Garssen, J., Kraneveld, A. D., & Keshavarzian, A. (2019). Role of TLR4 in the gut-brain axis in Parkinson's disease: a translational study from men to mice. *Gut*, *68*(5), 829–843. https://doi.org/10.1136/gutjnl-2018-316844

Petrov, V. A., Saltykova, I. V., Zhukova, I. A., Alifirova, V. M., Zhukova, N. G., Dorofeeva, Yu. B., Tyakht, A. V., Kovarsky, B. A., Alekseev, D. G., Kostryukova, E. S., Mironova, Yu. S., Izhboldina, O. P., Nikitina, M. A., Perevozchikova, T. V., Fait, E. A., Babenko, V. V., Vakhitova, M. T., Govorun, V. M., & Sazonov, A. E. (2017). Analysis of Gut Microbiota in Patients with Parkinson's Disease. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, *162*(6), 734–737. https://doi.org/10.1007/s10517-017-3700-7

Piepenbrink, K. H. (2019). DNA Uptake by Type IV Filaments. *Frontiers in Molecular Biosciences*, *6*. https://doi.org/10.3389/fmolb.2019.00001

Pietrucci, D., Cerroni, R., Unida, V., Farcomeni, A., Pierantozzi, M., Mercuri, N. B., Biocca, S., Stefani, A., & Desideri, A. (2019). Dysbiosis of gut microbiota in a selected population of Parkinson's patients. *Parkinsonism & Related Disorders*, *65*, 124–130. https://doi.org/10.1016/j.parkreldis.2019.06.003

Pinder, R. M. (1970). Possible Dopamine Derivatives capable of Crossing the Blood-Brain Barrier in relation to Parkinsonism. *Nature*, *228*(5269), 358–358. https://doi.org/10.1038/228358a0

Piuri, M., Sanchez-Rivas, C., & Ruzal, S. M. (2005). Cell wall modifications during osmotic stress in Lactobacillus casei. *Journal of Applied Microbiology*, *98*(1), 84–95. https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2004.02428.x

Poewe, W., Seppi, K., Tanner, C. M., Halliday, G. M., Brundin, P., Volkmann, J., Schrag, A. E., & Lang, A. E. (2017). Parkinson disease. *Nature Reviews Disease Primers*, *3*, 1–21. https://doi.org/10.1038/nrdp.2017.13

Polson, A. (1961). Fractionation of protein mixtures on columns of granulated agar. *Biochimica et Biophysica Acta*, *50*(3), 565–567. https://doi.org/10.1016/0006-3002(61)90016-6

Porath, J., & Flodin, P. (1959). Gel Filtration: A Method for Desalting and Group Separation. *Nature*, *183*(4676), 1657–1659. https://doi.org/10.1038/1831657a0

Postuma, R. B., Berg, D., Stern, M., Poewe, W., Olanow, C. W., Oertel, W., Obeso, J., Marek, K., Litvan, I., Lang, A. E., Halliday, G., Goetz, C. G., Gasser, T., Dubois, B., Chan, P., Bloem, B. R., Adler, C. H., & Deuschl, G. (2015). MDS clinical diagnostic criteria for Parkinson's disease. In *Movement Disorders* (Vol. 30, Issue 12, pp. 1591–1601). John Wiley and Sons Inc. https://doi.org/10.1002/mds.26424

Pretini, V., Koenen, M. H., Kaestner, L., Fens, M. H. A. M., Schiffelers, R. M., Bartels, M., & Van Wijk, R. (2019). Red Blood Cells: Chasing Interactions. *Frontiers in Physiology*, *10*. https://doi.org/10.3389/fphys.2019.00945

Pringsheim, T., Jette, N., Frolkis, A., & Steeves, T. D. L. (2014). The prevalence of Parkinson's disease: A systematic review and meta-analysis. In *Movement Disorders* (Vol. 29, Issue 13, pp. 1583–1590). John Wiley and Sons Inc. https://doi.org/10.1002/mds.25945

Priyadarshi, A., Khuder, S. A., Schaub, E. A., & Priyadarshi, S. S. (2001). Environmental Risk Factors and Parkinson's Disease: A Metaanalysis. *Environmental Research*, *86*(2), 122–127. https://doi.org/10.1006/enrs.2001.4264

Priyadarshi, A., Khuder, S. A., Schaub, E. A., & Shrivastava, S. (2000). A meta-analysis of Parkinson's disease and exposure to pesticides. *Neurotoxicology*, *21*(4), 435–440.

Przedborski, S., Vila, M., & Jackson-Lewis, V. (2003). Series Introduction: Neurodegeneration: What is it and where are we? *Journal of Clinical Investigation*, *111*(1), 3–10. https://doi.org/10.1172/JCI17522

Puig, K. L., Manocha, G. D., & Combs, C. K. (2015). Amyloid Precursor Protein Mediated Changes in Intestinal Epithelial Phenotype In Vitro. *PLoS ONE*, *10*(3). https://doi.org/10.1371/journal.pone.0119534

Qin, J., Li, R., Raes, J., Arumugam, M., Burgdorf, K. S., Manichanh, C., Nielsen, T., Pons, N., Levenez, F., Yamada, T., Mende, D. R., Li, J., Xu, J., Li, S., Li, D., Cao, J., Wang, B., Liang, H., Zheng, H., … Zoetendal, E. (2010). A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature*, *464*(7285), 59–65. https://doi.org/10.1038/nature08821

Qin, W., Shi, Y., Zhao, B., Yao, C., Jin, L., Ma, J., & Jin, Y. (2010). miR-24 Regulates Apoptosis by Targeting the Open Reading Frame (ORF) Region of FAF1 in Cancer Cells. *PLoS ONE*, *5*(2), e9429. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0009429

Rahman, Md. R., Islam, T., Turanli, B., Zaman, T., Faruquee, H. Md., Rahman, Md. M., Mollah, Md. N. H., Nanda, R. K., Arga, K. Y., Gov, E., & Moni, M. A. (2019). Network-based approach to identify molecular signatures and therapeutic agents in Alzheimer's disease. *Computational Biology and Chemistry*, *78*, 431–439. https://doi.org/10.1016/j.compbiolchem.2018.12.011

Ramirez-Carrozzi, V., Sambandam, A., Luis, E., Lin, Z., Jeet, S., Lesch, J., Hackney, J., Kim, J., Zhou, M., Lai, J., Modrusan, Z., Sai, T., Lee, W., Xu, M., Caplazi, P., Diehl, L., de Voss, J., Balazs, M., Gonzalez, L., … Pappu, R. (2011). IL-17C regulates the innate immune

function of epithelial cells in an autocrine manner. *Nature Immunology*, *12*(12), 1159–1166. https://doi.org/10.1038/ni.2156

Ramos, Y., Rocha, J., Hael, A. L., van Gestel, J., Vlamakis, H., Cywes-Bentley, C., Cubillos-Ruiz, J. R., Pier, G. B., Gilmore, M. S., Kolter, R., & Morales, D. K. (2019). PolyGlcNAc-containing exopolymers enable surface penetration by non-motile Enterococcus faecalis. *PLOS Pathogens*, *15*(2), e1007571. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007571

Ratajczak, W., Rył, A., Mizerski, A., Walczakiewicz, K., Sipak, O., & Laszczyńska, M. (2019). Immunomodulatory potential of gut microbiome-derived short-chain fatty acids (SCFAs). *Acta Biochimica Polonica*. https://doi.org/10.18388/abp.2018_2648

Razak, M. R., Aris, A. Z., Md Yusoff, F., Yusof, Z. N. B., Kim, S. D., & Kim, K. W. (2022). Assessment of RNA extraction protocols from cladocerans. *PLOS ONE*, *17*(4), e0264989. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0264989

Reijnders, J. S. A. M., Ehrt, U., Weber, W. E. J., Aarsland, D., & Leentjens, A. F. G. (2008). A systematic review of prevalence studies of depression in Parkinson's disease. In *Movement Disorders* (Vol. 23, Issue 2, pp. 183–189). https://doi.org/10.1002/mds.21803

Rekdal, V. M., Bess, E. N., Bisanz, J. E., Turnbaugh, P. J., & Balskus, E. P. (2019). Discovery and inhibition of an interspecies gut bacterial pathway for Levodopa metabolism. *Science*, *364*(6445). https://doi.org/10.1126/science.aau6323

Riedel, C. U., Foata, F., Philippe, D., Adolfsson, O., Eikmanns, B. J., & Blum, S. (2006). Anti-inflammatory effects of bifidobacteria by inhibition of LPS-induced NF-κB activation. *World Journal of Gastroenterology*, *12*(23), 3729. https://doi.org/10.3748/wjg.v12.i23.3729

Rigottier-Gois, L., Madec, C., Navickas, A., Matos, R. C., Akary-Lepage, E., Mistou, M.-Y., & Serror, P. (2015). The Surface Rhamnopolysaccharide Epa of Enterococcus faecalis Is a Key Determinant of Intestinal Colonization. *Journal of Infectious Diseases*, *211*(1), 62–71. https://doi.org/10.1093/infdis/jiu402

Rishik, S., Hirsch, P., Grandke, F., Fehlmann, T., & Keller, A. (2024). miRNATissueAtlas 2025: an update to the uniformly processed and annotated human and mouse non-coding RNA tissue atlas. *Nucleic Acids Research*. https://doi.org/10.1093/nar/gkae1036

Roediger, W. E. W. (1982). Utilization of Nutrients by Isolated Epithelial Cells of the Rat Colon. *Gastroenterology*, *83*(2), 424–429. https://doi.org/10.1016/S0016-5085(82)80339-9

Romano, S., Savva, G. M., Bedarf, J. R., Charles, I. G., Hildebrand, F., & Narbad, A. (2021). Meta-analysis of the Parkinson's disease gut microbiome suggests alterations linked to intestinal inflammation. *Npj Parkinson's Disease*, *7*(1). https://doi.org/10.1038/s41531-021-00156-z

Rózalski, A., Sidorczyk, Z., & Kotełko, K. (1997). Potential virulence factors of Proteus bacilli. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, *61*(1), 65–89. https://doi.org/10.1128/mmbr.61.1.65-89.1997

Rye, H. S., Dabora, J. M., Quesada, M. A., Mathies, R. A., & Glazer, A. N. (1993). Fluorometric Assay Using Dimeric Dyes for Double- and Single-Stranded DNA and RNA with Picogram Sensitivity. *Analytical Biochemistry*, *208*(1), 144–150. https://doi.org/10.1006/abio.1993.1020

Samak, G., Rao, R., & Rao, R. (2021). Lactobacillus casei and Epidermal Growth Factor Prevent Osmotic Stress-Induced Tight Junction Disruption in Caco-2 Cell Monolayers. *Cells*, *10*(12), 3578. https://doi.org/10.3390/cells10123578

Sampson, T. R., Challis, C., Jain, N., Moiseyenko, A., Ladinsky, M. S., Shastri, G. G., Thron, T., Needham, B. D., Horvath, I., Debelius, J. W., Janssen, S., Knight, R., Wittung-Stafshede, P., Gradinaru, V., Chapman, M., & Mazmanian, S. K. (2020). A gut bacterial

amyloid promotes α-synuclein aggregation and motor impairment in mice. *ELife*, *9*. https://doi.org/10.7554/eLife.53111

Sanger, F., Nicklen, S., & Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *74*(12), 5463–5467. https://doi.org/10.1073/pnas.74.12.5463

Santos, A. A., Afonso, M. B., Ramiro, R. S., Pires, D., Pimentel, M., Castro, R. E., & Rodrigues, C. M. P. (2020). Host miRNA-21 promotes liver dysfunction by targeting small intestinal Lactobacillus in mice. *Gut Microbes*, *12*(1), 1–18. https://doi.org/10.1080/19490976.2020.1840766

Satam, H., Joshi, K., Mangrolia, U., Waghoo, S., Zaidi, G., Rawool, S., Thakare, R. P., Banday, S., Mishra, A. K., Das, G., & Malonia, S. K. (2023). Next-Generation Sequencing Technology: Current Trends and Advancements. *Biology*, *12*(7), 997. https://doi.org/10.3390/biology12070997

Savage, D. C. (1977). Microbial Ecology of the Gastrointestinal Tract. *Annual Review of Microbiology*, *31*(1), 107–133. https://doi.org/10.1146/annurev.mi.31.100177.000543

Scheperjans, F., Aho, V., Pereira, P. A. B., Koskinen, K., Paulin, L., Pekkonen, E., Haapaniemi, E., Kaakkola, S., Eerola-Rautio, J., Pohja, M., Kinnunen, E., Murros, K., & Auvinen, P. (2015). Gut microbiota are related to Parkinson's disease and clinical phenotype. *Movement Disorders*, *30*(3), 350–358. https://doi.org/10.1002/mds.26069

Scherman, D., Desnos, C., Darchen, F., Pollak, P., Javoy-Agid, F., & Agid, Y. (1989). Striatal dopamine deficiency in parkinson's disease: Role of aging. *Annals of Neurology*, *26*(4), 551–557. https://doi.org/10.1002/ana.410260409

Schmidt, D. M., & Ernst, J. D. (1995). A Fluorometric Assay for the Quantification of RNA in Solution with Nanogram Sensitivity. *Analytical Biochemistry*, *232*(1), 144–146. https://doi.org/10.1006/abio.1995.0025

Schrödel, A. (2007). Die Rolle des fetalen Kälberserums in Zellkulturmedien. *Biologie in Unserer Zeit*, *37*(5), 289–289. https://doi.org/10.1002/biuz.200790079

Schulz, E., Goes, A., Garcia, R., Panter, F., Koch, M., Müller, R., Fuhrmann, K., & Fuhrmann, G. (2018). Biocompatible bacteria-derived vesicles show inherent antimicrobial activity. *Journal of Controlled Release*, *290*, 46–55. https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2018.09.030

Schulz, E., Karagianni, A., Koch, M., & Fuhrmann, G. (2020). Hot EVs – How temperature affects extracellular vesicles. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, *146*, 55–63. https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2019.11.010

Schwechheimer, C., & Kuehn, M. J. (2015). Outer-membrane vesicles from Gram-negative bacteria: Biogenesis and functions. In *Nature Reviews Microbiology* (Vol. 13, Issue 10, pp. 605–619). Nature Publishing Group. https://doi.org/10.1038/nrmicro3525

Scott, D. A., Tabarean, I., Tang, Y., Cartier, A., Masliah, E., & Roy, S. (2010). A Pathologic Cascade Leading to Synaptic Dysfunction in -Synuclein-Induced Neurodegeneration. *Journal of Neuroscience*, *30*(24), 8083–8095. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1091-10.2010

Segata, N., Waldron, L., Ballarini, A., Narasimhan, V., Jousson, O., & Huttenhower, C. (2012). Metagenomic microbial community profiling using unique clade-specific marker genes. *Nature Methods*, *9*(8), 811–814. https://doi.org/10.1038/nmeth.2066

Shelke, G. V., Lässer, C., Gho, Y. S., & Lötvall, J. (2014). Importance of exosome depletion protocols to eliminate functional and RNA-containing extracellular vesicles from fetal bovine serum. *Journal of Extracellular Vesicles*, *3*(1). https://doi.org/10.3402/jev.v3.24783

Shen, Q., Huang, Z., Yao, J., & Jin, Y. (2022). Extracellular vesicles-mediated interaction within intestinal microenvironment in inflammatory bowel disease. *Journal of Advanced Research*, *37*, 221–233. https://doi.org/10.1016/j.jare.2021.07.002

Shen, Y., Torchia, M. L. G., Lawson, G. W., Karp, C. L., Ashwell, J. D., & Mazmanian, S. K. (2012). Outer membrane vesicles of a human commensal mediate immune regulation and disease protection. *Cell Host and Microbe*, *12*(4), 509–520. https://doi.org/10.1016/j.chom.2012.08.004

Shi, G., Wu, T., Li, X., Zhao, D., Yin, Q., & Zhu, L. (2024). Systematic genome-wide Mendelian randomization reveals the causal links between miRNAs and Parkinson's disease. *Frontiers in Neuroscience*, *18*. https://doi.org/10.3389/fnins.2024.1385675

Shimazu, R., Akashi, S., Ogata, H., Nagai, Y., Fukudome, K., Miyake, K., & Kimoto, M. (1999). MD-2, a Molecule that Confers Lipopolysaccharide Responsiveness on Toll-like Receptor 4. *The Journal of Experimental Medicine*, *189*(11), 1777–1782. https://doi.org/10.1084/jem.189.11.1777

Silhavy, T. J., Kahne, D., & Walker, S. (2010). The Bacterial Cell Envelope. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, *2*(5), a000414–a000414. https://doi.org/10.1101/cshperspect.a000414

Silverblatt, F. J., & Ofek, I. (1978). Influence of Pili on the Virulence of Proteus mirabilis in Experimental Hematogenous Pyelonephritis. In *THE JOURNAL OF INFECTIOUS DISEASES* (Vol. 138, Issue 5). https://academic.oup.com/jid/article/138/5/664/869525

Sjöström, A. E., Sandblad, L., Uhlin, B. E., & Wai, S. N. (2015). Membrane vesicle-mediated release of bacterial RNA. *Scientific Reports*, *5*(1), 15329. https://doi.org/10.1038/srep15329

Skog, J., Würdinger, T., van Rijn, S., Meijer, D. H., Gainche, L., Curry, W. T., Carter, B. S., Krichevsky, A. M., & Breakefield, X. O. (2008). Glioblastoma microvesicles transport RNA and proteins that promote tumour growth and provide diagnostic biomarkers. *Nature Cell Biology*, *10*(12), 1470–1476. https://doi.org/10.1038/ncb1800

Smith, P. K., Krohn, R. I., Hermanson, G. T., Mallia, A. K., Gartner, F. H., Provenzano, M. D., Fujimoto, E. K., Goeke, N. M., Olson, B. J., & Klenk, D. C. (1985). Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical Biochemistry*, *150*(1), 76–85. https://doi.org/10.1016/0003-2697(85)90442-7

Smith, R. S., & Iglewski, B. H. (2003). P. aeruginosa quorum-sensing systems and virulence. In *Current Opinion in Microbiology* (Vol. 6, Issue 1, pp. 56–60). Elsevier Ltd. https://doi.org/10.1016/S1369-5274(03)00008-0

Snyder, H., Mensah, K., Theisler, C., Lee, J., Matouschek, A., & Wolozin, B. (2003). Aggregated and Monomeric α-Synuclein Bind to the S6′ Proteasomal Protein and Inhibit Proteasomal Function. *Journal of Biological Chemistry*, *278*(14), 11753–11759. https://doi.org/10.1074/jbc.M208641200

Sokol, C. L., & Luster, A. D. (2015). The Chemokine System in Innate Immunity. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, *7*(5), a016303. https://doi.org/10.1101/cshperspect.a016303

Soret, R., Chevalier, J., De Coppet, P., Poupeau, G., Derkinderen, P., Segain, J. P., & Neunlist, M. (2010). Short-Chain Fatty Acids Regulate the Enteric Neurons and Control Gastrointestinal Motility in Rats. *Gastroenterology*, *138*(5), 1772-1782.e4. https://doi.org/10.1053/j.gastro.2010.01.053

Spillantini, M. G., Schmidt, M. L., Lee, V. M.-Y., Trojanowski, J. Q., Jakes, R., & Goedert, M. (1997). α-Synuclein in Lewy bodies. *Nature*, *388*(6645), 839–840. https://doi.org/10.1038/42166

Srinivasan, B., Kolli, A. R., Esch, M. B., Abaci, H. E., Shuler, M. L., & Hickman, J. J. (2015). TEER Measurement Techniques for In Vitro Barrier Model Systems. *SLAS Technology*, *20*(2), 107–126. https://doi.org/10.1177/2211068214561025

Su, A., Gandhy, R., Barlow, C., & Triadafilopoulos, G. (2017). A practical review of gastrointestinal manifestations in Parkinson's disease. In *Parkinsonism and Related Disorders* (Vol. 39, pp. 17–26). Elsevier Ltd. https://doi.org/10.1016/j.parkreldis.2017.02.029

Suez, J., Zmora, N., Segal, E., & Elinav, E. (2019). The pros, cons, and many unknowns of probiotics. *Nature Medicine*, *25*(5), 716–729. https://doi.org/10.1038/s41591-019-0439-x

Sun, L., Wang, H., Zhu, X., Wu, P., Chen, W., Zou, P., Li, Q., & Chen, Z. (2014). Serum deprivation elevates the levels of microvesicles with different size distributions and selectively enriched proteins in human myeloma cells in vitro. *Acta Pharmacologica Sinica*, *35*(3), 381–393. https://doi.org/10.1038/aps.2013.166

Svensson, E., Henderson, V. W., Borghammer, P., Horváth-Puhó, E., & Sørensen, H. T. (2016). Constipation and risk of Parkinson's disease: A Danish population-based cohort study. *Parkinsonism & Related Disorders*, *28*, 18–22. https://doi.org/10.1016/j.parkreldis.2016.05.016

Svensson, K. J., Christianson, H. C., Wittrup, A., Bourseau-Guilmain, E., Lindqvist, E., Svensson, L. M., Mörgelin, M., & Belting, M. (2013). Exosome Uptake Depends on ERK1/2-Heat Shock Protein 27 Signaling and Lipid Raft-mediated Endocytosis Negatively Regulated by Caveolin-1. *Journal of Biological Chemistry*, *288*(24), 17713–17724. https://doi.org/10.1074/jbc.M112.445403

Szczerbiec, D., Glińska, S., Kamińska, J., & Drzewiecka, D. (2024). Outer Membrane Vesicles Formed by Clinical Proteus mirabilis Strains May Be Incorporated into the Outer Membrane of Other P. mirabilis Cells and Demonstrate Lytic Properties. *Molecules*, *29*(20), 4836. https://doi.org/10.3390/molecules29204836

Takeda, K., & Akira, S. (2004). TLR signaling pathways. *Seminars in Immunology*, *16*(1), 3–9. https://doi.org/10.1016/j.smim.2003.10.003

Tan, C. H., Jiang, L., Li, W., Chan, S. H., Baek, J.-S., Ng, N. K. J., Sailov, T., Kharel, S., Chong, K. K. L., & Loo, S. C. J. (2021). Lipid-Polymer Hybrid Nanoparticles Enhance the Potency of Ampicillin against Enterococcus faecalis in a Protozoa Infection Model. *ACS Infectious Diseases*, *7*(6), 1607–1618. https://doi.org/10.1021/acsinfecdis.0c00774

Tan, S. C., & Yiap, B. C. (2009). DNA, RNA, and Protein Extraction: The Past and The Present. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, *2009*, 1–10. https://doi.org/10.1155/2009/574398

Tang, C.-Z., Yang, J., Liu, Q.-H., Wang, Y.-R., & Wang, W.-S. (2019). Up-regulated miR-192-5p expression rescues cognitive impairment and restores neural function in mice with depression via the Fbln2-mediated TGF-β1 signaling pathway. *The FASEB Journal*, *33*(1), 606–618. https://doi.org/10.1096/fj.201800210RR

Tarasov, A., Vilella, A. J., Cuppen, E., Nijman, I. J., & Prins, P. (2015). Sambamba: fast processing of NGS alignment formats. *Bioinformatics*, *31*(12), 2032–2034. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btv098

Théry, C., Amigorena, S., Raposo, G., & Clayton, A. (2006). Isolation and Characterization of Exosomes from Cell Culture Supernatants and Biological Fluids. *Current Protocols in Cell Biology*, *30*(1). https://doi.org/10.1002/0471143030.cb0322s30

Théry, C., Ostrowski, M., & Segura, E. (2009). Membrane vesicles as conveyors of immune responses. In *Nature Reviews Immunology* (Vol. 9, Issue 8, pp. 581–593). https://doi.org/10.1038/nri2567

Théry, C., Witwer, K. W., Aikawa, E., Alcaraz, M. J., Anderson, J. D., Andriantsitohaina, R., Antoniou, A., Arab, T., Archer, F., Atkin-Smith, G. K., Ayre, D. C., Bach, J. M., Bachurski, D., Baharvand, H., Balaj, L., Baldacchino, S., Bauer, N. N., Baxter, A. A., Bebawy, M., … Zuba-Surma, E. K. (2018). Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018 (MISEV2018): a position statement of the International Society for Extracellular Vesicles and update of the MISEV2014 guidelines. *Journal of Extracellular Vesicles*, *7*(1). https://doi.org/10.1080/20013078.2018.1535750

Tian, L., Zhong, C., He, Y., Lu, Q., Wang, Y., Zhao, X., Wei, H., & Tao, X. (2023). Preventive of Lacticaseibacillus casei WLCA02 against Salmonella Typhimurium infection via strengthening the intestinal barrier and activating the macrophages. *Journal of Functional Foods*, *104*, 105507. https://doi.org/10.1016/j.jff.2023.105507

Towbin, H., Staehelin, T., & Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *76*(9), 4350–4354. https://doi.org/10.1073/pnas.76.9.4350

Toyofuku, M., Nomura, N., & Eberl, L. (2019). Types and origins of bacterial membrane vesicles. In *Nature Reviews Microbiology* (Vol. 17, Issue 1, pp. 13–24). Nature Publishing Group. https://doi.org/10.1038/s41579-018-0112-2

Trams, E. G., Lauter, C. J., Norman Salem, Jr., & Heine, U. (1981). Exfoliation of membrane ecto-enzymes in the form of micro-vesicles. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, *645*(1), 63–70. https://doi.org/10.1016/0005-2736(81)90512-5

Trelinska, J., Fendler, W., Dachowska, I., Kotulska, K., Jozwiak, S., Antosik, K., Gnys, P., Borowiec, M., & Mlynarski, W. (2016). Abnormal serum microRNA profiles in tuberous sclerosis are normalized during treatment with everolimus: possible clinical implications. *Orphanet Journal of Rare Diseases*, *11*(1), 129. https://doi.org/10.1186/s13023-016-0512-1

Tsukamoto, H., Kouwaki, T., & Oshiumi, H. (2020). Aging-Associated Extracellular Vesicles Contain Immune Regulatory microRNAs Alleviating Hyperinflammatory State and Immune Dysfunction in the Elderly. *IScience*, *23*(9), 101520. https://doi.org/10.1016/j.isci.2020.101520

Ugolini, M., Gerhard, J., Burkert, S., Jensen, K. J., Georg, P., Ebner, F., Volkers, S. M., Thada, S., Dietert, K., Bauer, L., Schäfer, A., Helbig, E. T., Opitz, B., Kurth, F., Sur, S., Dittrich, N., Gaddam, S., Conrad, M. L., Benn, C. S., … Sander, L. E. (2018). Recognition of microbial viability via TLR8 drives TFH cell differentiation and vaccine responses. *Nature Immunology*, *19*(4), 386–396. https://doi.org/10.1038/s41590-018-0068-4

Umezu, T., Ohyashiki, K., Kuroda, M., & Ohyashiki, J. H. (2013). Leukemia cell to endothelial cell communication via exosomal miRNAs. *Oncogene*, *32*(22), 2747–2755. https://doi.org/10.1038/onc.2012.295

Umezu, T., Tadokoro, H., Azuma, K., Yoshizawa, S., Ohyashiki, K., & Ohyashiki, J. H. (2014). Exosomal miR-135b shed from hypoxic multiple myeloma cells enhances angiogenesis by targeting factor-inhibiting HIF-1. *Blood*, *124*(25), 3748–3757. https://doi.org/10.1182/blood-2014-05-576116

Unger, M. M., Spiegel, J., Dillmann, K. U., Grundmann, D., Philippeit, H., Bürmann, J., Faßbender, K., Schwiertz, A., & Schäfer, K. H. (2016). Short chain fatty acids and gut microbiota differ between patients with Parkinson's disease and age-matched controls. *Parkinsonism and Related Disorders*, *32*, 66–72. https://doi.org/10.1016/j.parkreldis.2016.08.019

Valadi, H., Ekström, K., Bossios, A., Sjöstrand, M., Lee, J. J., & Lötvall, J. O. (2007). Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nature Cell Biology*, *9*(6), 654–659. https://doi.org/10.1038/ncb1596

Vallabhaneni, K. C., Penfornis, P., Dhule, S., Guillonneau, F., Adams, K. V., Mo, Y. Y., Xu, R., Liu, Y., Watabe, K., Vemuri, M. C., & Pochampally, R. (2015). Extracellular vesicles from bone marrow mesenchymal stem/stromal cells transport tumor regulatory microRNA, proteins, and metabolites. *Oncotarget*, *6*(7), 4953–4967. https://doi.org/10.18632/oncotarget.3211

Van Den Eeden, S. K., Tanner, C. M., Bernstein, A. L., Fross, R. D., Leimpeter, A., Bloch, D. A., & Nelson, L. M. (2003). Incidence of Parkinson's disease: Variation by age, gender, and race/ethnicity. *American Journal of Epidemiology*, *157*(11), 1015–1022. https://doi.org/10.1093/aje/kwg068

Van Gerven, N., Klein, R. D., Hultgren, S. J., & Remaut, H. (2015). Bacterial Amyloid Formation: Structural Insights into Curli Biogensis. *Trends in Microbiology*, *23*(11), 693–706. https://doi.org/10.1016/j.tim.2015.07.010

van lJzendoorn, S. C. D., & Derkinderen, P. (2019). The Intestinal Barrier in Parkinson's Disease: Current State of Knowledge. *Journal of Parkinson's Disease*, *9*(s2), S323–S329. https://doi.org/10.3233/JPD-191707

van Kessel, S. P., Frye, A. K., El-Gendy, A. O., Castejon, M., Keshavarzian, A., van Dijk, G., & El Aidy, S. (2019). Gut bacterial tyrosine decarboxylases restrict levels of levodopa in the treatment of Parkinson's disease. *Nature Communications*, *10*(1), 310. https://doi.org/10.1038/s41467-019-08294-y

Varga, J. J., Nguyen, V., O'Brien, D. K., Rodgers, K., Walker, R. A., & Melville, S. B. (2006). Type IV pili-dependent gliding motility in the Gram-positive pathogen Clostridium perfringens and other Clostridia. *Molecular Microbiology*, *62*(3), 680–694. https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2006.05414.x

Vargoorani, M. E., Modarressi, M. H., Vaziri, F., Motevaseli, E., & Siadat, S. D. (2020). Stimulatory effects of Lactobacillus casei derived extracellular vesicles on toll-like receptor 9 gene expression and cytokine profile in human intestinal epithelial cells. *Journal of Diabetes and Metabolic Disorders*, *19*(1), 223–231. https://doi.org/10.1007/s40200-020-00495-3

Vascellari, S., Palmas, V., Melis, M., Pisanu, S., Cusano, R., Uva, P., Perra, D., Madau, V., Sarchioto, M., Oppo, V., Simola, N., Morelli, M., Santoru, M. L., Atzori, L., Melis, M., Cossu, G., & Manzin, A. (2020). Gut Microbiota and Metabolome Alterations Associated with Parkinson's Disease. *MSystems*, *5*(5). https://doi.org/10.1128/mSystems.00561-20

Vernon-Parry, K. D. (2000). Scanning electron microscopy: an introduction. *III-Vs Review*, *13*(4), 40–44. https://doi.org/10.1016/S0961-1290(00)80006-X

Villarroya-Beltri, C., Gutiérrez-Vázquez, C., Sánchez-Cabo, F., Pérez-Hernández, D., Vázquez, J., Martin-Cofreces, N., Martinez-Herrera, D. J., Pascual-Montano, A., Mittelbrunn, M., & Sánchez-Madrid, F. (2013). Sumoylated hnRNPA2B1 controls the sorting of miRNAs into exosomes through binding to specific motifs. *Nature Communications*, *4*(1), 2980. https://doi.org/10.1038/ncomms3980

Wakabayashi, K., Takahashi, H., Takeda, S., Ohama, E., & Ikuta, F. (1989). Lewy bodies in the enteric nervous system in Parkinson's disease. *Archives of Histology and Cytology*, *52*(Suppl), 191–194. https://doi.org/10.1679/aohc.52.Suppl_191

Wallen, Z. D., Appah, M., Dean, M. N., Sesler, C. L., Factor, S. A., Molho, E., Zabetian, C. P., Standaert, D. G., & Payami, H. (2020). Characterizing dysbiosis of gut microbiome in PD: evidence for overabundance of opportunistic pathogens. *Npj Parkinson's Disease*, *6*(1). https://doi.org/10.1038/s41531-020-0112-6

Wang, C., Zhou, C., Guo, T., Huang, P., Xu, X., & Zhang, M. (2022). Association between cigarette smoking and Parkinson's disease: a neuroimaging study. *Therapeutic Advances in Neurological Disorders*, *15*. https://doi.org/10.1177/17562864221092566

Wang, L., Walia, B., Evans, J., Gewirtz, A. T., Merlin, D., & Sitaraman, S. V. (2003). IL-6 Induces NF-κB Activation in the Intestinal Epithelia. *The Journal of Immunology*, *171*(6), 3194–3201. https://doi.org/10.4049/jimmunol.171.6.3194

Wang, T., Mo, L., Ou, J., Fang, Q., Wu, H., Wu, Y., & Nandakumar, K. S. (2022). Proteus mirabilis Vesicles Induce Mitochondrial Apoptosis by Regulating miR96-5p/Abca1 to Inhibit Osteoclastogenesis and Bone Loss. *Frontiers in Immunology*, *13*. https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.833040

Wang, T., Wu, F., & Yu, D. (2019). miR-144/451 in hematopoiesis and beyond. *ExRNA*, *1*(1), 16. https://doi.org/10.1186/s41544-019-0035-8

Wang, Y., Zhou, Y., Fang, H., Lin, S., Wang, P., Xiong, R., Chen, J., Xiong, X., Lv, F., Liang, Q., & Yang, Q. (2014). Toll-like receptor 2/4 heterodimer mediates inflammatory injury in intracerebral hemorrhage. *Annals of Neurology*, *75*(6), 876–889. https://doi.org/10.1002/ana.24159

Wang, Z., Lai, Z., Zhang, X., Huang, P., Xie, J., Jiang, Q., Zhang, Q., & Chung, K. F. (2021). Altered gut microbiome compositions are associated with the severity of asthma. *Journal of Thoracic Disease*, *13*(7), 4322–4338. https://doi.org/10.21037/jtd-20-2189

Waters, C. M., & Bassler, B. L. (2005). Quorum sensing: Cell-to-cell communication in bacteria. In *Annual Review of Cell and Developmental Biology* (Vol. 21, pp. 319–346). https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.21.012704.131001

Waters, C. M., Hirt, H., McCormick, J. K., Schlievert, P. M., Wells, C. L., & Dunny, G. M. (2004). An amino-terminal domain of Enterococcus faecalis aggregation substance is required for aggregation, bacterial internalization by epithelial cells and binding to lipoteichoic acid. *Molecular Microbiology*, *52*(4), 1159–1171. https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2004.04045.x

Waters, C. M., Wells, C. L., & Dunny, G. M. (2003). The aggregation domain of aggregation substance, not the RGD motifs, is critical for efficient internalization by HT-29 enterocytes. *Infection and Immunity*, *71*(10), 5682–5689. https://doi.org/10.1128/IAI.71.10.5682-5689.2003

Wei, Z., Batagov, A. O., Carter, D. R. F., & Krichevsky, A. M. (2016). Fetal Bovine Serum RNA Interferes with the Cell Culture derived Extracellular RNA. *Scientific Reports*, *6*(1), 31175. https://doi.org/10.1038/srep31175

Wells, C. L., & Erlandsen, S. L. (1991). Localization of translocating Escherichia coli, Proteus mirabilis, and Enterococcus faecalis within cecal and colonic tissues of monoassociated mice. *Infection and Immunity*, *59*(12), 4693–4697. https://doi.org/10.1128/iai.59.12.4693-4697.1991

Wells, C. L., Jechorek, R. P., & Erlandsen, S. L. (1990). Evidence for the Translocation of Enterococcus faecalis across the Mouse Intestinal Tract. *Journal of Infectious Diseases*, *162*(1), 82–90. https://doi.org/10.1093/infdis/162.1.82

Welsh, J. A., Goberdhan, D. C. I., O'Driscoll, L., Buzas, E. I., Blenkiron, C., Bussolati, B., Cai, H., Di Vizio, D., Driedonks, T. A. P., Erdbrügger, U., Falcon-Perez, J. M., Fu, Q., Hill, A. F., Lenassi, M., Lim, S. K., Mahoney, M. G., Mohanty, S., Möller, A., Nieuwland, R., … Witwer, K. W. (2024). Minimal information for studies of extracellular vesicles (MISEV2023): From basic to advanced approaches. *Journal of Extracellular Vesicles*, *13*(2). https://doi.org/10.1002/jev2.12404

Wenner, J. J., & Rettger, L. F. (1919). A Systematic Study of the Proteus Group of Bacteria. *Journal of Bacteriology*, *4*(4), 331–353. https://doi.org/10.1128/jb.4.4.331-353.1919

Whitman, W. B., Coleman, D. C., & Wiebe, W. J. (1998). Prokaryotes: The unseen majority. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *95*(12), 6578–6583. https://doi.org/10.1073/pnas.95.12.6578

Whittaker, R. H. (1972). Evolution and Measurement of Species Diversity. *Taxon*, *21*(2–3), 213–251. https://doi.org/10.2307/1218190

Wolf, P. (1967). The Nature and Significance of Platelet Products in Human Plasma. *British Journal of Haematology*, *13*(3), 269–288. https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.1967.tb08741.x

Wolf, T., Baier, S. R., & Zempleni, J. (2015). The Intestinal Transport of Bovine Milk Exosomes Is Mediated by Endocytosis in Human Colon Carcinoma Caco-2 Cells and Rat Small Intestinal IEC-6 Cells. *The Journal of Nutrition*, *145*(10), 2201–2206. https://doi.org/10.3945/jn.115.218586

Wrana, G. (2023). Role of Endocrine Signaling and Insulin in Maintaining Blood Glucose levels Key components of cell signaling. *Cell & Developmental Biology*, *12*(6). https://doi.org/10.35248/2168-9296.23.12.310

Wu, C. W., Cao, X., Berger, C. K., Foote, P. H., Mahoney, D. W., Simonson, J. A., Anderson, B. W., Yab, T. C., Taylor, W. R., Boardman, L. A., Kisiel, J. B., & Ahlquist, D. A. (2017). Novel Approach to Fecal Occult Blood Testing by Assay of Erythrocyte-Specific microRNA Markers. *Digestive Diseases and Sciences*, *62*(8), 1985–1994. https://doi.org/10.1007/s10620-017-4627-6

Wu, H.-J., & Wu, E. (2012). The role of gut microbiota in immune homeostasis and autoimmunity. *Gut Microbes*, *3*(1), 4–14. https://doi.org/10.4161/gmic.19320

Wu, L., Fan, J., & Belasco, J. G. (2006). MicroRNAs direct rapid deadenylation of mRNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *103*(11), 4034–4039. https://doi.org/10.1073/pnas.0510928103

Xiromerisiou, G., Marogianni, C., Androutsopoulou, A., Ntavaroukas, P., Mysiris, D., & Papoutsopoulou, S. (2023). Parkinson's Disease, It Takes Guts: The Correlation between Intestinal Microbiome and Cytokine Network with Neurodegeneration. *Biology*, *12*(1), 93. https://doi.org/10.3390/biology12010093

Xu, W.-D., Wang, D.-C., Zhao, M., & Huang, A.-F. (2024). An updated advancement of bifunctional IL-27 in inflammatory autoimmune diseases. *Frontiers in Immunology*, *15*. https://doi.org/10.3389/fimmu.2024.1366377

Xu, Y., & Szoka, F. C. (1996). Mechanism of DNA Release from Cationic Liposome/DNA Complexes Used in Cell Transfection. *Biochemistry*, *35*(18), 5616–5623. https://doi.org/10.1021/bi9602019

Yajima, T. (1985). Contractile effect of short-chain fatty acids on the isolated colon of the rat. *The Journal of Physiology*, *368*(1), 667–678. https://doi.org/10.1113/jphysiol.1985.sp015882

Yan, Z., Yin, M., Chen, J., & Li, X. (2020). Assembly and substrate recognition of curli biogenesis system. *Nature Communications*, *11*(1). https://doi.org/10.1038/s41467-019-14145-7

Yáñez-Mó, M., Siljander, P. R. M., Andreu, Z., Zavec, A. B., Borràs, F. E., Buzas, E. I., Buzas, K., Casal, E., Cappello, F., Carvalho, J., Colás, E., Cordeiro-Da Silva, A., Fais, S., Falcon-Perez, J. M., Ghobrial, I. M., Giebel, B., Gimona, M., Graner, M., Gursel, I., … De Wever, O. (2015). Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions. In *Journal of Extracellular Vesicles* (Vol. 4, Issue 2015, pp. 1–60). Co-Action Publishing. https://doi.org/10.3402/jev.v4.27066

Yang, H., Li, S., & Le, W. (2022). Intestinal Permeability, Dysbiosis, Inflammation and Enteric Glia Cells: The Intestinal Etiology of Parkinson's Disease. *Aging and Disease*, *13*(5), 1381. https://doi.org/10.14336/AD.2022.01281

Yeung, C.-Y. C., Dondelinger, F., Schoof, E. M., Georg, B., Lu, Y., Zheng, Z., Zhang, J., Hannibal, J., Fahrenkrug, J., & Kjaer, M. (2022). Circadian regulation of protein cargo in extracellular vesicles. *Science Advances*, *8*(14). https://doi.org/10.1126/sciadv.abc9061

Young, N. S., Levin, J., & Prendergast, R. A. (1972). An invertebrate coagulation system activated by endotoxin: evidence for enzymatic mediation. *Journal of Clinical Investigation*, *51*(7), 1790–1797. https://doi.org/10.1172/JCI106980

Yu, S., Zhao, Z., Xu, X., Li, M., & Li, P. (2019). Characterization of three different types of extracellular vesicles and their impact on bacterial growth. *Food Chemistry*, *272*, 372–378. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.08.059

Zanoni, I., Ostuni, R., Marek, L. R., Barresi, S., Barbalat, R., Barton, G. M., Granucci, F., & Kagan, J. C. (2011). CD14 Controls the LPS-Induced Endocytosis of Toll-like Receptor 4. *Cell*, *147*(4), 868–880. https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.09.051

Zeng, J., Teng, F., Weinstock, G. M., & Murray, B. E. (2004). Translocation of Enterococcus faecalis Strains across a Monolayer of Polarized Human Enterocyte-Like T84 Cells. *Journal of Clinical Microbiology*, *42*(3), 1149–1154. https://doi.org/10.1128/JCM.42.3.1149-1154.2004

Zeng, Y., Wagner, E. J., & Cullen, B. R. (2002). Both Natural and Designed Micro RNAs Can Inhibit the Expression of Cognate mRNAs When Expressed in Human Cells. *Molecular Cell*, *9*(6), 1327–1333. https://doi.org/10.1016/S1097-2765(02)00541-5

Zeng, Y., Yi, R., & Cullen, B. R. (2003). MicroRNAs and small interfering RNAs can inhibit mRNA expression by similar mechanisms. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *100*(17), 9779–9784. https://doi.org/10.1073/pnas.1630797100

Zhang, H., Zhang, Y., Song, Z., Li, R., Ruan, H., Liu, Q., & Huang, X. (2020). sncRNAs packaged by Helicobacter pylori outer membrane vesicles attenuate IL-8 secretion in human cells. *International Journal of Medical Microbiology*, *310*(1), 151356. https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2019.151356

Zhang, J., Hoedt, E. C., Liu, Q., Berendsen, E., Teh, J. J., Hamilton, A., O' Brien, A. W., Ching, J. Y. L., Wei, H., Yang, K., Xu, Z., Wong, S. H., Mak, J. W. Y., Sung, J. J. Y., Morrison, M., Yu, J., Kamm, M. A., & Ng, S. C. (2021). Elucidation of Proteus mirabilis as a Key Bacterium in Crohn's Disease Inflammation. *Gastroenterology*, *160*(1), 317-330.e11. https://doi.org/10.1053/j.gastro.2020.09.036

Zhang, K., & Ni, Y. (2014). Tyrosine decarboxylase from Lactobacillus brevis: Soluble expression and characterization. *Protein Expression and Purification*, *94*, 33–39. https://doi.org/10.1016/j.pep.2013.10.018

Zhang, X., Yao, L., Meng, Y., Li, B., Yang, Y., & Gao, F. (2023). Migrasome: a new functional extracellular vesicle. In *Cell Death Discovery* (Vol. 9, Issue 1). Springer Nature. https://doi.org/10.1038/s41420-023-01673-x

Zhang, Y., Liu, D., Chen, X., Li, J., Li, L., Bian, Z., Sun, F., Lu, J., Yin, Y., Cai, X., Sun, Q., Wang, K., Ba, Y., Wang, Q., Wang, D., Yang, J., Liu, P., Xu, T., Yan, Q., … Zhang, C.-Y. (2010). Secreted Monocytic miR-150 Enhances Targeted Endothelial Cell Migration. *Molecular Cell*, *39*(1), 133–144. https://doi.org/10.1016/j.molcel.2010.06.010

Zhang, Y., Zhang, J., Xia, Y., & Sun, J. (2023). Bacterial translocation and barrier dysfunction enhance colonic tumorigenesis. *Neoplasia*, *35*, 100847. https://doi.org/10.1016/j.neo.2022.100847

Zhao, L., Zhou, T., Chen, J., Cai, W., Shi, R., Duan, Y., Yuan, L., & Xing, C. (2022). Colon specific delivery of miR-155 inhibitor alleviates estrogen deficiency related phenotype via microbiota remodeling. *Drug Delivery*, *29*(1), 2610–2620. https://doi.org/10.1080/10717544.2022.2108163

Zhao, M., He, S., Wen, R., Li, C., Chen, X., Lin, X., Wang, H., & Tang, Y. (2023). Membrane vesicles derived from Enterococcus faecalis promote the co-transfer of important antibiotic resistance genes located on both plasmids and chromosomes. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. https://doi.org/10.1093/jac/dkad381

Zheng, J., Wittouck, S., Salvetti, E., Franz, C. M. A. P., Harris, H. M. B., Mattarelli, P., O'Toole, P. W., Pot, B., Vandamme, P., Walter, J., Watanabe, K., Wuyts, S., Felis, G. E., Gänzle, M. G., & Lebeer, S. (2020). A taxonomic note on the genus Lactobacillus: Description of 23 novel genera, emended description of the genus Lactobacillus Beijerinck 1901, and union of Lactobacillaceae and Leuconostocaceae. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, *70*(4), 2782–2858. https://doi.org/10.1099/ijsem.0.004107

Zhu, Y., Yang, S., Zhao, N., Liu, C., Zhang, F., Guo, Y., & Liu, H. (2021). CXCL8 chemokine in ulcerative colitis. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, *138*, 111427. https://doi.org/10.1016/j.biopha.2021.111427

Zihni, C., Mills, C., Matter, K., & Balda, M. S. (2016). Tight junctions: from simple barriers to multifunctional molecular gates. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *17*(9), 564–580. https://doi.org/10.1038/nrm.2016.80

Anhang

Tabelle 14: Differentielle Expression ausgewählter Gene nach Inkubation oder Transfektion von Caco-2 Zellen mit *L. casei* MVs oder *L. casei* MV-RNA.
Angegeben sind die Log2 Fold Changes (FC) und Cohen's *d*. Ein Log2 FC > 1 entspricht einer erhöhten Expression und ein Log2 FC < -1 entspricht einer verringerten Expression des entsprechenden Gens in den Zellen, die mit den *L. casei* MVs im Vergleich zu PBS inkubiert oder mit der *L. casei* MV-RNA im Vergleich zur ANC (AllStars *Negative Control* siRNA) transfiziert wurden.

Gene	Zeit-punkt	Behandlung	Log2 FC	Cohen's *d*
CASP1	24 h	Inkubation	1,90	0,91
CCL15	10 h	Inkubation	1,09	1,11
CCL15	48 h	Inkubation	-2,02	1,15
CCL15	10 h	Transfektion	2,03	1,01
CCL17	24 h	Inkubation	1,16	0,91
CCL17	24 h	Transfektion	1,76	0,91
CCL2	10 h	Inkubation	1,59	1,11
CCL2	10 h	Transfektion	-1,46	1,21
CCL20	24 h	Inkubation	1,52	1,31
CCL20	48 h	Inkubation	1,99	1,84
CCL20	24 h	Transfektion	-1,03	1,07
CCL22	10 h	Inkubation	1,09	1,11
CCL22	24 h	Inkubation	1,49	1,07
CCL23	24 h	Transfektion	2,13	0,91
CCL25	10 h	Inkubation	-2,34	1,62
CCL25	24 h	Inkubation	-1,73	1,89
CCL26	24 h	Inkubation	1,16	0,91
CCR1	10 h	Transfektion	1,12	1,42
CCR1	24 h	Transfektion	-1,34	2,21
CCR3	24 h	Transfektion	-2,79	1,26
CCR4	24 h	Transfektion	2,92	1,82
CCR7	24 h	Inkubation	2,24	1,55
CCR9	24 h	Inkubation	-1,18	1,12
CCR9	24 h	Transfektion	2,59	1,61
CLDN10	10 h	Inkubation	1,78	1,07
CLDN11	24 h	Inkubation	-2,03	1,17
CLDN14	48 h	Inkubation	-1,57	1,22
CLDN14	24 h	Transfektion	1,76	0,91
CLDN18	24 h	Inkubation	-1,26	1,07
CLDN6	24 h	Inkubation	-1,66	2,19
CLDN6	24 h	Transfektion	2,06	0,92
CX3CL1	24 h	Inkubation	1,20	1,09
CX3CL1	10 h	Transfektion	-1,48	1,21
CX3CL1	48 h	Transfektion	-2,79	1,28
CXCL1	48 h	Inkubation	1,29	1,14
CXCL10	10 h	Transfektion	1,28	1,25
CXCL10	48 h	Transfektion	1,11	0,95
CXCL11	10 h	Inkubation	1,79	1,87
CXCL11	24 h	Inkubation	-1,85	1,10
IL15	10 h	Inkubation	-2,85	1,15
IL15RA	24 h	Inkubation	1,27	1,11
IL16	24 h	Inkubation	1,16	1,26
IL17B	24 h	Inkubation	-1,38	1,10
IL17B	48 h	Inkubation	1,31	1,20
IL17C	24 h	Transfektion	-2,22	1,66
IL18R1	24 h	Inkubation	1,16	0,91
IL18R1	48 h	Inkubation	-1,88	1,21
IL19	24 h	Inkubation	1,16	0,91
IL1A	48 h	Inkubation	1,16	1,40
IL1B	24 h	Inkubation	-1,50	0,98
IL1B	48 h	Inkubation	1,30	2,35
IL21R	24 h	Inkubation	2,52	1,47
IL23R	24 h	Inkubation	2,33	0,91
IL2RB	24 h	Inkubation	-1,54	0,98
IL31RA	24 h	Transfektion	-1,03	1,84
IL36G	48 h	Inkubation	1,65	0,83
IL36G	48 h	Transfektion	-2,76	1,53
IL37	10 h	Inkubation	1,09	1,11
IL37	24 h	Inkubation	2,25	1,03
IL4	10 h	Transfektion	1,26	1,04
IL5RA	24 h	Inkubation	2,52	1,40
IL6	10 h	Inkubation	-2,54	0,86
IL6	24 h	Inkubation	1,16	0,91
IL7R	10 h	Inkubation	1,04	1,22
NLRP1	10 h	Inkubation	-1,45	0,85
NLRP1	24 h	Inkubation	3,52	1,10
NLRP1	48 h	Inkubation	2,44	1,01
NLRP9	10 h	Inkubation	-2,23	1,36
NLRP9	48 h	Inkubation	1,04	0,99
NOD2	10 h	Transfektion	-1,14	1,40
TLR3	24 h	Inkubation	1,52	1,30
TLR6	24 h	Inkubation	-1,23	1,10
TLR7	24 h	Inkubation	1,50	0,90
TLR8	24 h	Inkubation	1,16	0,91
TNFRSF11A	24 h	Inkubation	1,69	1,23
TNFRSF11B	24 h	Inkubation	-1,04	0,91
TNFRSF18	24 h	Inkubation	-1,81	1,10
TNFRSF4	10 h	Inkubation	-1,98	1,17

CXCL11	24 h	Transfektion	-1,66	1,53
CXCL5	10 h	Inkubation	4,11	1,25
CXCL8	10 h	Inkubation	1,41	1,42
CXCL8	24 h	Inkubation	2,95	1,18
CXCR3	10 h	Inkubation	-1,34	1,04
CXCR3	48 h	Inkubation	1,83	1,93
CXCR4	24 h	Inkubation	2,69	0,91
IL12RB2	24 h	Inkubation	-1,18	1,39
IL13	48 h	Inkubation	1,21	1,22
TNFRSF4	24 h	Inkubation	1,96	1,43
TNFRSF8	10 h	Transfektion	-1,46	1,21
TNFRSF9	24 h	Inkubation	-2,45	1,25
TNFSF10	10 h	Transfektion	1,04	1,30
TNFSF14	10 h	Transfektion	1,41	1,21
TNFSF18	24 h	Inkubation	1,16	0,91
TNFSF8	24 h	Transfektion	1,76	0,91
TNFSF9	24 h	Transfektion	1,18	1,18

Tabelle 15: Biologische Prozesse mit signifikanter Anreicherung von differentiell exprimierten Genen nach Inkubation von Caco-2 Zellen mit *L. casei* MVs für 24 h.
Zur Einordnung der Veränderungen in den Caco-2 Zellen in biologische Prozesse wurde auf Grundlage der differentiell exprimierten Gene nach Inkubation mit *L. casei* MVs für 24 h eine Anreicherungsanalyse (*Over-representation analysis*, ORA) mit GeneTrail 3.2 durchgeführt. Dargestellt sind, mit Bezug zur **Abb. 29 A**, alle weiteren biologischen Prozesse (Termini der Gene Ontology Kategorie: „Biological Process“), in denen die differentiell exprimierten Gene entsprechend ihres Benjamini-Hochberg-adjustierten p-Wertes signifkant angereichert waren sowie die Anzahl der jeweiligen Gene.

GO - Biological Process	Anzahl der Hits	Adj. p-Wert
granulocyte chemotaxis	16	0,0020
extracellular structure organization	38	0,0021
muscle system process	31	0,0024
tissue development	60	0,0027
flavonoid metabolic process	6	0,0028
neutrophil chemotaxis	15	0,0031
acute inflammatory response	13	0,0031
sodium ion transmembrane transport	16	0,0032
regulation of heart contraction	29	0,0033
locomotion	92	0,0034
mononuclear cell migration	11	0,0035
extracellular matrix organization	37	0,0037
inflammatory response	45	0,0042
skeletal system development	23	0,0042
ion transmembrane transport	78	0,0046
monocyte chemotaxis	10	0,0048
lymphocyte migration	13	0,0050
regulation of cytokine production	63	0,0050
organic anion transport	45	0,0050
leukocyte migration	39	0,0050
cell migration	78	0,0053
response to lipid	68	0,0053
positive regulation of cytokine production	45	0,0053
regulation of nervous system development	78	0,0056
muscle contraction	24	0,0193
forebrain anterior/posterior pattern specification	3	0,0193
positive regulation of interferon-alpha biosynthetic process	3	0,0193
neuropeptide signaling pathway	15	0,0197
muscle fiber development	10	0,0197
positive regulation of neuroinflammatory response	5	0,0197
regulation of neurogenesis	67	0,0202
negative regulation of cellular response to transforming growth factor beta stimulus	12	0,0204
metal ion homeostasis	54	0,0206
ossification	16	0,0207
regulation of MAPK cascade	62	0,0232
positive regulation of cytosolic calcium ion concentration	30	0,0232
cation transport	68	0,0234
positive regulation of leukocyte migration	17	0,0234
regulation of cytokine secretion	23	0,0234
nervous system process	76	0,0239
positive regulation of cellular component movement	48	0,0239
striated muscle contraction	12	0,0239
regulation of cell motility	73	0,0241
xenobiotic glucuronidation	4	0,0242
regulation of heart rate by cardiac conduction	8	0,0243
lymphocyte chemotaxis	9	0,0244
negative regulation of bone remodeling	5	0,0245
regulation of cellular process	663	0,0255

monovalent inorganic cation transport	41	0,0058
granulocyte migration	16	0,0058
response to other organism	82	0,0063
neutrophil migration	15	0,0063
flavone metabolic process	4	0,0066
homophilic cell adhesion via plasma membrane adhesion molecules	22	0,0068
leukocyte activation	75	0,0072
regulation of cellular component movement	82	0,0074
cell recognition	27	0,0074
developmental maturation	24	0,0077
cell motility	83	0,0079
positive regulation of inflammatory response	19	0,0089
cell maturation	19	0,0095
positive regulation of leukocyte proliferation	19	0,0095
cellular glucuronidation	6	0,0095
regulation of cell adhesion	60	0,0097
regulation of ion transport	61	0,0099
metal ion transport	57	0,0104
bone mineralization	10	0,0110
regulation of cytosolic calcium ion concentration	35	0,0113
acute-phase response	9	0,0119
regulation of interferon-gamma production	15	0,0119
positive regulation of cytokine biosynthetic process	12	0,0119
flavonoid glucuronidation	4	0,0119
regulation of atrial cardiac muscle cell membrane depolarization	4	0,0119
immune system process	174	0,0122
positive regulation of lymphocyte proliferation	18	0,0123
positive regulation of mononuclear cell proliferation	18	0,0133
positive regulation of cell activation	40	0,0139
positive regulation of cell adhesion	39	0,0148
positive regulation of immune system process	90	0,0150
cellular response to lipid	40	0,0150
cell fate commitment	19	0,0150
defense response to bacterium	33	0,0153
T cell selection	7	0,0153
membrane depolarization	10	0,0155
membrane depolarization during action potential	7	0,0255
positive regulation of Rho protein signal transduction	7	0,0255
regulation of protein secretion	42	0,0262
muscle cell development	13	0,0262
regulation of striated muscle contraction	13	0,0262
regulation of bone remodeling	9	0,0270
regulation of muscle contraction	19	0,0291
regulation of ion transmembrane transport	43	0,0300
ion homeostasis	64	0,0304
cellular response to mechanical stimulus	12	0,0304
positive regulation of chemotaxis	17	0,0304
detection of temperature stimulus involved in sensory perception of pain	5	0,0310
positive regulation of icosanoid secretion	5	0,0310
animal organ development	95	0,0310
sarcomere organization	8	0,0310
negative regulation of cell differentiation	58	0,0310
calcium ion homeostasis	41	0,0313
T-helper cell lineage commitment	4	0,0330
chondrocyte proliferation	4	0,0330
positive regulation of protein kinase A signaling	4	0,0330
chemical homeostasis	84	0,0332
positive regulation of cell motility	46	0,0332
positive regulation of cytokine-mediated signaling pathway	9	0,0333
cellular response to fructose stimulus	3	0,0335
response to erythropoietin	3	0,0335
cellular metal ion homeostasis	48	0,0343
regulation of bone resorption	8	0,0345
antibiotic metabolic process	14	0,0347
cellular response to tumor necrosis factor	16	0,0348
regulation of signaling	234	0,0349
embryonic digestive tract development	5	0,0379
membrane depolarization during cardiac muscle cell action potential	5	0,0379
cardiac muscle cell action potential involved in contraction	7	0,0388
second-messenger-mediated signaling	32	0,0392
inorganic anion transport	18	0,0392
positive regulation of cytokine secretion	17	0,0392

hormone metabolic process	24	0,0156
chemokine-mediated signaling pathway	13	0,0157
response to interleukin-1	16	0,0160
negative regulation of bone resorption	5	0,0160
negative regulation of glycolytic process	5	0,0160
urate metabolic process	5	0,0160
regulation of leukocyte migration	23	0,0160
cellular response to organic substance	106	0,0160
calcium-mediated signaling	19	0,0160
immune response	97	0,0163
positive regulation of locomotion	50	0,0163
cell-matrix adhesion	15	0,0163
cellular response to interleukin-1	13	0,0163
defense response	93	0,0164
regulation of locomotion	79	0,0165
drug catabolic process	18	0,0170
regulation of postsynaptic membrane potential	15	0,0171
positive regulation of interferon-gamma production	11	0,0171
response to fructose	4	0,0171
regulation of cell population proliferation	119	0,0176
regulation of membrane depolarization	9	0,0180
regulation of cell activation	55	0,0183
regulation of chemotaxis	24	0,0183
regulation of immune system process	122	0,0193
negative regulation of transforming growth factor beta receptor signaling pathway	11	0,0392
regulation of cell migration	67	0,0398
response to lipopolysaccharide	29	0,0398
positive regulation of MAPK cascade	46	0,0416
G protein-coupled receptor signaling pathway, coupled to cyclic nucleotide second messenger	25	0,0416
regulation of ERK1 and ERK2 cascade	28	0,0419
T cell differentiation	14	0,0419
potassium ion transport	19	0,0426
cellular homeostasis	68	0,0427
positive regulation of T cell proliferation	13	0,0427
response to molecule of bacterial origin	30	0,0428
neuron fate commitment	7	0,0428
negative thymic T cell selection	4	0,0428
regulation of lymphocyte activation	44	0,0441
memory	15	0,0447
chloride transmembrane transport	13	0,0447
positive regulation of interleukin-6 production	13	0,0447
regulation of heart rate	13	0,0447
positive regulation of fatty acid transport	5	0,0447
oligodendrocyte differentiation	6	0,0457
homeostatic process	110	0,0462
cellular calcium ion homeostasis	39	0,0465
cell-substrate adhesion	18	0,0497

Tabelle 16: Biologische Prozesse mit signifikanter Anreicherung von differentiell exprimierten Genen nach Inkubation von Caco-2 Zellen mit *L. casei* MVs für 48 h.
Zur Einordnung der Veränderungen in den Caco-2 Zellen in biologische Prozesse wurde auf Grundlage der differentiell exprimierten Gene nach Inkubation mit *L. casei* MVs für 48 h eine Anreicherungsanalyse (*Over-representation analysis*, ORA) mit GeneTrail 3.2 durchgeführt. Dargestellt sind, mit Bezug zur **Abb. 30 A**, alle weiteren biologischen Prozesse (Termini der Gene Ontology Kategorie: „Biological Process“), in denen die differentiell exprimierten Gene entsprechend ihres Benjamini-Hochberg-adjustierten p-Wertes signifkant angereichert waren sowie die Anzahl der jeweiligen Gene.

GO - Biological Process	Anzahl der Hits	Adj. p-Wert
metal ion transport	37	0,0499
eye photoreceptor cell development	6	0,0499

Tabelle 17: Biologische Prozesse mit signifikanter Anreicherung von differentiell exprimierten Genen nach Transfektion von Caco-2 Zellen mit *E. faecalis* MV-RNA für 10 h.
Zur Einordnung der Veränderungen in den Caco-2 Zellen in biologische Prozesse wurde auf Grundlage der differentiell exprimierten Gene nach Transfektion mit *E. faecalis* MV-RNA für 10 h eine Anreicherungsanalyse (*Over-representation analysis*, ORA) mit GeneTrail 3.2 durchgeführt. Dargestellt sind, mit Bezug zur **Abb. 32 B**, alle weiteren biologischen Prozesse (Termini der Gene Ontology Kategorie: „Biological Process"), in denen die differentiell exprimierten Gene entsprechend ihres Benjamini-Hochberg-adjustierten p-Wertes signifkant angereichert waren sowie die Anzahl der jeweiligen Gene.

GO - Biological Process	Anzahl der Hits	Adj. p-Wert
cell-cell adhesion	50	0,0001
response to steroid hormone	29	0,0001
potassium ion transport	24	0,0001
regulation of immune system process	121	0,0002
anatomical structure morphogenesis	107	0,0002
response to external biotic stimulus	93	0,0002
response to glucocorticoid	22	0,0002
transmembrane transport	98	0,0002
response to corticosteroid	23	0,0003
cell surface receptor signaling pathway	157	0,0003
cell communication	72	0,0003
response to other organism	79	0,0003
regulation of secretion	68	0,0003
regulation of granulocyte chemotaxis	11	0,0004
immune system process	164	0,0004
cell differentiation	131	0,0004
second-messenger-mediated signaling	36	0,0004
positive regulation of immune system process	88	0,0004
regulated exocytosis	59	0,0004
regulation of cell adhesion	59	0,0005
cation transport	69	0,0005
leukocyte differentiation	32	0,0005
regulation of signal transduction	199	0,0006
metal ion transport	56	0,0006
inflammatory response	43	0,0006
exocytosis	63	0,0007
regulation of cell population proliferation	114	0,0007
regulation of hormone levels	48	0,0010
signal transduction	295	0,0010
cell motility	78	0,0010

GO - Biological Process	Anzahl der Hits	Adj. p-Wert
negative regulation of immune system process	37	0,0171
positive regulation of cytokine production	37	0,0181
positive regulation of epidermal growth factor-activated receptor activity	4	0,0181
positive regulation of prostaglandin secretion	4	0,0181
regulation of synapse organization	22	0,0183
positive regulation of protein kinase activity	42	0,0186
negative regulation of signal transduction	83	0,0187
cell activation involved in immune response	47	0,0187
regulation of striated muscle contraction	12	0,0192
cellular glucuronidation	5	0,0192
regulation of lymphocyte apoptotic process	9	0,0192
positive regulation of signaling receptor activity	7	0,0193
response to purine-containing compound	17	0,0193
adenylate cyclase-activating G protein-coupled receptor signaling pathway	15	0,0198
positive regulation of stress-activated MAPK cascade	18	0,0198
homeostatic process	99	0,0199
calcium ion homeostasis	37	0,0199
visual perception	21	0,0199
semicircular canal morphogenesis	3	0,0199
muscle system process	24	0,0204
sensory perception	44	0,0205
anion transport	44	0,0211
sodium ion transport	17	0,0214
cell-matrix adhesion	13	0,0215
positive regulation of stress-activated protein kinase signaling cascade	18	0,0218
negative regulation of signaling	88	0,0223
positive regulation of granulocyte chemotaxis	6	0,0223
positive regulation of cytokine biosynthetic process	10	0,0229
regulation of T cell activation	28	0,0230
positive regulation of kinase activity	44	0,0232

positive regulation of leukocyte chemotaxis	15	0,0010
response to organic substance	146	0,0010
cell-cell adhesion via plasma-membrane adhesion molecules	29	0,0010
regulation of cell motility	72	0,0011
lymphocyte activation	35	0,0011
response to lipid	63	0,0012
regulation of locomotion	76	0,0012
regulation of cellular process	595	0,0012
positive regulation of MAPK cascade	48	0,0012
neuron differentiation	28	0,0012
positive regulation of chemotaxis	19	0,0013
regulation of cellular component movement	76	0,0014
positive regulation of protein phosphorylation	77	0,0014
regulation of calcium ion-dependent exocytosis	10	0,0015
sodium ion transmembrane transport	15	0,0016
extracellular structure organization	34	0,0017
cell migration	71	0,0018
positive regulation of signal transduction	115	0,0018
positive regulation of cell adhesion	38	0,0019
regulation of immune response	84	0,0019
drug metabolic process	44	0,0019
chemical synaptic transmission	32	0,0021
positive regulation of phosphorylation	79	0,0022
cytokine-mediated signaling pathway	55	0,0022
positive regulation of intracellular signal transduction	76	0,0022
embryonic organ morphogenesis	17	0,0024
embryonic eye morphogenesis	7	0,0024
positive regulation of locomotion	48	0,0024
positive regulation of cell motility	46	0,0027
regulation of chemotaxis	24	0,0030
response to hormone	56	0,0030
extracellular matrix organization	33	0,0031
xenobiotic metabolic process	17	0,0034
animal organ development	90	0,0035
leukocyte migration	35	0,0037
regulation of cell activation	52	0,0038
exogenous drug catabolic process	7	0,0039
positive regulation of fatty acid transport	5	0,0232
regulation of membrane potential	35	0,0234
sensory perception of light stimulus	21	0,0234
regulation of lymphocyte activation	40	0,0247
regulation of neutrophil migration	7	0,0247
positive regulation of metabolic process	209	0,0248
regulation of JNK cascade	19	0,0252
tissue morphogenesis	32	0,0252
chemokine-mediated signaling pathway	11	0,0252
embryonic morphogenesis	34	0,0256
regulation of fatty acid transport	6	0,0257
positive regulation of cellular biosynthetic process	123	0,0260
chemical homeostasis	74	0,0261
neutrophil activation	39	0,0267
regulation of tube size	15	0,0274
positive regulation of T-helper 1 type immune response	5	0,0280
regulation of transcription, DNA-templated	197	0,0291
regulation of catalytic activity	140	0,0291
T cell activation	20	0,0299
regulation of tumor necrosis factor production	16	0,0300
homeostasis of number of cells within a tissue	6	0,0300
mononuclear cell migration	8	0,0302
positive regulation of cell differentiation	66	0,0304
hormone metabolic process	20	0,0310
endothelial cell morphogenesis	4	0,0311
positive regulation of chemokine biosynthetic process	4	0,0311
positive regulation of peptidyl-tyrosine phosphorylation	19	0,0312
actin filament-based movement	10	0,0312
regulation of phospholipase activity	10	0,0312
chemorepulsion of axon	3	0,0317
flavone metabolic process	3	0,0317
calcium ion transmembrane transport	20	0,0319
cellular response to interferon-gamma	12	0,0323
positive regulation of interleukin-6 production	12	0,0323
response to cAMP	12	0,0323
positive regulation of phospholipase activity	9	0,0324
positive regulation of interleukin-8 production	8	0,0327

anatomical structure formation involved in morphogenesis	57	0,0041
regulation of cell migration	65	0,0041
regulation of bone resorption	9	0,0044
positive regulation of prostaglandin-E synthase activity	3	0,0044
positive regulation of cellular component movement	46	0,0044
regulation of blood pressure	19	0,0047
regulation of angiogenesis	29	0,0048
adenylate cyclase-modulating G protein-coupled receptor signaling pathway	23	0,0054
positive regulation of immune response	64	0,0054
myeloid leukocyte activation	48	0,0054
regulation of leukocyte migration	22	0,0054
positive regulation of cell population proliferation	68	0,0056
icosanoid metabolic process	15	0,0056
positive regulation of leukocyte migration	17	0,0056
positive regulation of transcription by RNA polymerase II	85	0,0057
cardiac conduction	12	0,0058
odontogenesis	15	0,0060
regulation of transcription by RNA polymerase II	145	0,0061
arachidonic acid metabolic process	10	0,0061
positive regulation of regulated secretory pathway	10	0,0061
positive regulation of gene expression	129	0,0063
monovalent inorganic cation transport	36	0,0063
muscle contraction	23	0,0063
positive regulation of calcium ion-dependent exocytosis	6	0,0063
positive regulation of secretion	38	0,0067
regulation of cell-cell adhesion	36	0,0068
nervous system development	29	0,0069
positive regulation of cell-cell adhesion	26	0,0072
positive regulation of voltage-gated calcium channel activity	5	0,0074
heterotypic cell-cell adhesion	8	0,0076
response to organophosphorus	17	0,0076
G protein-coupled receptor signaling pathway, coupled to cyclic nucleotide second messenger	25	0,0078
epoxygenase P450 pathway	5	0,0328
positive regulation of cell adhesion mediated by integrin	5	0,0328
cellular calcium ion homeostasis	35	0,0332
negative regulation of transforming growth factor beta receptor signaling pathway	10	0,0332
positive regulation of G protein-coupled receptor signaling pathway	6	0,0334
positive regulation of nucleic acid-templated transcription	103	0,0335
positive regulation of RNA biosynthetic process	103	0,0336
cellular homeostasis	60	0,0336
response to metal ion	30	0,0336
regulation of leukocyte proliferation	21	0,0336
neurotransmitter transport	15	0,0336
regulation of dopamine secretion	7	0,0336
bilirubin conjugation	2	0,0336
histamine biosynthetic process	2	0,0336
lateral sprouting involved in mammary gland duct morphogenesis	2	0,0336
mesodermal to mesenchymal transition involved in gastrulation	2	0,0336
negative regulation of retinal ganglion cell axon guidance	2	0,0336
neurohypophysis development	2	0,0336
non-canonical Wnt signaling pathway involved in midbrain dopaminergic neuron differentiation	2	0,0336
positive regulation of granulocyte macrophage colony-stimulating factor biosynthetic process	2	0,0336
positive regulation of toll-like receptor 7 signaling pathway	2	0,0336
urokinase plasminogen activator signaling pathway	2	0,0336
uterine wall breakdown	2	0,0336
central nervous system neuron differentiation	11	0,0339
positive regulation of lipase activity	10	0,0341
regulation of bone mineralization	10	0,0341
platelet degranulation	14	0,0343
cellular response to lipid	33	0,0344
positive regulation of protein modification process	80	0,0345
fertilization	12	0,0345
regulation of protein secretion	36	0,0360
acute-phase response	7	0,0365

positive regulation of leukocyte cell-cell adhesion	23	0,0081
lymphocyte differentiation	22	0,0084
eye morphogenesis	9	0,0085
regulation of cytokine production	54	0,0087
regulation of cell differentiation	117	0,0093
positive regulation of ion transport	27	0,0093
regulation of neutrophil degranulation	4	0,0093
tissue homeostasis	18	0,0095
regulation of cell adhesion mediated by integrin	9	0,0097
intracellular signal transduction	107	0,0097
positive regulation of JNK cascade	17	0,0099
regulation of neutrophil chemotaxis	7	0,0099
positive regulation of angiogenesis	19	0,0099
activation of MAPK activity	18	0,0099
actin-myosin filament sliding	8	0,0101
muscle filament sliding	8	0,0101
homophilic cell adhesion via plasma membrane adhesion molecules	19	0,0104
regulation of interleukin-6 production	17	0,0104
regulation of bone remodeling	9	0,0107
defense response to other organism	59	0,0108
G protein-coupled receptor signaling pathway	89	0,0110
integrin-mediated signaling pathway	13	0,0112
osteoclast proliferation	3	0,0112
positive regulation of neutrophil degranulation	3	0,0112
positive regulation of transcription, DNA-templated	102	0,0116
response to stimulus	325	0,0116
actin-mediated cell contraction	9	0,0116
regulation of synapse assembly	14	0,0118
cyclic-nucleotide-mediated signaling	19	0,0119
positive regulation of transport	70	0,0122
positive regulation of macrophage chemotaxis	5	0,0124
transport	248	0,0125
epithelial cell morphogenesis	6	0,0365
positive regulation of peptidyl-threonine phosphorylation	6	0,0365
negative regulation of cellular response to transforming growth factor beta stimulus	10	0,0366
positive regulation of granulocyte macrophage colony-stimulating factor production	4	0,0366
positive regulation of type I interferon-mediated signaling pathway	4	0,0366
gland morphogenesis	5	0,0366
calcium ion transport	23	0,0368
tissue development	46	0,0382
regulation of protein phosphorylation	91	0,0386
reactive oxygen species metabolic process	13	0,0389
positive regulation of MAP kinase activity	23	0,0400
calcium-ion regulated exocytosis	7	0,0408
cell development	47	0,0409
skeletal system development	17	0,0409
positive regulation of exocytosis	11	0,0414
activation of phospholipase C activity	6	0,0414
negative regulation of endopeptidase activity	22	0,0416
unsaturated fatty acid metabolic process	12	0,0416
regulation of nucleic acid-templated transcription	198	0,0419
striated muscle contraction	10	0,0426
acute inflammatory response	9	0,0426
mammary gland development	5	0,0432
positive regulation of macrophage migration	5	0,0432
regulation of urine volume	5	0,0432
flavonoid glucuronidation	3	0,0432
negative regulation of chemokine-mediated signaling pathway	3	0,0432
taurine metabolic process	3	0,0432
regulation of RNA biosynthetic process	198	0,0435
leukocyte degranulation	38	0,0435
regulation of intracellular signal transduction	111	0,0435
regulation of hormone secretion	23	0,0437
cellular response to inorganic substance	20	0,0440

regulation of regulated secretory pathway	18	0,0128
cellular response to organic substance	93	0,0129
regulation of epithelial cell proliferation	30	0,0129
receptor clustering	9	0,0129
response to interferon-gamma	15	0,0132
positive regulation of cell migration	41	0,0132
regulation of muscle contraction	18	0,0133
cAMP-mediated signaling	17	0,0134
single fertilization	10	0,0135
positive regulation of toll-like receptor signaling pathway	6	0,0136
immune response	85	0,0138
cellular response to metal ion	20	0,0147
positive regulation of innate immune response	30	0,0155
regulation of vasculature development	29	0,0155
response to bacterium	35	0,0155
regulation of interferon-gamma production	13	0,0157
leukocyte cell-cell adhesion	9	0,0160
monocyte chemotaxis	8	0,0162
regulation of tissue remodeling	11	0,0163
response to organic cyclic compound	56	0,0163
bone resorption	6	0,0163
positive regulation of neutrophil chemotaxis	6	0,0163
regulation of excretion	6	0,0163
regulation of cytokine production involved in immune response	12	0,0166
positive regulation of macromolecule biosynthetic process	120	0,0171
regulation of MAPK cascade	55	0,0171
leukocyte activation involved in immune response	47	0,0171
regulation of ion transmembrane transport	39	0,0171
cellular defense response	8	0,0440
positive regulation of T cell mediated immunity	8	0,0440
regulation of voltage-gated calcium channel activity	7	0,0440
metal ion homeostasis	45	0,0442
neutrophil activation involved in immune response	37	0,0442
forebrain neuron differentiation	4	0,0442
macrophage chemotaxis	4	0,0442
negative regulation of catecholamine secretion	4	0,0442
negative regulation of lymphocyte migration	4	0,0442
positive regulation of inositol phosphate biosynthetic process	4	0,0442
positive regulation of urine volume	4	0,0442
regulation of osteoclast differentiation	9	0,0446
positive regulation of T cell activation	19	0,0447
regulation of exocytosis	20	0,0450
cellular metal ion homeostasis	41	0,0468
cell morphogenesis	20	0,0470
regulation of signaling receptor activity	17	0,0473
muscle fiber development	8	0,0474
response to lipopolysaccharide	25	0,0475
response to molecule of bacterial origin	26	0,0476
regulation of blood vessel diameter	14	0,0476
export across plasma membrane	7	0,0476
negative chemotaxis	7	0,0476
positive regulation of phospholipase C activity	7	0,0476
regulation of cytokine biosynthetic process	12	0,0476
regulation of cell-substrate adhesion	19	0,0479
cellular chemical homeostasis	51	0,0494
positive regulation of epithelial cell proliferation	18	0,0495

Tabelle 18: Differentielle Expression ausgewählter Gene nach Inkubation oder Transfektion von Caco-2 Zellen mit *E. faecalis* MVs oder *E. faecalis* MV-RNA.
Angegeben sind die Log2 Fold Changes (FC) und Cohen's *d*. Ein Log2 FC > 1 entspricht einer erhöhten Expression und ein Log2 FC < -1 entspricht einer verringerten Expression des entsprechenden Gens in den Zellen, die mit den *E. faecalis* MVs im Vergleich zu PBS inkubiert oder mit der *E. faecalis* MV-RNA im Vergleich zur ANC (AllStars *Negative Control* siRNA) transfiziert wurden.

Gene	Zeit-punkt	Behandlung	Log2 FC	Cohen's *d*
CCL14	24 h	Inkubation	2,54	1,59
CCL17	10 h	Transfektion	1,53	5,55
CCL2	10 h	Transfektion	-2,57	1,59
CCL21	10 h	Transfektion	-2,03	0,82
CCL22	10 h	Transfektion	-1,83	0,82
CCL23	10 h	Transfektion	-1,83	0,82
CCL25	24 h	Inkubation	-1,09	1,89
CCL5	10 h	Transfektion	1,24	0,82
CCR9	10 h	Inkubation	1,56	1,23
CLDN10	10 h	Transfektion	-3,45	1,24
CLDN18	10 h	Transfektion	2,62	2,10
CLDN2	24 h	Inkubation	-1,48	1,25
CSF1	10 h	Transfektion	1,72	1,75
CXCL1	10 h	Transfektion	1,01	1,51
CXCL10	24 h	Transfektion	3,48	1,80
CXCL11	24 h	Inkubation	-1,21	1,10
CXCL11	10 h	Transfektion	-1,83	0,82
CXCL17	10 h	Transfektion	2,06	3,24
CXCL3	10 h	Transfektion	1,18	1,97
CXCL8	10 h	Inkubation	1,66	2,55
CXCL9	24 h	Transfektion	2,55	2,11
CXCR1	24 h	Inkubation	2,02	0,91
CXCR3	10 h	Inkubation	-1,66	1,01
CXCR3	24 h	Inkubation	-1,01	1,00
IFNE	24 h	Inkubation	-1,37	0,91
IFNK	10 h	Inkubation	-2,34	1,21

Gene	Zeit-punkt	Behandlung	Log2 FC	Cohen's *d*
IL10RA	10 h	Inkubation	1,23	0,83
IL11RA	24 h	Inkubation	-1,26	2,76
IL15	10 h	Inkubation	-1,93	0,88
IL17C	24 h	Inkubation	1,97	1,03
IL18R1	10 h	Inkubation	-2,13	1,62
IL18R1	24 h	Inkubation	2,54	1,59
IL18R1	10 h	Transfektion	-2,03	0,82
IL1A	24 h	Inkubation	-1,24	0,93
IL1B	10 h	Transfektion	-2,01	2,17
IL1RN	10 h	Transfektion	-1,83	0,82
IL23R	24 h	Inkubation	1,70	0,91
IL27	24 h	Inkubation	1,43	0,82
IL31RA	10 h	Inkubation	2,33	5,06
IL31RA	10 h	Transfektion	-2,57	1,59
IL31RA	24 h	Transfektion	1,92	1,39
IL37	10 h	Inkubation	1,23	1,22
IL5RA	10 h	Inkubation	-1,14	0,87
IL5RA	24 h	Inkubation	2,31	1,25
IL6	10 h	Inkubation	-2,33	0,86
NOD2	10 h	Transfektion	1,56	1,49
TLR3	10 h	Transfektion	2,13	1,09
TLR4	24 h	Inkubation	1,70	0,91
TNFRSF10C	10 h	Inkubation	1,27	1,18
TNFSF11	10 h	Transfektion	-1,83	0,82
TNFSF12	10 h	Inkubation	-2,03	2,72
TNFSF4	10 h	Inkubation	-1,37	1,34

Tabelle 19: Biologische Prozesse mit signifikanter Anreicherung von differentiell exprimierten Genen nach Inkubation von Caco-2 Zellen mit *P. mirabilis* OMVs für 10 h.
Zur Einordnung der Veränderungen in den Caco-2 Zellen in biologische Prozesse wurde auf Grundlage der differentiell exprimierten Gene nach Inkubation mit *P. mirabilis* OMVs für 10 h eine Anreicherungsanalyse (*Over-representation analysis*, ORA) mit GeneTrail 3.2 durchgeführt. Dargestellt sind, mit Bezug zur **Abb. 35 A**, alle weiteren biologischen Prozesse (Termini der Gene Ontology Kategorie: „Biological Process“) in denen die differentiell exprimierten Gene entsprechend ihres Benjamini-Hochberg-adjustierten p-Wertes signifkant angereichert waren sowie die Anzahl der jeweiligen Gene.

GO - Biological Process	Anzahl der Hits	Adj. p-Wert
antimicrobial humoral response	11	0,0249
cellular response to pH	5	0,0249
myeloid dendritic cell activation	5	0,0249
myeloid leukocyte activation	32	0,0257
immune response	57	0,0295

cellular response to molecule of bacterial origin	14	0,0295
cytokine production	10	0,0295
ovulation cycle	5	0,0295
angiogenesis involved in wound healing	4	0,0438
estrous cycle	4	0,0438
aromatic amino acid family metabolic process	6	0,0473
epinephrine biosynthetic process	2	0,0473
leukocyte adhesive activation	2	0,0473
neurohypophysis development	2	0,0473
cellular response to lipid	24	0,0495

Tabelle 20: Differentielle Expression ausgewählter Gene nach Inkubation oder Transfektion von Caco-2 Zellen mit *P. mirabilis* OMVs oder *P. mirabilis* OMV-RNA.
Angegeben sind die Log2 Fold Changes (FC) und Cohen's *d*. Ein Log2 FC > 1 entspricht einer erhöhten Expression und ein Log2 FC < -1 entspricht einer verringerten Expression des entsprechenden Gens in den Zellen, die mit den *P. mirabilis* OMVs im Vergleich zu PBS inkubiert oder mit der *P. mirabilis* OMV-RNA im Vergleich zur ANC (AllStars *Negative Control* siRNA) transfiziert wurden.

Gene	Zeit-punkt	Behandlung	Log2 FC	Cohen's *d*
CASP1	24 h	Inkubation	2,34	2,08
CCL15	24 h	Transfektion	1,97	1,77
CCL20	10 h	Inkubation	1,44	1,17
CCL20	24 h	Inkubation	2,04	1,56
CCL20	10 h	Transfektion	-1,43	0,93
CCL22	10 h	Inkubation	3,88	1,77
CCR1	10 h	Inkubation	-1,08	1,38
CCR1	24 h	Transfektion	-1,24	2,12
CLDN10	24 h	Transfektion	1,36	1,07
CLDN14	10 h	Transfektion	-1,08	1,76
CLDN18	24 h	Inkubation	2,07	1,17
CLDN18	10 h	Transfektion	-1,93	5,29
CLDN6	10 h	Transfektion	-1,01	1,64
CSF3	24 h	Inkubation	2,27	0,83
CX3CL1	10 h	Inkubation	1,66	1,03
CX3CL1	10 h	Transfektion	-2,04	0,98
CXCL1	24 h	Inkubation	2,05	3,43
CXCL10	10 h	Inkubation	2,82	2,16
CXCL10	24 h	Inkubation	2,08	2,27
CXCL11	10 h	Inkubation	2,47	1,41
CXCL5	10 h	Inkubation	6,58	1,93
CXCL5	10 h	Transfektion	-1,28	0,91
CXCL5	24 h	Transfektion	1,29	1,18
CXCL6	10 h	Inkubation	3,70	1,74
CXCL8	10 h	Inkubation	2,13	1,39
CXCL8	24 h	Inkubation	2,88	0,92
CXCR4	24 h	Inkubation	3,47	1,20
IFNK	10 h	Inkubation	-2,23	0,93

Gene	Zeit-punkt	Behandlung	Log2 FC	Cohen's *d*
IFNL2	24 h	Inkubation	1,86	1,22
IL12RB2	24 h	Inkubation	-1,31	1,59
IL15	24 h	Inkubation	2,60	1,35
IL15RA	24 h	Inkubation	1,99	0,90
IL17C	10 h	Inkubation	-1,65	0,82
IL18R1	10 h	Inkubation	-2,76	1,63
IL18R1	24 h	Inkubation	2,74	1,82
IL1B	10 h	Transfektion	-1,05	0,99
IL20RA	24 h	Inkubation	1,01	1,03
IL21R	24 h	Inkubation	2,00	0,82
IL23R	10 h	Inkubation	1,33	1,16
IL27	24 h	Transfektion	1,62	1,12
IL31RA	10 h	Inkubation	1,37	2,09
IL34	24 h	Inkubation	-1,25	1,21
IL36G	10 h	Inkubation	-2,11	1,04
IL5RA	24 h	Inkubation	2,39	1,46
IL6	24 h	Transfektion	1,69	1,18
NOD2	24 h	Inkubation	1,31	1,21
TLR3	24 h	Inkubation	1,98	2,00
TLR3	24 h	Transfektion	-1,60	1,18
TLR6	24 h	Inkubation	-1,10	1,21
TLR7	10 h	Inkubation	1,52	0,96
TLR7	24 h	Inkubation	2,14	1,65
TNFRSF11A	24 h	Inkubation	1,38	0,94
TNFRSF11A	10 h	Transfektion	1,72	0,94
TNFSF4	10 h	Inkubation	-1,94	1,67
TNFSF9	10 h	Transfektion	1,42	1,03

Tabelle 21: Biologische Prozesse mit signifikanter Anreicherung von differentiell exprimierten Genen nach Inkubation von Caco-2 Zellen mit *P. mirabilis* OMVs für 24 h.
Zur Einordnung der Veränderungen in den Caco-2 Zellen in biologische Prozesse wurde auf Grundlage der differentiell exprimierten Gene nach Inkubation mit *P. mirabilis* OMVs für 24 h eine Anreicherungsanalyse (*Over-representation analysis*, ORA) mit GeneTrail 3.2 durchgeführt. Dargestellt sind, mit Bezug zur **Abb. 36 A**, alle weiteren biologischen Prozesse (Termini der Gene Ontology Kategorie: „Biological Process“) in denen die differentiell exprimierten Gene entsprechend ihres Benjamini-Hochberg-adjustierten p-Wertes signifkant angereichert waren sowie die Anzahl der jeweiligen Gene.

GO - Biological Process	Anzahl der Hits	Adj. p-Wert
cellular process	568	0,0097
cellular response to molecule of bacterial origin	17	0,0120
cell activation	58	0,0130
cellular response to lipid	30	0,0135
monocarboxylic acid metabolic process	35	0,0143
extracellular structure organization	26	0,0143
regulation of synaptic transmission, glutamatergic	10	0,0143
anatomical structure morphogenesis	76	0,0143
regulation of cell differentiation	92	0,0147
neuron differentiation	21	0,0156
cellular response to lipopolysaccharide	16	0,0161
response to mechanical stimulus	18	0,0163
regulation of hormone levels	35	0,0189
positive regulation of cell differentiation	55	0,0209
ion homeostasis	47	0,0209
positive regulation of cytokine production	31	0,0209
chemical synaptic transmission	24	0,0211
actin-myosin filament sliding	7	0,0211
muscle filament sliding	7	0,0211
plasma membrane fusion	5	0,0211
cytokine-mediated signaling pathway	41	0,0215
neurotransmitter transport	14	0,0215
extracellular matrix organization	25	0,0219
regulation of immune system process	84	0,0221
regulation of cell population proliferation	82	0,0221
secretion	60	0,0221
organic acid metabolic process	55	0,0221
positive regulation of cell population proliferation	52	0,0221
response to drug	46	0,0221
G protein-coupled receptor signaling pathway, coupled to cyclic nucleotide second messenger	20	0,0221
adenylate cyclase-modulating G protein-coupled receptor signaling pathway	18	0,0221
reproductive process	73	0,0274
negative regulation of neuron migration	4	0,0275
neuron projection guidance	20	0,0278
secretion by cell	54	0,0278
retinoic acid metabolic process	6	0,0283
peptidyl-tyrosine phosphorylation	14	0,0283
response to vitamin	10	0,0283
animal organ morphogenesis	33	0,0294
nervous system process	53	0,0296
response to bacterium	28	0,0296
cellular chemical homeostasis	43	0,0297
chemotaxis	24	0,0297
phenol-containing compound metabolic process	10	0,0297
regulation of cellular process	433	0,0322
positive regulation of chondrocyte differentiation	5	0,0339
homeostatic process	77	0,0345
regulation of protein phosphorylation	73	0,0345
regulation of cytokine production	41	0,0345
cell development	39	0,0345
regulation of neurogenesis	46	0,0372
anion transport	35	0,0372
regulation of postsynaptic membrane potential	11	0,0372
immune response	65	0,0378
leukocyte activation	49	0,0378
cation homeostasis	41	0,0383
hormone secretion	9	0,0392
peptide hormone secretion	8	0,0393
fusion of sperm to egg plasma membrane involved in single fertilization	4	0,0393
response to other organism	53	0,0394
organic anion transport	29	0,0394
odontogenesis of dentin-containing tooth	9	0,0394

cell chemotaxis	18	0,0221	behavioral response to formalin induced pain	2	0,0394
visual perception	18	0,0221	metanephric loop of Henle development	2	0,0394
synapse organization	17	0,0221	peptidyl-lysine N6-acetylation	2	0,0394
response to manganese ion	5	0,0221	positive regulation of granulocyte macrophage colony-stimulating factor biosynthetic process	2	0,0394
sodium-dependent phosphate transport	3	0,0221	response to fibroblast growth factor	6	0,0397
positive regulation of acute inflammatory response	6	0,0223	axon guidance	19	0,0412
antimicrobial humoral response	12	0,0245	cellular ion homeostasis	38	0,0442
regulation of macrophage activation	8	0,0245	regulation of neutrophil migration	6	0,0450
sensory perception of light stimulus	18	0,0259	actin-mediated cell contraction	7	0,0468
leukocyte chemotaxis	14	0,0259	response to immobilization stress	5	0,0475
regulation of membrane potential	29	0,0273	regulation of heart contraction	18	0,0498

Tabelle 22: Biologische Prozesse mit signifikanter Anreicherung von differentiell exprimierten Genen nach Transfektion von Caco-2 Zellen mit *P. mirabilis* OMV-RNA für 24 h.
Zur Einordnung der Veränderungen in den Caco-2 Zellen in biologische Prozesse wurde auf Grundlage der differentiell exprimierten Gene nach Transfektion mit *P. mirabilis* OMV-RNA für 24 h eine Anreicherungsanalyse (*Over-representation analysis*, ORA) mit GeneTrail 3.2 durchgeführt. Dargestellt sind, mit Bezug zur **Abb. 36 B**, alle weiteren biologischen Prozesse (Termini der Gene Ontology Kategorie: „Biological Process“) in denen die differentiell exprimierten Gene entsprechend ihres Benjamini-Hochberg-adjustierten p-Wertes signifkant angereichert waren sowie die Anzahl der jeweiligen Gene.

GO - Biological Process	Anzahl der Hits	Adj. p-Wert
transmembrane transport	65	0,0400
negative regulation of immune system process	29	0,0400
regulation of ion transport	40	0,0401
intramembranous ossification	3	0,0463
muscle contraction	17	0,0495

Tabelle 23: Biologische Prozesse mit signifikanter Anreicherung von differentiell exprimierten Genen nach Transfektion von Caco-2 Zellen mit *P. mirabilis* LPS für 10 h.
Zur Einordnung der Veränderungen in den Caco-2 Zellen in biologische Prozesse wurde auf Grundlage der differentiell exprimierten Gene nach Transfektion mit *P. mirabilis* LPS für 10 h eine Anreicherungsanalyse (*Over-representation analysis*, ORA) mit GeneTrail 3.2 durchgeführt. Dargestellt sind, mit Bezug zur **Abb. 38 B**, alle weiteren biologischen Prozesse (Termini der Gene Ontology Kategorie: „Biological Process“) in denen die differentiell exprimierten Gene entsprechend ihres Benjamini-Hochberg-adjustierten p-Wertes signifkant angereichert waren sowie die Anzahl der jeweiligen Gene.

GO - Biological Process	Anzahl der Hits	Adj. p-Wert
hyperosmotic response	5	0,0497

Tabelle 24: Differentielle Expression ausgewählter Gene nach Inkubation oder Transfektion von Caco-2 Zellen mit *P. mirabilis* LPS.
Angegeben sind die Log2 Fold Changes (FC) und Cohen's *d*. Ein Log2 FC > 1 entspricht einer erhöhten Expression und ein Log2 FC < -1 entspricht einer verringerten Expression des entsprechenden Gens in den Zellen, die mit den *P. mirabilis* LPS im Vergleich zu PBS inkubiert oder mit der *P. mirabilis* LPS im Vergleich zur ANC (AllStars *Negative Control* siRNA) transfiziert wurden.

Gene	Zeit-punkt	Behandlung	Log2 FC	Cohen's *d*
CASP5	24 h	Inkubation	-1,22	1,57
CCL14	24 h	Inkubation	2,58	0,97
CCL2	10 h	Transfektion	-1,43	1,82
CCL20	10 h	Transfektion	-1,92	1,05
CCL20	24 h	Transfektion	-1,09	1,38
CCL22	24 h	Transfektion	2,35	0,99
CCL5	10 h	Inkubation	2,34	1,07
CCL5	24 h	Inkubation	1,67	1,22
CCR7	24 h	Inkubation	2,46	0,87
CLDN10	10 h	Transfektion	-2,46	0,91
CLDN14	10 h	Transfektion	-1,67	1,76
CSF1	24 h	Transfektion	-1,55	1,28
CXCL11	24 h	Inkubation	-1,97	1,20
CXCL6	10 h	Transfektion	1,72	0,95
CXCL9	10 h	Inkubation	1,03	0,94
CXCR3	24 h	Transfektion	-2,15	1,63
CXCR4	24 h	Inkubation	3,16	1,07
CXCR4	24 h	Transfektion	-1,78	0,86
IFNE	24 h	Transfektion	-1,64	1,22
IL10RA	24 h	Inkubation	1,69	0,91
IL12A	24 h	Transfektion	-1,03	1,39
IL15	10 h	Inkubation	-2,88	1,15
IL15	24 h	Transfektion	-1,54	1,04
IL15RA	24 h	Inkubation	1,26	0,89
IL16	24 h	Inkubation	1,28	2,72
IL17B	10 h	Transfektion	2,58	1,11
IL17B	24 h	Transfektion	-1,47	0,90
IL17C	24 h	Inkubation	2,07	0,94

Gene	Zeit-punkt	Behandlung	Log2 FC	Cohen's *d*
IL18R1	24 h	Transfektion	-2,27	1,72
IL1A	10 h	Transfektion	-2,39	1,19
IL1RL2	24 h	Inkubation	1,67	1,22
IL1RN	24 h	Inkubation	1,42	0,95
IL21R	24 h	Inkubation	3,24	1,08
IL23A	24 h	Transfektion	-1,63	1,20
IL23R	24 h	Transfektion	3,43	1,02
IL27	24 h	Inkubation	2,09	1,12
IL34	24 h	Inkubation	1,81	1,19
IL5	24 h	Inkubation	2,12	1,60
IL5	24 h	Transfektion	-1,14	1,22
IL5RA	24 h	Inkubation	1,93	1,25
IL6	24 h	Transfektion	1,84	0,92
NLRP1	24 h	Inkubation	3,50	1,14
NLRP6	24 h	Inkubation	1,03	1,20
NLRP6	24 h	Transfektion	-1,26	1,01
NOD2	24 h	Inkubation	1,47	1,37
TLR6	24 h	Inkubation	-1,35	1,21
TLR7	24 h	Transfektion	-1,35	1,06
TNFRSF11A	24 h	Inkubation	1,87	1,03
TNFRSF12A	24 h	Inkubation	-1,02	1,15
TNFRSF8	24 h	Transfektion	-1,22	1,14
TNFRSF9	24 h	Inkubation	-2,85	1,44
TNFSF10	10 h	Inkubation	1,18	0,95
TNFSF13B	24 h	Transfektion	1,15	0,84
TNFSF14	24 h	Inkubation	-1,75	0,99
TNFSF8	24 h	Inkubation	-1,35	1,21
TNFSF9	10 h	Inkubation	1,08	0,83

Tabelle 25: Biologische Prozesse mit signifikanter Anreicherung von differentiell exprimierten Genen nach Inkubation von Caco-2 Zellen mit *P. mirabilis* LPS für 24 h.
Zur Einordnung der Veränderungen in den Caco-2 Zellen in biologische Prozesse wurde auf Grundlage der differentiell exprimierten Gene nach Inkubation mit *P. mirabilis* LPS für 24 h eine Anreicherungsanalyse (*Over-representation analysis*, ORA) mit GeneTrail 3.2 durchgeführt. Dargestellt sind, mit Bezug zur **Abb. 39 A**, alle weiteren biologischen Prozesse (Termini der Gene Ontology Kategorie: „Biological Process“) in denen die differentiell exprimierten Gene entsprechend ihres Benjamini-Hochberg-adjustierten p-Wertes signifkant angereichert waren sowie die Anzahl der jeweiligen Gene.

GO - Biological Process	Anzahl der Hits	Adj. p-Wert
monocarboxylic acid metabolic process	38	0,0047
chemical synaptic transmission	27	0,0047
long-chain fatty acid metabolic process	14	0,0047
tissue development	44	0,0048
chemotaxis	28	0,0049
xenobiotic metabolic process	15	0,0052
dibenzo-p-dioxin metabolic process	3	0,0052
flavonoid metabolic process	5	0,0068
cellular process	595	0,0070
cell surface receptor signaling pathway	120	0,0070
hormone metabolic process	20	0,0070
regulation of smooth muscle cell migration	10	0,0070
unsaturated fatty acid metabolic process	13	0,0079
transmembrane transport	74	0,0080
cellular metal ion homeostasis	39	0,0087
antibiotic metabolic process	13	0,0088
coumarin metabolic process	4	0,0092
cellular homeostasis	54	0,0093
isoprenoid metabolic process	15	0,0108
icosanoid metabolic process	13	0,0108
G protein-coupled receptor signaling pathway	74	0,0120
regulation of heart contraction	21	0,0123
omega-hydroxylase P450 pathway	4	0,0132
positive regulation of MDA-5 signaling pathway	3	0,0132
response to pyrethroid	3	0,0132
ion transmembrane transport	55	0,0134
regulation of signaling	169	0,0134
regulation of ion transmembrane transport	34	0,0141
cellular response to organic substance	77	0,0145
cell-cell adhesion	35	0,0145
organic acid metabolic process	58	0,0153
anatomical structure morphogenesis	78	0,0158
reactive oxygen species metabolic process	13	0,0162
behavior	38	0,0163
response to external biotic stimulus	65	0,0340
locomotion	61	0,0340
sensory perception of light stimulus	18	0,0340
response to corticosteroid	15	0,0340
response to xenobiotic stimulus	15	0,0340
dentinogenesis	3	0,0340
flavone metabolic process	3	0,0340
monoterpenoid metabolic process	3	0,0340
regulation of glucose metabolic process	12	0,0342
response to hormone	42	0,0351
negative regulation of glycolytic process	4	0,0351
response to herbicide	4	0,0351
positive regulation of potassium ion transport	7	0,0356
negative regulation of smooth muscle cell migration	5	0,0356
response to hyperoxia	5	0,0356
retina layer formation	5	0,0356
fatty acid metabolic process	23	0,0368
axonogenesis	12	0,0368
neurotransmitter secretion	8	0,0368
positive regulation of phosphatidylinositol 3-kinase activity	6	0,0380
regulation of phosphorus metabolic process	90	0,0384
reproductive process	74	0,0384
secretion	60	0,0384
regulation of cell motility	52	0,0384
response to nitrogen compound	51	0,0384
regulation of secretion	47	0,0384
response to molecule of bacterial origin	23	0,0384
positive regulation of cytosolic calcium ion concentration	22	0,0384
regulation of calcium ion transport	20	0,0384
cellular response to glucose stimulus	8	0,0384
cardiac muscle contraction	7	0,0384
toxin metabolic process	5	0,0384
protein kinase C signaling	4	0,0384
epinephrine biosynthetic process	2	0,0384

regulation of ion transmembrane transporter activity	22	0,0163
extracellular matrix organization	26	0,0176
response to glucocorticoid	15	0,0176
extracellular structure organization	26	0,0177
regulation of cytosolic calcium ion concentration	26	0,0177
cardiac conduction	10	0,0177
positive regulation of lipid kinase activity	7	0,0184
cellular cation homeostasis	41	0,0188
axon guidance	21	0,0192
response to organic substance	110	0,0216
regulation of transmembrane transporter activity	22	0,0216
neuron projection guidance	21	0,0216
cellular calcium ion homeostasis	31	0,0218
muscle system process	21	0,0218
cellular response to fructose stimulus	3	0,0218
mesenchyme migration	3	0,0218
locomotory behavior	17	0,0237
cellular ion homeostasis	41	0,0245
axoneme assembly	6	0,0251
homeostatic process	81	0,0263
amine metabolic process	9	0,0263
carboxylic acid metabolic process	51	0,0272
secretion by cell	56	0,0272
negative regulation of nucleotide metabolic process	5	0,0272
response to corticosterone	5	0,0272
animal organ development	69	0,0282
diterpenoid metabolic process	12	0,0282
urea metabolic process	4	0,0289
calcium ion homeostasis	31	0,0295
epithelial cell differentiation	23	0,0295
cell chemotaxis	18	0,0295
protein trimerization	7	0,0307
cellular response to carbohydrate stimulus	9	0,0327
galanin-activated signaling pathway	2	0,0384
insecticide metabolic process	2	0,0384
metanephric loop of Henle development	2	0,0384
negative regulation of primary amine oxidase activity	2	0,0384
peptidyl-lysine N6-acetylation	2	0,0384
phthalate metabolic process	2	0,0384
sarcosine metabolic process	2	0,0384
response to lipopolysaccharide	22	0,0389
retinoid metabolic process	11	0,0394
neurotransmitter metabolic process	10	0,0396
cytokine-mediated signaling pathway	40	0,0406
peptide hormone secretion	8	0,0406
anterior/posterior axon guidance	3	0,0408
drug catabolic process	13	0,0409
exogenous drug catabolic process	5	0,0409
positive regulation of macrophage activation	5	0,0409
response to steroid hormone	18	0,0417
G protein-coupled receptor signaling pathway, coupled to cyclic nucleotide second messenger	19	0,0429
cellular response to xenobiotic stimulus	8	0,0433
regulation of cell differentiation	90	0,0438
regulation of plasminogen activation	4	0,0448
regulation of cell death	85	0,0463
visual perception	17	0,0463
striated muscle contraction	9	0,0463
reactive oxygen species biosynthetic process	5	0,0463
regulation of monocyte chemotaxis	5	0,0463
regulation of receptor binding	5	0,0463
regulation of chemotaxis	17	0,0477
inflammatory response	29	0,0479
regulation of locomotion	54	0,0495
sensory perception	35	0,0498
positive regulation of potassium ion transmembrane transport	6	0,0498

Tabelle 26: Biologische Prozesse mit signifikanter Anreicherung von differentiell exprimierten Genen nach Transfektion von Caco-2 Zellen mit *P. mirabilis* LPS für 24 h.
Zur Einordnung der Veränderungen in den Caco-2 Zellen in biologische Prozesse wurde auf Grundlage der differentiell exprimierten Gene nach Transfektion mit *P. mirabilis* LPS für 24 h eine Anreicherungsanalyse (*Over-representation analysis*, ORA) mit GeneTrail 3.2 durchgeführt. Dargestellt sind, mit Bezug zur **Abb. 39 B**, alle weiteren biologischen Prozesse (Termini der Gene Ontology Kategorie: „Biological Process“) in denen die differentiell exprimierten Gene entsprechend ihres Benjamini-Hochberg-adjustierten p-Wertes signifkant angereichert waren sowie die Anzahl der jeweiligen Gene.

GO - Biological Process	Anzahl der Hits	Adj. p-Wert
anatomical structure morphogenesis	76	0,0046
cell activation	58	0,0046
positive regulation of cell population proliferation	54	0,0046
cell-cell adhesion	35	0,0046
positive regulation of mononuclear cell proliferation	15	0,0046
locomotion	62	0,0049
homophilic cell adhesion via plasma membrane adhesion molecules	17	0,0049
defense response	66	0,0050
neuron migration	14	0,0056
positive regulation of leukocyte proliferation	15	0,0057
regulation of neuroinflammatory response	7	0,0071
response to fructose	4	0,0073
phospholipid translocation	8	0,0085
regulation of immune system process	84	0,0087
regulation of intracellular signal transduction	90	0,0098
negative regulation of cell development	25	0,0098
peptidyl-tyrosine phosphorylation	15	0,0098
positive regulation of lymphocyte proliferation	14	0,0098
negative regulation of cytokine production	22	0,0100
regulation of glutamate secretion	5	0,0102
cell motility	56	0,0105
positive regulation of protein phosphorylation	56	0,0105
regulation of protein phosphorylation	74	0,0110
positive regulation of phosphorylation	58	0,0113
cell-cell adhesion via plasma-membrane adhesion molecules	21	0,0114
regulation of cellular process	422	0,0120
cellular glucuronidation	5	0,0122
regulation of inflammatory response	25	0,0126
positive regulation of inflammatory response	14	0,0126
positive regulation of immune system process	59	0,0263
monocarboxylic acid metabolic process	32	0,0263
regulation of membrane potential	28	0,0263
positive regulation of osteoblast differentiation	8	0,0263
negative regulation of neurogenesis	21	0,0266
regulation of phosphorylation	77	0,0276
leukocyte activation	48	0,0276
positive regulation of secretion	28	0,0276
regulation of osteoblast proliferation	5	0,0276
positive regulation of granulocyte macrophage colony-stimulating factor production	4	0,0276
urate metabolic process	4	0,0276
flavone metabolic process	3	0,0276
positive regulation of skeletal muscle cell differentiation	3	0,0276
response to lipid	43	0,0295
cell surface receptor signaling pathway	105	0,0306
positive regulation of protein modification process	62	0,0315
neuron fate commitment	6	0,0315
regulation of natural killer cell activation	6	0,0315
regulation of cellular component movement	52	0,0319
regulation of nervous system development	49	0,0321
regulation of T cell proliferation	14	0,0328
regulation of immune response	58	0,0329
muscle system process	19	0,0329
regulation of phosphorus metabolic process	84	0,0332
regulation of growth	38	0,0333
positive regulation of neuroinflammatory response	4	0,0333
telencephalon cell migration	6	0,0337
regulation of secretion	44	0,0347
regulation of interleukin-1 production	10	0,0347

neuron recognition	8	0,0128	regulation of T cell activation	22	0,0348
regulation of cell differentiation	88	0,0137	positive regulation of interferon-gamma production	8	0,0348
regulation of natural killer cell proliferation	4	0,0137	negative regulation of eosinophil migration	2	0,0359
positive regulation of amino acid transport	5	0,0145	phospholipid transfer to membrane	2	0,0359
regulation of chemotaxis	18	0,0149	positive regulation of tongue muscle cell differentiation	2	0,0359
cellular response to organic substance	71	0,0153	response to organic substance	99	0,0372
negative regulation of epithelial cell proliferation	13	0,0153	positive regulation of NK T cell activation	3	0,0374
signaling	40	0,0163	regulation of cytokine production	39	0,0381
positive regulation of T cell proliferation	11	0,0179	positive regulation of MAPK cascade	32	0,0381
regulation of membrane lipid distribution	8	0,0182	response to glucocorticoid	13	0,0381
cellular response to fructose stimulus	3	0,0182	regulation of locomotion	51	0,0397
regulation of macrophage colony-stimulating factor production	3	0,0182	regulation of cell motility	48	0,0415
G protein-coupled receptor signaling pathway	67	0,0186	neural crest cell migration	7	0,0446
regulation of adaptive immune response	15	0,0189	cellular response to lipid	26	0,0449
macrophage differentiation	5	0,0208	negative regulation of cellular component movement	21	0,0449
cell migration	50	0,0231	forebrain cell migration	6	0,0449
regulation of cell migration	47	0,0245	peripheral nervous system development	5	0,0449
lymphocyte activation	24	0,0251	regulation of developmental growth	22	0,0470
response to virus	21	0,0251	dendrite self-avoidance	4	0,0473
response to external biotic stimulus	61	0,0263	regulation of epithelial cell proliferation	22	0,0494

Tabelle 27: Biologische Prozesse mit signifikanter Anreicherung von differentiell exprimierten Genen nach Inkubation von Caco-2 Zellen mit *P. mirabilis* OMVs im Vergleich zu *P. mirabilis* LPS für 10 h.
Zur Einordnung der Veränderungen in den Caco-2 Zellen in biologische Prozesse wurde auf Grundlage der differentiell exprimierten Gene nach Inkubation mit *P. mirabilis* OMVs im Vergleich zu *P. mirabilis* LPS für 10 h eine Anreicherungsanalyse (*Over-representation analysis*, ORA) mit GeneTrail 3.2 durchgeführt. Dargestellt sind, mit Bezug zur **Abb. 41 A**, alle weiteren biologischen Prozesse (Termini der Gene Ontology Kategorie: „Biological Process“) in denen die differentiell exprimierten Gene entsprechend ihres Benjamini-Hochberg-adjustierten p-Wertes signifkant angereichert waren sowie die Anzahl der jeweiligen Gene.

GO - Biological Process	Anzahl der Hits	Adj. p-Wert	GO - Biological Process	Anzahl der Hits	Adj. p-Wert
myeloid leukocyte activation	35	0,0045	regulated exocytosis	35	0,0292
neurotransmitter transport	14	0,0046	positive regulation of cytokine production	26	0,0292
granulocyte chemotaxis	11	0,0046	cellular defense response	7	0,0292
cell motility	52	0,0048	positive regulation of granulocyte chemotaxis	5	0,0292
regulation of leukocyte migration	17	0,0050	optic nerve structural organization	2	0,0292
response to lipopolysaccharide	22	0,0053	positive regulation of antigen processing and presentation of peptide antigen via MHC class II	2	0,0292
negative regulation of peptidase activity	20	0,0054	positive regulation of cerebellar granule cell precursor proliferation	2	0,0292

neuron fate specification	6	0,0054
cytokine-mediated signaling pathway	38	0,0054
cell-cell adhesion	31	0,0061
leukocyte chemotaxis	14	0,0061
cellular response to lipopolysaccharide	15	0,0064
macrophage activation	8	0,0066
complement-mediated synapse pruning	3	0,0066
actin-myosin filament sliding	7	0,0066
muscle filament sliding	7	0,0066
defense response to other organism	42	0,0094
humoral immune response	23	0,0094
chemical synaptic transmission	22	0,0094
regulation of chemotaxis	17	0,0094
regulation of ion transport	38	0,0096
regulation of inflammatory response	23	0,0096
regulation of cytokine production	38	0,0103
microglial cell activation	6	0,0106
detection of molecule of bacterial origin	4	0,0106
cellular response to lipid	26	0,0112
response to bacterium	26	0,0114
chemokine production	3	0,0119
cell migration	46	0,0129
immune system process	101	0,0131
negative regulation of hydrolase activity	27	0,0176
response to organic substance	91	0,0180
homophilic cell adhesion via plasma membrane adhesion molecules	14	0,0180
actin-mediated cell contraction	7	0,0225
regulation of interferon-gamma production	10	0,0231
positive regulation of interleukin-10 production	6	0,0231
positive regulation of neutrophil chemotaxis	5	0,0231
potassium ion transmembrane transport	13	0,0283
regulation of regulated secretory pathway	13	0,0283
regulation of interleukin-10 production	7	0,0283
organic anion transport	26	0,0283
regulation of membrane potential	25	0,0296
secretion by cell	46	0,0331
adult behavior	12	0,0331
cell fate determination	6	0,0331
neuron maturation	5	0,0331
negative regulation of cytokine production	18	0,0360
leukocyte activation involved in immune response	32	0,0364
regulation of endopeptidase activity	24	0,0372
cell activation involved in immune response	32	0,0385
potassium ion transport	13	0,0385
negative regulation of myotube differentiation	4	0,0385
forebrain neuron fate commitment	3	0,0385
negative regulation of cytoplasmic translation	3	0,0385
positive regulation of apoptotic cell clearance	3	0,0385
signal transduction	179	0,0386
pattern recognition receptor signaling pathway	11	0,0388
ion transmembrane transport	43	0,0402
anatomical structure development	127	0,0407
regulation of peptidase activity	25	0,0407
muscle contraction	15	0,0407
regulation of neutrophil chemotaxis	5	0,0407
regulation of calcium ion transport	17	0,0408
exocytosis	37	0,0411
anion transport	30	0,0414
regulation of granulocyte chemotaxis	6	0,0414
cell surface receptor signaling pathway	92	0,0416
odontogenesis of dentin-containing tooth	8	0,0421
negative regulation of proteolysis	21	0,0425
regulation of cytolysis	4	0,0425
epithelial tube formation	5	0,0430
neuromuscular synaptic transmission	5	0,0430
innate immune response	29	0,0450
cellular response to organic substance	60	0,0454

Tabelle 28: Differentielle Expression ausgewählter Gene nach Inkubation oder Transfektion von Caco-2 Zellen mit *P. mirabilis* OMVs oder *P. mirabilis* OMV-RNA im Vergleich zu *P. mirabilis* LPS.
Angegeben sind die Log2 Fold Changes (FC) und Cohen's *d*. Ein Log2 FC > 1 entspricht einer erhöhten Expression und ein Log2 FC < -1 entspricht einer verringerten Expression des entsprechenden Gens in den Zellen, die mit den *P. mirabilis* OMVs im Vergleich zu LPS inkubiert oder mit der *P. mirabilis* OMV-RNA im Vergleich zur LPS transfiziert wurden.

Gene	Zeit-punkt	Behandlung	Log2 FC	Cohen's *d*
CCL14	24 h	Inkubation	-2,25	0,97
CCL15	24 h	Transfektion	2,34	3,50
CCL2	24 h	Transfektion	1,62	1,77
CCL20	10 h	Inkubation	1,36	1,08
CCL20	24 h	Inkubation	1,63	1,42
CCL22	10 h	Inkubation	3,53	1,65
CCL22	24 h	Inkubation	2,20	0,83
CCL22	24 h	Transfektion	-3,19	1,12
CCL25	24 h	Inkubation	-1,50	1,59
CCL5	24 h	Inkubation	-1,34	1,22
CCR1	24 h	Transfektion	-1,13	1,27
CCR7	24 h	Transfektion	-1,93	1,17
CLDN10	10 h	Transfektion	2,92	1,19
CLDN18	24 h	Inkubation	1,40	0,92
CLDN6	24 h	Inkubation	1,16	1,47
CSF1	24 h	Inkubation	1,77	1,59
CXCL1	24 h	Inkubation	1,54	2,14
CXCL10	10 h	Inkubation	2,53	2,09
CXCL10	24 h	Inkubation	1,86	1,86
CXCL11	10 h	Inkubation	1,44	0,83
CXCL11	24 h	Inkubation	1,70	1,21
CXCL5	10 h	Inkubation	6,95	1,93
CXCL6	10 h	Inkubation	4,07	1,74
CXCL8	10 h	Inkubation	2,36	1,50
CXCL8	24 h	Transfektion	-2,08	1,01
CXCR3	24 h	Transfektion	1,05	0,86
CXCR4	24 h	Transfektion	1,50	1,10
IFNE	24 h	Transfektion	1,85	1,20
IFNK	10 h	Transfektion	-1,35	0,96
IL13	10 h	Inkubation	-1,74	1,22
IL15	24 h	Inkubation	2,52	1,50
IL17B	24 h	Inkubation	1,60	1,60
IL18R1	10 h	Inkubation	-1,74	1,22
IL18R1	24 h	Inkubation	1,93	1,28
IL18R1	10 h	Transfektion	-1,24	1,20
IL18R1	24 h	Transfektion	2,08	1,68
IL1RL2	24 h	Inkubation	-1,34	1,22
IL20RB	24 h	Inkubation	1,05	2,14
IL23A	10 h	Transfektion	1,27	0,85
IL23A	24 h	Transfektion	1,22	0,86
IL23R	10 h	Inkubation	1,69	1,16
IL23R	24 h	Transfektion	-3,51	1,02
IL27	24 h	Inkubation	-1,37	0,88
IL27	24 h	Transfektion	1,25	1,33
IL34	24 h	Inkubation	-3,02	1,87
IL34	24 h	Transfektion	-1,80	0,91
IL5	24 h	Inkubation	-1,79	1,59
NLRP1	10 h	Inkubation	2,30	0,92
NLRP6	10 h	Inkubation	-1,04	1,81
NLRP6	24 h	Inkubation	-1,54	1,52
NLRP6	24 h	Transfektion	1,07	2,10
NLRP9	10 h	Inkubation	1,85	2,34
NOD2	24 h	Transfektion	-1,13	1,47
TLR1	10 h	Inkubation	1,12	1,22
TLR3	10 h	Inkubation	2,22	0,91
TLR3	24 h	Inkubation	2,39	2,02
TLR7	10 h	Inkubation	2,58	1,30
TLR7	24 h	Inkubation	1,18	1,18
TLR7	24 h	Transfektion	1,13	1,02
TNFRSF11A	24 h	Transfektion	1,62	1,09
TNFRSF14	24 h	Inkubation	-1,35	1,33
TNFRSF4	24 h	Transfektion	-2,31	1,92
TNFRSF8	24 h	Inkubation	-1,80	1,14
TNFRSF9	24 h	Inkubation	2,09	1,21
TNFSF13	24 h	Inkubation	1,25	1,56
TNFSF4	10 h	Inkubation	-1,45	1,32

Tabelle 29: Biologische Prozesse mit signifikanter Anreicherung von differentiell exprimierten Genen nach Inkubation von Caco-2 Zellen mit *P. mirabilis* OMVs im Vergleich zu *P. mirabilis* LPS für 24 h.
Zur Einordnung der Veränderungen in den Caco-2 Zellen in biologische Prozesse wurde auf Grundlage der differentiell exprimierten Gene nach Inkubation mit *P. mirabilis* OMVs im Vergleich zu *P. mirabilis* LPS für 24 h eine Anreicherungsanalyse (*Over-representation analysis*, ORA) mit GeneTrail 3.2 durchgeführt. Dargestellt sind, mit Bezug zur **Abb. 42 A**, alle weiteren biologischen Prozesse (Termini der Gene Ontology Kategorie: „Biological Process“) in denen die differentiell exprimierten Gene entsprechend ihres Benjamini-Hochberg-adjustierten p-Wertes signifkant angereichert waren sowie die Anzahl der jeweiligen Gene.

GO - Biological Process	Anzahl der Hits	Adj. p-Wert
sodium ion transmembrane transport	15	0,0003
extracellular matrix organization	32	0,0003
cation homeostasis	53	0,0003
regulation of muscle contraction	20	0,0003
cellular response to metal ion	22	0,0004
response to lipid	56	0,0004
sodium ion export across plasma membrane	6	0,0004
response to stimulus	282	0,0005
regulation of leukocyte proliferation	24	0,0005
cardiac muscle cell action potential	9	0,0006
action potential	13	0,0009
positive regulation of cytokine production	37	0,0010
transmembrane transport	80	0,0010
drug metabolic process	39	0,0011
membrane depolarization during action potential	8	0,0011
regulation of ventricular cardiac muscle cell membrane repolarization	7	0,0011
regulation of neurotransmitter levels	29	0,0012
cation transport	57	0,0014
regulation of heart rate	14	0,0014
regulation of inflammatory response	30	0,0014
neurotransmitter transport	17	0,0015
regulation of sodium ion transport	13	0,0017
cellular metal ion homeostasis	42	0,0017
cellular homeostasis	58	0,0018
response to extracellular stimulus	38	0,0018
sodium ion transport	18	0,0018
cardiac muscle cell action potential involved in contraction	8	0,0018
cellular sodium ion homeostasis	6	0,0018
developmental process	246	0,0018
cellular chemical homeostasis	51	0,0018
cellular response to inorganic substance	22	0,0018
cellular response to electrical stimulus	4	0,0165
response to inorganic substance	35	0,0166
cellular response to hormone stimulus	26	0,0166
response to tumor necrosis factor	15	0,0166
arachidonic acid metabolic process	8	0,0166
regulation of sodium ion transmembrane transporter activity	8	0,0166
xenobiotic metabolic process	13	0,0167
positive regulation of cell population proliferation	54	0,0169
lipid metabolic process	67	0,0169
diterpenoid metabolic process	12	0,0178
protein trimerization	7	0,0183
positive regulation of cytokine biosynthetic process	9	0,0183
leukotriene metabolic process	6	0,0185
positive regulation of T cell migration	6	0,0185
regulation of catalytic activity	117	0,0187
formate metabolic process	3	0,0189
negative regulation of catalytic activity	48	0,0191
organic anion transport	31	0,0194
cellular response to tumor necrosis factor	13	0,0197
cytokine production	11	0,0197
response to cAMP	11	0,0197
cell chemotaxis	18	0,0199
cellular response to calcium ion	10	0,0200
potassium ion import across plasma membrane	7	0,0200
response to electrical stimulus	7	0,0200
regulation of T cell activation	24	0,0201
cellular potassium ion homeostasis	4	0,0202
flavonoid metabolic process	4	0,0202
triglyceride-rich lipoprotein particle remodeling	4	0,0202
negative regulation of hydrolase activity	31	0,0205
positive regulation of smooth muscle contraction	6	0,0205

export across plasma membrane	9	0,0018
calcium ion homeostasis	36	0,0019
unsaturated fatty acid metabolic process	14	0,0019
regulation of T cell proliferation	18	0,0022
cellular process	618	0,0024
cell surface receptor signaling pathway	125	0,0025
leukocyte activation involved in immune response	44	0,0025
cell activation involved in immune response	44	0,0028
response to vitamin D	7	0,0029
pressure natriuresis	3	0,0031
regulation of cell population proliferation	92	0,0031
cellular response to retinoic acid	11	0,0031
positive regulation of ion transport	25	0,0031
regulation of cell adhesion	47	0,0031
nervous system process	61	0,0032
positive regulation of striated muscle cell differentiation	10	0,0032
neutrophil chemotaxis	12	0,0032
cellular response to organonitrogen compound	34	0,0032
regulation of synaptic transmission, glutamatergic	11	0,0032
flavonoid glucuronidation	4	0,0033
regulation of blood pressure	17	0,0035
response to purine-containing compound	17	0,0035
epoxygenase P450 pathway	6	0,0035
regulation of heart rate by cardiac conduction	8	0,0036
defense response	72	0,0037
secretion	67	0,0037
carboxylic acid metabolic process	56	0,0037
cellular ion homeostasis	45	0,0037
response to nutrient levels	35	0,0037
cellular calcium ion homeostasis	34	0,0037
regulation of cell activation	44	0,0041
cardiac conduction	11	0,0041
cellular cation homeostasis	44	0,0044
cellular lipid metabolic process	59	0,0044
drug transport	16	0,0045
regulation of immune system process	93	0,0046
membrane depolarization	9	0,0048
response to interleukin-1	12	0,0207
regulation of leukocyte migration	17	0,0210
response to vitamin	10	0,0210
regulation of myotube differentiation	8	0,0210
membrane repolarization	5	0,0210
positive regulation of potassium ion transport	7	0,0217
regulation of T cell migration	7	0,0217
regulation of membrane depolarization	7	0,0217
regulated exocytosis	42	0,0217
phenol-containing compound metabolic process	10	0,0225
sensory perception of light stimulus	18	0,0227
negative regulation of leukocyte activation	16	0,0227
immune response	69	0,0228
renal water homeostasis	6	0,0230
bilirubin conjugation	2	0,0237
negative regulation of primary amine oxidase activity	2	0,0237
positive regulation of relaxation of cardiac muscle	2	0,0237
positive regulation of type B pancreatic cell proliferation	2	0,0237
regulation of cell motility	53	0,0245
cell adhesion mediated by integrin	5	0,0245
positive regulation of glycolytic process	5	0,0245
regulation of vasoconstriction	8	0,0247
cellular response to purine-containing compound	4	0,0247
mast cell degranulation	4	0,0247
regulation of cell-cell adhesion	28	0,0255
acylglycerol homeostasis	6	0,0257
positive regulation of fatty acid metabolic process	6	0,0257
triglyceride homeostasis	6	0,0257
regulation of locomotion	56	0,0264
detection of light stimulus	8	0,0264
N-acylphosphatidylethanolamine metabolic process	3	0,0264
fatty acid elongation, monounsaturated fatty acid	3	0,0264
fatty acid elongation, polyunsaturated fatty acid	3	0,0264
fatty acid elongation, saturated fatty acid	3	0,0264
negative regulation of chemokine-mediated signaling pathway	3	0,0264
positive regulation of uterine smooth muscle contraction	3	0,0264
regulation of atrial cardiac muscle cell membrane depolarization	3	0,0264

establishment or maintenance of transmembrane electrochemical gradient	5	0,0048
response to drug	51	0,0049
regulation of calcium ion transport	23	0,0049
granulocyte chemotaxis	12	0,0049
regulation of striated muscle contraction	12	0,0049
regulation of sodium ion transmembrane transport	10	0,0049
histidine catabolic process	4	0,0050
retinoic acid metabolic process	7	0,0052
cytokine-mediated signaling pathway	45	0,0053
positive regulation of cell adhesion	31	0,0053
positive regulation of mononuclear cell proliferation	15	0,0055
regulation of blood vessel diameter	15	0,0055
peptidyl-tyrosine phosphorylation	16	0,0055
ion transmembrane transport	57	0,0056
cation transmembrane transport	43	0,0056
sensory perception	40	0,0056
neutrophil migration	12	0,0056
regulation of tube size	15	0,0056
regulation of neuroinflammatory response	7	0,0058
anatomical structure development	167	0,0060
secretion by cell	60	0,0060
multicellular organismal water homeostasis	10	0,0063
catecholamine metabolic process	8	0,0064
response to mechanical stimulus	19	0,0065
cellular response to mechanical stimulus	11	0,0065
regulation of ion transmembrane transport	35	0,0065
response to organophosphorus	15	0,0066
regulation of membrane repolarization	7	0,0066
histidine catabolic process to glutamate and formamide	3	0,0067
histidine catabolic process to glutamate and formate	3	0,0067
leukotriene B4 catabolic process	3	0,0067
long-chain fatty acid metabolic process	13	0,0069
xenobiotic glucuronidation	4	0,0069
regulation of membrane potential	32	0,0071
leukocyte degranulation	36	0,0071
fatty acid metabolic process	23	0,0267
inorganic cation transmembrane transport	36	0,0273
potassium ion transport	15	0,0273
neutrophil degranulation	32	0,0278
neurotransmitter metabolic process	10	0,0286
lymphocyte chemotaxis	7	0,0286
cellular response to steroid hormone stimulus	9	0,0295
isoprenoid metabolic process	13	0,0300
response to toxic substance	27	0,0308
cell-cell adhesion via plasma-membrane adhesion molecules	20	0,0308
locomotion	61	0,0308
neutrophil activation involved in immune response	32	0,0308
lipid homeostasis	13	0,0315
inorganic cation import across plasma membrane	9	0,0316
regulation of protein phosphorylation	76	0,0321
regulation of triglyceride metabolic process	6	0,0321
regulation of synapse assembly	11	0,0321
negative regulation of ATP metabolic process	5	0,0321
regulation of monocyte chemotaxis	5	0,0321
negative regulation of inflammatory response	13	0,0328
response to steroid hormone	18	0,0337
regulation of smooth muscle contraction	8	0,0337
second-messenger-mediated signaling	24	0,0343
actin-mediated cell contraction	7	0,0343
positive regulation of epithelial cell proliferation	16	0,0353
regulation of phosphorus metabolic process	91	0,0354
regulation of cytosolic calcium ion concentration	24	0,0354
unsaturated fatty acid biosynthetic process	6	0,0355
fatty acid biosynthetic process	11	0,0360
regulation of release of sequestered calcium ion into cytosol	9	0,0360
integrin-mediated signaling pathway	10	0,0360
regulation of lymphocyte migration	8	0,0360
lipoxygenase pathway	4	0,0360
positive regulation of icosanoid secretion	4	0,0360
reverse cholesterol transport	4	0,0360

positive regulation of leukocyte proliferation	15	0,0072
cellular response to interleukin-1	11	0,0073
negative regulation of chemotaxis	9	0,0073
positive regulation of T cell proliferation	12	0,0078
negative regulation of oxidoreductase activity	6	0,0084
positive regulation of muscle contraction	8	0,0091
response to metal ion	28	0,0095
cellular glucuronidation	5	0,0096
organic acid metabolic process	59	0,0099
small molecule metabolic process	92	0,0101
cell differentiation	100	0,0102
histidine metabolic process	4	0,0102
cellular response to drug	25	0,0104
neutrophil activation	35	0,0106
leukocyte chemotaxis	15	0,0106
granulocyte migration	12	0,0106
water homeostasis	10	0,0106
cellular response to cytokine stimulus	32	0,0106
regulation of cytokine production	45	0,0108
metal ion transport	42	0,0110
regulation of signaling	172	0,0111
positive regulation of muscle cell differentiation	11	0,0111
regulation of fatty acid metabolic process	11	0,0111
negative regulation of transport	34	0,0111
regulation of striated muscle cell differentiation	12	0,0111
positive regulation of potassium ion transmembrane transport	7	0,0112
regulation of cardiac muscle contraction	10	0,0112
cell-cell adhesion	35	0,0113
modulation of chemical synaptic transmission	32	0,0113
catecholamine biosynthetic process	5	0,0113
ventricular cardiac muscle cell action potential	5	0,0113
chemotaxis	26	0,0113
positive regulation of lymphocyte proliferation	14	0,0113
response to xenobiotic stimulus	16	0,0114
response to nutrient	19	0,0115
cellular response to xenobiotic stimulus	9	0,0116
regulation of cell migration	52	0,0121
actin-myosin filament sliding	7	0,0121
muscle filament sliding	7	0,0121
mesenchyme migration	3	0,0121
response to fructose	3	0,0361
T cell selection	5	0,0362
visual perception	17	0,0364
response to nitrogen compound	51	0,0371
response to organonitrogen compound	48	0,0371
potassium ion transmembrane transport	14	0,0377
regulation of phosphorylation	82	0,0378
regulation of chemotaxis	17	0,0378
positive regulation of lymphocyte migration	6	0,0388
positive regulation of immune system process	62	0,0389
glucose homeostasis	15	0,0393
exocytosis	44	0,0403
striated muscle cell development	9	0,0404
neutral lipid metabolic process	10	0,0404
regulation of signal transduction	147	0,0404
regulation of cellular process	460	0,0407
carbohydrate homeostasis	15	0,0407
brown fat cell differentiation	5	0,0407
myotube cell development	5	0,0407
negative regulation of lipid transport	5	0,0407
regulation of the force of heart contraction	5	0,0407
antimicrobial humoral response	11	0,0407
cellular response to hypoxia	11	0,0407
response to retinoic acid	11	0,0407
response to hormone	41	0,0408
detection of visible light	6	0,0416
acrosome reaction	4	0,0416
high-density lipoprotein particle remodeling	4	0,0416
negative regulation of leukocyte chemotaxis	4	0,0416
positive regulation of synapse assembly	8	0,0434
cellular response to interferon-gamma	10	0,0446
acid secretion	9	0,0449
negative regulation of leukocyte proliferation	9	0,0449
response to glucocorticoid	13	0,0456
cellular response to copper ion	5	0,0456
plasma lipoprotein particle remodeling	5	0,0456
regulation of release of sequestered calcium ion into cytosol by sarcoplasmic reticulum	5	0,0456
lipid catabolic process	21	0,0458
regulation of calcium ion transport into cytosol	10	0,0458
response to alkaloid	10	0,0458

negative regulation of triglyceride catabolic process	3	0,0121
positive regulation of fibroblast growth factor production	3	0,0121
toll-like receptor 7 signaling pathway	3	0,0121
response to external biotic stimulus	68	0,0123
retinoid metabolic process	12	0,0127
macrophage activation	8	0,0127
cellular response to caffeine	4	0,0127
rhodopsin mediated signaling pathway	4	0,0127
regulation of vasculature development	25	0,0128
mast cell activation	5	0,0131
negative regulation of ion transport	15	0,0132
response to cytokine	38	0,0132
anion transport	38	0,0136
positive regulation of leukocyte cell-cell adhesion	19	0,0136
response to interferon-gamma	13	0,0136
negative regulation of cell activation	18	0,0141
positive regulation of transport	58	0,0143
dopamine metabolic process	6	0,0144
G protein-coupled receptor signaling pathway	73	0,0148
regulation of cellular component movement	58	0,0149
monovalent inorganic cation transport	29	0,0149
regulation of angiogenesis	23	0,0149
multicellular organismal homeostasis	14	0,0149
icosanoid metabolic process	12	0,0150
cellular response to cAMP	8	0,0151
regulation of dopamine metabolic process	5	0,0156
glutamate secretion	6	0,0165
microglial cell activation	6	0,0165
regulation of macrophage activation	7	0,0458
negative regulation of blood vessel diameter	6	0,0458
chylomicron remodeling	3	0,0458
monocyte activation	3	0,0458
negative regulation of triglyceride metabolic process	3	0,0458
omega-hydroxylase P450 pathway	3	0,0458
very-low-density lipoprotein particle remodeling	3	0,0458
regulation of glucose metabolic process	11	0,0462
cholesterol homeostasis	9	0,0464
regulation of secretion	46	0,0469
response to other organism	54	0,0478
positive regulation of cell-cell adhesion	19	0,0478
lymphocyte migration	8	0,0478
detection of light stimulus involved in visual perception	4	0,0478
positive regulation of fatty acid transport	4	0,0478
alpha-beta T cell proliferation	2	0,0478
biphenyl metabolic process	2	0,0478
membrane depolarization during Purkinje myocyte cell action potential	2	0,0478
negative regulation of synaptic transmission, dopaminergic	2	0,0478
regulation of inhibitory synapse assembly	2	0,0478
sterol homeostasis	9	0,0485
cell motility	55	0,0490
axoneme assembly	5	0,0490
cellular modified amino acid catabolic process	5	0,0490
potassium ion homeostasis	5	0,0490
positive regulation of angiogenesis	14	0,0490
chemical synaptic transmission	22	0,0495

Tabelle 30: Biologische Prozesse mit signifikanter Anreicherung von differentiell exprimierten Genen nach Transfektion von Caco-2 Zellen mit *P. mirabilis* OMV-RNA im Vergleich zu *P. mirabilis* LPS für 24 h.
Zur Einordnung der Veränderungen in den Caco-2 Zellen in biologische Prozesse wurde auf Grundlage der differentiell exprimierten Gene nach Transfektion mit *P. mirabilis* OMV-RNA im Vergleich zu *P. mirabilis* LPS für 24 h eine Anreicherungsanalyse (*Over-representation analysis*, ORA) mit GeneTrail 3.2 durchgeführt. Dargestellt sind, mit Bezug zur **Abb. 42 B**, alle weiteren biologischen Prozesse (Termini der Gene Ontology Kategorie: „Biological Process“) in denen die differentiell exprimierten Gene entsprechend ihres Benjamini-Hochberg-adjustierten p-Wertes signifkant angereichert waren sowie die Anzahl der jeweiligen Gene.

GO - Biological Process	Anzahl der Hits	Adj. p-Wert
metal ion homeostasis	35	0,0117
calcium ion homeostasis	28	0,0117
regulation of chemotaxis	17	0,0117
positive regulation of chemotaxis	13	0,0117
feeding behavior	10	0,0117
positive regulation of cytokine biosynthetic process	9	0,0117
regulation of neutrophil chemotaxis	6	0,0117
positive regulation of inflammatory response	13	0,0121
response to vitamin A	5	0,0121
positive regulation of myeloid leukocyte differentiation	8	0,0134
ion homeostasis	41	0,0136
positive regulation of leukocyte chemotaxis	10	0,0136
regulation of granulocyte chemotaxis	7	0,0139
positive regulation of signal transduction	73	0,0147
riboflavin transport	3	0,0147
regulation of ion transport	37	0,0151
G protein-coupled receptor signaling pathway	60	0,0157
cellular response to lipopolysaccharide	14	0,0160
regulation of secretion	41	0,0183
regulation of hormone levels	30	0,0187
positive regulation of secretion	26	0,0187
regulation of cytosolic calcium ion concentration	22	0,0187
regulation of inflammatory response	22	0,0187
axon guidance	18	0,0187
regulation of nervous system development	45	0,0188
neuron projection guidance	18	0,0195
positive regulation of leukocyte migration	12	0,0195
positive regulation of interferon-gamma production	8	0,0195

GO - Biological Process	Anzahl der Hits	Adj. p-Wert
bilirubin conjugation	2	0,0313
cell surface receptor signaling pathway	92	0,0315
positive regulation of cytosolic calcium ion concentration	19	0,0315
regulation of lymphocyte activation	28	0,0319
regulation of T cell activation	20	0,0319
hormone metabolic process	15	0,0319
acute-phase response	6	0,0328
detection of temperature stimulus involved in sensory perception of pain	4	0,0328
positive regulation of icosanoid secretion	4	0,0328
monocarboxylic acid metabolic process	28	0,0339
locomotory behavior	14	0,0339
positive regulation of protein kinase B signaling	13	0,0346
cell chemotaxis	15	0,0360
peptidyl-tyrosine phosphorylation	12	0,0360
regulation of lymphocyte differentiation	13	0,0388
cellular glucuronidation	4	0,0388
cation homeostasis	35	0,0392
regulation of hemopoiesis	25	0,0392
regulation of cell population proliferation	67	0,0407
positive regulation of CD4-positive, alpha-beta T cell differentiation	5	0,0407
positive regulation of cytokine production	25	0,0416
learning or memory	17	0,0416
regulation of signal transduction	117	0,0417
regulation of intracellular signal transduction	74	0,0432
positive regulation of DNA-binding transcription factor activity	17	0,0432
positive regulation of mononuclear cell proliferation	11	0,0432
positive regulation of amino acid transport	4	0,0439
positive regulation of fatty acid transport	4	0,0439

motor neuron axon guidance	6	0,0195
immune system process	98	0,0214
positive regulation of transport	47	0,0214
response to other organism	47	0,0214
response to lipid	39	0,0214
cellular calcium ion homeostasis	26	0,0214
cellular response to molecule of bacterial origin	14	0,0214
chemokine-mediated signaling pathway	9	0,0214
regulation of myeloid leukocyte differentiation	11	0,0232
isoprenoid metabolic process	12	0,0232
positive regulation of interleukin-2 biosynthetic process	4	0,0232
positive regulation of cell population proliferation	44	0,0234
regulation of developmental growth	21	0,0234
negative regulation of immune system process	26	0,0242
regulation of neuron projection development	28	0,0250
positive regulation of leukocyte proliferation	12	0,0251
regulation of neuron differentiation	34	0,0262
positive regulation of immune system process	52	0,0275
regulation of neurogenesis	40	0,0276
neuron migration	11	0,0294
cellular metal ion homeostasis	30	0,0306
lymphocyte differentiation	15	0,0306
regulation of cellular component movement	45	0,0444
cell adhesion	42	0,0444
retinol metabolic process	6	0,0444
locomotion	49	0,0448
leukocyte differentiation	18	0,0448
cytokine-mediated signaling pathway	33	0,0453
regulation of growth	33	0,0455
regulation of anion transport	9	0,0455
adult locomotory behavior	8	0,0455
negative regulation of collateral sprouting	3	0,0461
negative regulation of feeding behavior	3	0,0461
positive regulation of cell fate commitment	3	0,0461
positive regulation of toll-like receptor 4 signaling pathway	3	0,0461
G protein-coupled receptor signaling pathway, coupled to cyclic nucleotide second messenger	16	0,0481
positive regulation of T-helper 1 type immune response	4	0,0481
thymic T cell selection	4	0,0481
regulation of cytokine production	34	0,0487
cellular response to lipid	23	0,0488
negative regulation of cell activation	14	0,0491
regulation of CD4-positive, alpha-beta T cell differentiation	6	0,0491
positive regulation of peptide secretion	18	0,0498
negative regulation of leukocyte activation	13	0,0498

Tabelle 31: miRNAs mit erhöhter Expression in EVs aus konditioniertem Medium.
Angegeben sind die Log2 Fold Changes und die Benjamini-Hochberg korrigierten p-Werte. Ein Log2 Fold Change > 1 entspricht einer erhöhten Expression der entsprechenden miRNA in EVs aus dem konditionierten Medium verglichen mit EVs aus dem unkonditionierten Medium.

miRNA	Log2 Fold Change	Adj. p-Wert (t-Test)
hsa-miR-371a-3p	8,132	1,54E-08
hsa-miR-302b-3p	8,104	1,02E-08
hsa-miR-429	7,915	8,10E-06
hsa-miR-590-3p	7,865	5,59E-10
hsa-miR-373-3p	7,672	8,73E-07
hsa-miR-183-5p	7,151	7,00E-07
hsa-miR-483-5p	7,099	5,60E-09
hsa-miR-200c-3p	6,940	5,59E-10
hsa-miR-372-3p	6,798	3,05E-07
hsa-miR-200b-3p	6,696	3,62E-05
hsa-miR-4516	6,554	1,15E-05
hsa-miR-141-3p	6,546	1,02E-08
hsa-miR-215-5p	6,317	1,89E-07
hsa-miR-182-5p	5,842	9,79E-07
hsa-miR-375-3p	5,705	0,0001
hsa-miR-196a-5p	5,335	2,78E-06
hsa-miR-200a-3p	5,327	2,01E-05
hsa-miR-7704	5,325	0,0002
hsa-miR-192-5p	4,965	9,79E-07
hsa-miR-338-5p	4,674	0,0013
hsa-miR-192-3p	4,509	8,88E-05
hsa-miR-190a-5p	4,408	9,79E-04
hsa-miR-194-5p	4,408	1,89E-07
hsa-miR-378c	4,349	3,49E-06
hsa-miR-378d	4,274	2,43E-05
hsa-miR-320d	4,234	1,32E-05
hsa-miR-532-3p	4,214	0,0004
hsa-miR-31-5p	4,182	0,0003
hsa-miR-203a-3p	4,158	0,0008
hsa-miR-21-3p	4,155	0,0032
hsa-miR-483-3p	4,106	0,0008
hsa-miR-12136	4,069	0,0004
hsa-miR-320c	4,044	2,01E-05
hsa-miR-378a-3p	4,034	1,55E-06
hsa-miR-28-3p	4,009	0,0008
hsa-miR-378g	3,817	2,01E-05
hsa-miR-34a-5p	3,808	1,46E-05

miRNA	Log2 Fold Change	Adj. p-Wert (t-Test)
hsa-miR-338-3p	2,997	5,25E-06
hsa-miR-1246	2,898	0,0002
hsa-miR-146a-5p	2,843	1,62E-05
hsa-miR-532-5p	2,829	2,52E-05
hsa-miR-125a-5p	2,817	0,0218
hsa-miR-133a-3p	2,704	0,0002
hsa-miR-378i	2,671	0,0002
hsa-miR-500a-5p	2,655	5,50E-05
hsa-miR-455-5p	2,578	0,0255
hsa-miR-9-5p	2,508	0,0007
hsa-miR-500b-5p	2,503	0,0005
hsa-miR-92a-1-5p	2,500	0,0045
hsa-miR-1290	2,432	0,0003
hsa-miR-455-3p	2,417	0,0108
hsa-miR-324-3p	2,408	0,0081
hsa-miR-335-3p	2,395	0,0349
hsa-miR-4301	2,381	0,0001
hsa-miR-92b-3p	2,371	0,0045
hsa-miR-7977	2,281	0,0171
hsa-miR-4286	2,265	0,0279
hsa-miR-503-5p	2,227	0,0135
hsa-miR-365a-3p	2,017	7,00E-05
hsa-miR-365b-3p	2,017	7,00E-05
hsa-miR-7-5p	1,945	0,0040
hsa-miR-99b-5p	1,940	0,0004
hsa-miR-1247-5p	1,927	0,0322
hsa-miR-19b-1-5p	1,891	0,0285
hsa-miR-22-5p	1,841	0,0063
hsa-miR-18a-3p	1,840	0,0446
hsa-miR-574-5p	1,822	0,0022
hsa-miR-30d-3p	1,767	0,0048
hsa-miR-33b-5p	1,757	0,0015
hsa-miR-29a-5p	1,725	0,0045
hsa-miR-146b-5p	1,665	0,0018
hsa-miR-1307-5p	1,628	0,0007
hsa-miR-30b-5p	1,611	0,0019
hsa-miR-222-3p	1,552	0,0014

hsa-miR-193b-3p	3,775	7,00E-07
hsa-miR-877-5p	3,751	0,0022
hsa-miR-133b	3,701	0,0029
hsa-miR-138-5p	3,699	0,0008
hsa-miR-193a-5p	3,638	0,0019
hsa-miR-188-5p	3,624	6,87E-05
hsa-miR-320b	3,542	8,20E-06
hsa-miR-149-5p	3,402	2,82E-05
hsa-miR-9-3p	3,372	0,0063
hsa-miR-422a	3,215	2,82E-05
hsa-miR-320a-3p	3,204	2,65E-06
hsa-miR-660-5p	3,143	1,03E-05
hsa-miR-193a-3p	3,137	6,75E-06
hsa-miR-362-5p	3,065	0,0083
hsa-miR-671-5p	3,046	0,0062
hsa-miR-1307-3p	1,513	0,0015
hsa-miR-21-5p	1,480	0,0001
hsa-miR-210-3p	1,376	0,0030
hsa-miR-224-5p	1,363	0,0001
hsa-miR-335-5p	1,348	0,0026
hsa-miR-28-5p	1,314	0,0012
hsa-miR-196b-5p	1,299	0,0099
hsa-miR-301b-3p	1,261	0,0055
hsa-miR-221-3p	1,198	0,0049
hsa-miR-10a-5p	1,190	0,0053
hsa-miR-378f	1,175	0,0336
hsa-miR-181d-5p	1,152	0,0192
hsa-miR-22-3p	1,136	0,0013
hsa-miR-30d-5p	1,128	0,0012
hsa-miR-130b-3p	1,010	0,0030

Tabelle 32: miRNAs mit verringerter Expression in EVs aus konditioniertem Medium.
Angegeben sind die Log2 Fold Changes und die Benjamini-Hochberg korrigierten p-Werte. Ein Log2 Fold Change < -1 entspricht einer verringerten Expression der entsprechenden miRNA in EVs aus dem konditionierten Medium verglichen mit EVs aus dem unkonditionierten Medium.

miRNA	Log2 Fold Change	Adj. p-Wert (t-Test)
hsa-miR-126-3p	-1,002	0,0045
hsa-let-7d-5p	-1,004	0,0008
hsa-miR-155-5p	-1,025	0,0027
hsa-miR-411-5p	-1,041	0,0051
hsa-miR-379-5p	-1,052	0,0051
hsa-miR-98-5p	-1,052	0,0015
hsa-miR-139-5p	-1,057	0,0058
hsa-miR-142-5p	-1,081	0,0057
hsa-miR-369-5p	-1,085	0,0104
hsa-miR-199a-3p	-1,137	0,0003
hsa-miR-199b-3p	-1,137	0,0003
hsa-miR-363-3p	-1,148	0,0214
hsa-let-7c-5p	-1,186	0,0046
hsa-miR-493-3p	-1,217	0,0200
hsa-miR-142-3p	-1,231	0,0048
hsa-miR-99a-5p	-1,242	0,0058
hsa-miR-199a-5p	-1,246	0,0032
hsa-miR-145-5p	-1,271	0,0004
hsa-miR-1185-1-3p	-1,341	0,0009
hsa-miR-223-3p	-1,359	0,0018
hsa-miR-130a-3p	-1,437	0,0045
hsa-miR-150-5p	-1,669	0,0030
hsa-miR-125b-5p	-1,684	0,0406
hsa-miR-143-3p	-1,893	8,20E-06
hsa-miR-214-3p	-2,046	0,0013
hsa-miR-383-5p	-2,363	0,0182
hsa-miR-139-3p	-2,384	0,0166
hsa-miR-195-5p	-2,477	0,0057
hsa-miR-100-5p	-2,530	0,0145
hsa-miR-95-3p	-2,608	0,0256
hsa-miR-760	-2,924	0,0153
hsa-miR-497-5p	-3,218	0,0151

Publikationen

Im Rahmen der Promotion am Institut für Humangenetik der Universität des Saarlandes am Campus in Homburg (Saar) sind folgende Veröffentlichungen entstanden:

Veröffentlichte Publikationen (Co-Erstautor*):

Effects of Resistant Starch on Symptoms, Fecal Markers, and Gut Microbiota in Parkinson's Disease — The RESISTA-PD Trial

Genomics, Proteomics and Bioinformatics, November 2021

Anouck Becker*, Georges Pierre Schmartz*, **Laura Gröger***, Nadja Grammes, Valentina Galata, Hannah Philippeit, Jacqueline Weiland, Nicole Ludwig, Eckart Meese, Sascha Tierling, Jörn Walter, Andreas Schwiertz, Jörg Spiegel, Gudrun Wagenpfeil, Klaus Faßbender, Andreas Keller, Marcus M Unger

PMID: 34839011 PMCID: PMC9684155 DOI: 10.1016/j.gpb.2021.08.009

Systematic Cross-biospecimen Evaluation of DNA Extraction Kits for Long- and Short-read Multi-metagenomic Sequencing Studies

Genomics, Proteomics and Bioinformatics, Juni 2022

Jacqueline Rehner*, Georges Pierre Schmartz*, **Laura Groeger***, Jan Dastbaz, Nicole Ludwig, Matthias Hannig, Stefan Rupf, Berthold Seitz, Elias Flockerzi, Tim Berger, Matthias Christian Reichert, Marcin Krawczyk, Eckart Meese, Christian Herr, Robert Bals, Sören L Becker, Andreas Keller, Rolf Müller, IMAGINE Consortium

PMID: 35680095 PMCID: PMC9684153 DOI: 10.1016/j.gpb.2022.05.006

Veröffentlichte Publikationen (Co-Autor):

CoolMPS: evaluation of antibody labeling based massively parallel non-coding RNA sequencing

Nucleic Acid Research, Januar 2021

Yongping Li, Tobias Fehlmann, Adam Borcherding, Snezana Drmanac, Sophie Liu, **Laura Groeger**, Chongjun Xu, Matthew Callow, Christian Villarosa, Alexander Jorjorian, Fabian Kern, Nadja Grammes, Eckart Meese, Hui Jiang, Radoje Drmanac, Nicole Ludwig, Andreas Keller

PMID: 33290507 PMCID: PMC7826284 DOI: 10.1093/nar/gkaa1122

miRNATissueAtlas2: an update to the human miRNA tissue atlas

Nucleic Acid Research, Januar 2022

Andreas Keller, **Laura Gröger**, Thomas Tschernig, Jeffrey Solomon, Omar Laham, Nicholas Schaum, Viktoria Wagner, Fabian Kern, Georges Pierre Schmartz, Yongping Li, Adam Borcherding, Carola Meier, Tony Wyss-Coray, Eckart Meese, Tobias Fehlmann, Nicole Ludwig

PMID: 34570238 PMCID: PMC8728130 DOI: 10.1093/nar/gkab808

Expression of SPAG7 and its regulatory microRNAs in seminal plasma and seminal plasma-derived extracellular vesicles of patients with subfertility

Scientific Reports, März 2023

Masood Abu-Halima, Lea Simone Becker, Mohammad A Al Smadi, Lea Sophie Kunz, **Laura Groeger**, Eckart Meese

PMID: 36871032 PMCID: PMC9985644 DOI: 10.1038/s41598-023-30744-3

Ageing-associated small RNA cargo of extracellular vesicles

RNA Biology, Juli 2023

Fabian Kern, Thomas Kuhn, Nicole Ludwig, Martin Simon, **Laura Gröger**, Natalie Fabis, Abdulrahman Salhab, Tobias Fehlmann, Oliver Hahn, Annika Engel, Marcus Koch, Jana Koehler, Katarzyna Winek, Hermona Soreq, Gregor Fuhrmann, Tony Wyss-Coray, Eckart Meese, Matthias W. Laschke, Andreas Keller

PMID: 37498213 PMCID: PMC10376918 DOI: 10.1080/15476286.2023.2234713

Für die Publikationen vorbereitete Manuskripte:

Extracellular Vesicles and their RNA cargo facilitate bidirectional cross-kingdom communication between human and bacterial cells

Laura Gröger, Shusruto Rishik, Nicole Ludwig, Amila Beganovic, Marcus Koch, Stefanie Rheinheimer, Martin Hart, Petra König, Tabea Trampert, Pascal Paul, Annette Boese, Claus-Michael Lehr, Sören L Becker, Gregor Fuhrmann, Andreas Keller, Eckart Meese

Weitere Präsentation von Ergebnissen dieser Arbeit:

Posterpräsentation beim „GSEV Meeting“, 10/2024, Hamburg (Deutschland)

Posterpräsentation beim „Microbiome Meeting“, 10/2024, Cold Spring Harbor (USA)

Danksagung

Zuallererst möchte ich mich herzlich bei Herrn Prof. Dr. Eckart Meese für die Möglichkeit, meine Promotion am Institut für Humangenetik durchzuführen, bedanken. Vielen Dank für das Vertrauen in meine Arbeit, die Förderung meiner Ideen und die großartige Unterstützung während meiner Promotionszeit.

Mein besonderer Dank gilt zudem Frau Dr. Nicole Ludwig, die mich bereits seit meiner Masterarbeit mit ihrer steten Gesprächsbereitschaft und wertvollen Ratschlägen unterstützt und motiviert hat. Ich danke ebenfalls den gesamten Mitarbeitern des Instituts für Humangenetik, für die gegenseitige Unterstützung und die entspannte Arbeitsatmosphäre. Vielen Dank vor allem an Frau Amila Beganovic für die Hilfe bei der Isolation der RNA aus den Caco-2 Zellen, danke auch an Frau Esther Maldener für die Unterstützung bei der Durchführung der Agarose-Gelelektrophorese zu Beginn meiner Doktorarbeit und auch vielen herzlichen Dank an Frau Stefanie Rheinheimer für die Hilfe beim Western Blot. Zudem danke ich allen ehemaligen Doktoranden-Kolleginnen und Kollegen der Humangenetik, Frau Dr. Caroline Diener, Frau Dr. Lena Krammes, Frau Dr. Laura Nickl, Frau Dr. Viktoria Wagner, Frau Dr. Lea Becker und Herrn Dr. Giuseppe Rigogliuso für die gegenseitige Unterstützung und schöne gemeinsame Zeit. Einen weiteren besonderen Dank möchte ich an Herrn Dr. Martin Hart richten, durch den ich während meines Master-Studiums überhaupt erst den Weg in das Institut für Humangenetik gefunden habe.

Weiterhin bedanke ich mich bei der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Andreas Keller vom Lehrstuhl für Klinische Bioinformatik (Universität des Saarlandes), insbesondere bei Herrn Dr. Georges Schmartz und Herrn Shusruto Rishik für die vielfältige und umfangreiche Unterstützung im Rahmen der bioinformatischen Auswertung der Daten.

Darüber hinaus bedanke ich mich bei den vielen Kooperationspartnern, allen voran bei Herrn Prof. Dr. Gregor Fuhrmann, durch den ich die Möglichkeit erhalten habe, mein Wissen um das Fachgebiet der extrazellulären Vesikel erweitern zu können und der mich stets bei meinen Fragen unterstützt hat. Weiterhin möchte ich mich auch bei der gesamten Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Claus-Michael Lehr am Helmholtz Institut für pharmazeutische Forschung Saarland (HIPS) bedanken, bei der ich über einen längeren Zeitraum die Möglichkeit hatte, als Gastdoktorandin tätig zu sein und die mich in dieser Zeit herzlich aufgenommen und unterstützt haben. Ein besonderer Dank geht an Frau Petra König und Frau Tabea Trampert für die umfassende Hilfe in der Zellkultur an Herrn Pascal Paul für die Hilfe mit dem SEM und an Frau Dr. Annette Boese für die Hilfe im S2-Bereich. Ich bedanke mich zudem bei Herrn Dr. Marcus Koch vom Leibniz-Institut für Neue Materialien (INM) für die Zeit, die er in die Kryo-TEM Aufnahmen der extrazellulären Vesikel investiert hat.

Weiterhin möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Dr. Sören Becker und den gesamten Mitarbeitern vom Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene (Universität des Saarlandes) für die langjährige Zusammenarbeit und die Unterstützung meiner Versuche bedanken, auch wenn die Ergebnisse es leider nicht in diese Arbeit geschafft haben.

Ich bedanke mich zudem herzlich bei der Hedwig-Stalter-Stiftung für die Anerkennung und Förderung meiner Forschung.

Ein weiterer Dank geht an meine Freunde, die mich seit der Schulzeit oder dem Studium begleitet haben und mir mit gutem Rat zur Seite standen. Insbesondere danke ich meiner besten Freundin Mareike, die mich in jeder Lebenslage zum Lachen bringt.

Der größte Dank gilt meiner Familie, die mich in jeder Phase unterstützt, motiviert und durch alle Höhen und Tiefen begleitet haben. Danke für alles!

Lebenslauf

Aus datenschutzrechtlichen Gründen wird der Lebenslauf in der elektronischen Fassung der Dissertation nicht veröffentlicht.