

Aus dem Max von Pettenkofer-Institut für Hygiene und Medizinische
Mikrobiologie

Institut der Ludwig-Maximilians-Universität München

Lehrstuhl für Medizinische Mikrobiologie und Krankenhaushygiene

Direktor: Prof. Dr. Sebastian Suerbaum

**„Charakterisierung der Produktion und Funktion von
Außenmembranvesikel (*outer membrane vesicles*; OMV)
pathogener *Escherichia coli*“**

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Annabell Windisch, geb. Peter

aus Cham

2020

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: PD Dr. Andreas Wieser

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Christian Sommerhoff
PD Dr. Konrad Trülzsch

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: Prof. Dr. Sören Schubert

Dekan: Prof. Dr. Reinhard Hickel

Tag der mündlichen Prüfung: 23.01.2020

Inhaltsverzeichnis

A	Einleitung	
1.	Bedeutung von Bakterien.....	1
1.1	Escherichia coli	1
2.	Außenmembranvesikel (<i>outer membrane vesicles</i> ; OMV).....	4
2.1	Allgemeines	4
2.2	Funktionen der OMV	5
2.3	Anwendung von OMV in der Medizin	9
3.	OMV-Produktion und Quantifizierung	11
4.	Zielsetzung	14
B	Material	
1.	Geräte.....	16
2.	Material	17
2.1	Nährmedien	17
2.2	Puffer	19
2.3	SDS-Gel.....	20
2.4	Weitere Reagenzien.....	21
2.5	Bakterienstämme	22
2.6	Verwendete Zelllinie	22
2.7	Plasmid	22
2.8	Software.....	22
C	Methoden	
1.	Kryokonservierung.....	23
2.	Bakterienkultur	24
3.	Wachstumskurven	25
3.1	Photometrische Bestimmung der Dichte der Bakterienkultur	25
3.2	Bestimmung der koloniebildenden Einheiten (KbE)	26
3.3	OD-Keimzahl-Korrelation	26
4.	Vesikelzählung.....	28
4.1	Probenansatz.....	28
4.2	Vesikelmessung mittels Durchflusszytometrie.....	28
4.3	Probenverarbeitung.....	29
5.	Vesikelisolierung mittels Ultrazentrifuge	31

6.	Transformation.....	32
6.1	Plasmidisolierung mit NucleoBond PC20 (AX20), Mini Prep.....	32
6.2	Herstellung elektrokompenter Zellen	33
6.3	Elektroporation.....	33
7.	Zellkultur-Versuche	35
7.1	Vorbereitung	35
7.2	Infektion	36
7.3	Keimlastbestimmung	37
8.	Fluoreszenzmikroskopie	38
9.	Reabsorptionsversuch	39
10.	Durchführung eines Western Blots	40
10.1	Probenvorbereitung.....	40
10.2	SDS-Polyacrylamidgel.....	40
10.3	Western Blot	41
10.4	Detektion der Proteine.....	41
11.	Mausmodell	43
11.1	Vorbereitung des Infektionsversuchs.....	43
11.2	Infektion	43
11.3	Auswertung	43
12.	Zytokinmessung der Organhomogenisate	44
D Ergebnisse		
1.	Wachstumskurven	45
1.1	Wachstumskurven in Vollmedium	46
1.2	Wachstumskurven unter Stressbedingungen	47
1.3	Bestimmung der koloniebildenden Einheiten.....	50
1.4	Korrelation optische Dichte-koloniebildende Einheiten	50
2.	Vesikelquantifizierung mittels Durchflusszytometrie	53
2.1	Probenentnahme und –aufbereitung	53
2.2	Durchflusszytometrie.....	53
3.	Vesikelkonzentration von Bakterienkulturen	55
3.1	Vesikelquantifizierung in ausgewählten Wachstumsphasen.....	55
4.	Vesikelproduktion in der Phase des exponentiellen Wachstums	59
4.1	Probenvorbereitung.....	59
4.2	Vesikelproduktion in reichem Nährmedium	59

4.3	Vesikelproduktion unter Stressbedingung	61
5.	Vesikelproduktion in der stationären Phase.....	65
5.1	Probengewinnung in der stationären Phase.....	65
5.2	OMV-Nettoproduktion unter stressfreien Wachstumsbedingungen.....	66
5.3	OMV-Nettoproduktion unter Stressbedingungen	70
5.4	Auswirkung der Stressbedingungen auf die Vesikelkonzentration in einer stationären Kultur	73
6.	Wiederaufnahme von Vesikel	75
7.	Makrophageninfektionsversuch	77
8.	Fluoreszenzmikroskopie	79
9.	Zytokinsekretion aus der infizierten Harnblase der Maus	81
E	Diskussion	
1.	Diskussion der Methode	84
2.	Diskussion der Ergebnisse	86
2.1	Wachstumskurven.....	86
2.2	Vesikelkonzentration	86
2.3	Vesikelproduktion.....	88
2.4	Wiederaufnahme.....	95
2.5	Zellkulturversuch.....	96
2.6	Fluoreszenzmikroskopie.....	97
2.7	Zytokine	98
F	Zusammenfassung	100
G	Glossar	102
H	Literatur.....	105
I	Abbildungsverzeichnis	111
J	Tabellenverzeichnis	113
K	Danksagung.....	114
L	Eidesstattliche Versicherung.....	116

A Einleitung

1. Bedeutung von Bakterien

Bakterien existierten schon auf der Erde lange bevor es höher entwickelte Lebewesen gab. Diese Einzeller findet man nahezu überall: im Wasser, in der Erde und sogar in der Atmosphäre. Einige Spezies leben auch im oder auf dem Körper von anderen Lebewesen, auch dem des Menschen. Beim Menschen sind sogar in der Regel mehr bakterielle Zellen als Körperzellen anzutreffen. Die Besiedlung des menschlichen Darmes sowie der Hautoberfläche beginnt schon mit der Geburt und bleibt zeitlebens erhalten. Die Besiedelung mit den apathogenen Bakterien hat für den Wirt keinen Nachteil, im Gegenteil, die Anwesenheit der Bakterien kann auch für den Wirt vorteilhafte Nutzeffekte haben. Erst wenn das Immunsystem geschwächt, das sensible Gleichgewicht gestört oder krankheitserregende Bakterien die Oberhand gewinnen, können Probleme auftreten. Durch die Einführung besserer Hygienestandards und die Möglichkeit der aktiven Immunisierung konnte das Auftreten von Infektionskrankheiten in Deutschland reduziert werden. Weiterhin ermöglichte die Entdeckung von Antibiotika die kausale Behandlung bakterieller Infektionskrankheiten, wodurch die Mortalität dieser Erkrankungen massiv gesenkt werden konnte. Doch der vielfache Einsatz von antibakteriellen Substanzen bringt auch Risiken mit sich, denn Bakterien sind sehr anpassungsfähig und entwickeln Mechanismen, um sich der Behandlung zu widersetzen. So stellen zunehmende Antibiotikaresistenzen ein ernsthaftes Problem in der Medizin dar. Zu den bekanntesten Problemkeimen zählen heute Methicillin-resistente *Staphylococcus aureus* (MRSA), Vancomycin-resistente Enterokokken (VRE) und multiresistente gramnegative Erreger (*multi-resistant gramnegativ rods*, MRGN). Während viele MRSA- und VRE-Stämme noch sensibel auf ausgewählte Antibiotika sind, verursacht die Therapie von MRGN zunehmende Schwierigkeiten. Diese gramnegativen Erreger besitzen oft so viele Resistenzen, dass sie mit keinem gängigen Antibiotikum mehr behandelbar sind (Pitout, 2010). Infektionen mit diesen sogenannten panresistenten Erregern sind deshalb mit einer dramatisch erhöhten Mortalität vergesellschaftet.

1.1 *Escherichia coli*

Zu den gramnegativen Stäbchen zählen die Gattungen der Enterobakterien, bei denen es sich entgegen ihres Namens nicht ausschließlich um Darmkeime handelt. Einer der bekanntesten Vertreter dieser Familie ist das vom deutsch-österreichischen Kinderarzt Theodor Escherich beschriebene "Bacterium coli commune", welches später ihm zu Ehren *Escherichia coli* getauft wurde. Diese peritrich begeißelten, fakultativ anaeroben Stäbchen sind ein wichtiger Bestandteil

A Einleitung

der Darmflora von Säugetieren und kolonisieren die Dickdarmschleimhaut. Als Kommensalen leben sie vor äußeren Einflüssen geschützt und beziehen ihre Nahrung aus dem Speisebrei des Wirtsorganismus. Gleichermaßen bietet die Standortflora, vor allem aus Bakterien und Pilzen bestehend, Vorteile für den Wirt. So dient sie in erster Linie dem Schutz vor der Besiedelung mit fakultativ oder obligat pathogenen Keimen. Außerdem verstärkt sie die Epithelbarriere, unterstützt den Wirt bei der Ausbildung des Immunsystems und versorgt ihn teilweise sogar mit wichtigen Nährstoffen (Kamada, Chen, Inohara und Núñez, 2013).

Im Jahre 1922 wurde ein solcher Darmkommensale aus dem Stuhl eines genesenden Diphtheriepatienten isoliert. Dieser apathogene *E. coli* wurde aufgrund seiner kurzen Generationszeit und seines prototrophen Wachstums verstärkt im Labor eingesetzt. Dieses Patientenisolat wurde in den Folgejahren durch Rekombination und röntgen-induzierte Mutation genetisch verändert. So entstanden eine Vielzahl verschiedener auxotropher Mutanten (Bachmann, 1972). Seit dieser Zeit werden diese sogenannten K-12 *E. coli* intensiv erforscht, dienen als Modellorganismus und ermöglichen das Verstehen grundlegender molekularbiologischer Prozesse.

In der Spezies *Escherichia coli* existieren neben den apathogenen auch verschiedene pathogene Stämme. Bei diesen Pathogenen kann man in zwei große Gruppen unterscheiden: die intestinal pathogenen und die extraintestinal pathogenen *Escherichia coli* (siehe Tabelle 1).

Intestinal pathogene *E. coli* werden fäkal-oral verbreitet und spielen eine bedeutende Rolle in Ländern mit niedrigem Hygienestandard. Infektionen mit intestinal pathogenen *E. coli*-Stämmen sind gekennzeichnet durch Diarrhoe mit oder ohne begleitendes Erbrechen. Gerade für Kinder und alte Menschen stellt die damit einhergehende Dehydrierung eine ernst zu nehmende Gefahr dar. Aber auch in Industrieländern mit hohem Hygienestandard können intestinal pathogene *E. coli* zu einer Bedrohung werden, wie 2011 der Ausbruch von EHEC/HUSEC in Deutschland mit 53 Toten zeigte. Hier kam es zu einem Ausbruch mit enterohämorrhagischen *E. coli* (EHEC) des Serotyps O104:H4 (Mellmann et al., 2008) mit Assoziation zum hämolytisch-urämischem Syndrom (HUS). Es wurden 2.987 Fälle mit akuter Gastroenteritis und 855 Fälle mit Ausbildung eines hämolytisch-urämischen Syndroms (HUS) verzeichnet. Beim HUS handelt es sich um eine Komplikation der EHEC-Infektion, durch welche sich die Mortalität stark erhöht. Bei dieser Komplikation kann es neben verschiedenen neurologischen und toxischen Effekten auch zum akuten Nierenversagen kommen (Robert-Koch-Institut, 2011). Enterohämorrhagische *E. coli* stellen einen eigenen Pathotyp dar, daneben existieren noch 6 weitere, wie Tabelle 1 zeigt. Jeder Pathotyp ist durch ein bestimmtes Muster an Virulenzfaktoren charakterisiert, die den jeweiligen Pathomechanismus unterstützen.

Tabelle 1: Einteilung der pathogenen *E. coli*-Stämme in Gruppen und Pathotypen (Allocati, Masulli, Alexeyev und Di Ilio, 2013)

Pathogene *E. coli*-Stämme

Intestinal pathogene <i>E. coli</i>-Stämme (IPEC)	Extraintestinal pathogene <i>E. coli</i>- Stämme (ExPEC)
<ul style="list-style-type: none">• Enterotoxische <i>E. coli</i> (ETEC)• Enteropathogene <i>E. coli</i> (EPEC)• Enterohämorrhagische <i>E. coli</i> (EHEC)• Enteroinvasive <i>E. coli</i> (EIEC)• Adhärent-invasive <i>E. coli</i> (AIEC)• Adhärente <i>E. coli</i>:<ul style="list-style-type: none">- Enteroaggregative <i>E. coli</i> (EAEC)- Diffus-adhärente <i>E. coli</i> (DAEC)	<ul style="list-style-type: none">• Uropathogene <i>E. coli</i> (UPEC)• Neonatale Meningitis <i>E. coli</i> (NMEC)• Avian pathogenic <i>E. coli</i> (APEC)

Bei den intestinal pathogenen Stämmen ist die Infektion des Darmes, verbunden mit der Ausbildung entsprechender Symptome, wegweisend. Anders verhält es sich mit den extraintestinal pathogenen Stämmen (ExPEC), die man auch in 20% der asymptomatischen Patienten finden kann. Erst außerhalb des Gastrointestinaltraktes werden eine Reihe von Virulenzfaktoren für die pathogene Potenz relevant (Johnson und Russo, 2002). Im Unterschied zu den intestinal pathogenen *E. coli*-Stämmen mit ihren Pathotypen besitzen extraintestinal pathogene *E. coli*-Stämme kein typisches Virulenzfaktorenmuster. Sie bedienen sich einer Kombination aus verschiedenen Adhäsinen, Fimbrien und Toxinen (Kaper, Nataro und Mobley, 2004). Damit ist es ihnen möglich, beispielsweise die Schleimhäute der ableitenden Harnwege zu infizieren. Extraintestinal pathogene *E. coli*-Stämme sind mit rund 80% der häufigste Erreger von Harnwegsinfekten (Allocati, Masulli, Alexeyev und Di Ilio, 2013). Für Blasenentzündungen und akute Pyelonephritiden ist überwiegend die Untergruppe der uropathogenen *E. coli* (UPEC) verantwortlich. Eine weitere nennenswerte Untergruppe der ExPEC sind die NMEC (neonatale Meningitis *E. coli*). Sie sind einer der Haupterreger für gramnegative bakterielle Neugeborenenmeningitiden in Entwicklungsländern. Nicht selten führt diese Erkrankung zum Tod oder hinterlässt neurologische Schäden. Eine frühe antimikrobielle Therapie ist hierbei für die Prognose entscheidend. Auch hier wird in den letzten Jahren die Therapie durch vermehrt auftretende Multiresistenzen erschwert.

2. Außenmembranvesikel (*outer membrane vesicles*; OMV)

2.1 Allgemeines

Wie oben erwähnt sind *Escherichia coli*-Stämme nicht nur bedeutend als Darmkommensalen und Krankheitserreger, sondern dienen auch als apathogene Laborstämme für genetische Arbeiten und als Modellorganismus. Dementsprechend viel wurde an und mit diesen Stämmen geforscht. Dabei fiel Forschern in den 60er Jahren auf, dass sich im zellfreien Kulturüberstand Komponenten der Bakterienhülle fanden (Bishop und Work, 1965). Zunächst brachte man solche Zellwandbestandteile nur mit ausgewählten Wachstumsbedingungen, wie etwa Aminosäuremangel, in Verbindung. Aber auch bei normal wachsenden gramnegativen Bakterien war dieses Phänomen zu beobachten. Genauere Untersuchungen zeigten, dass die gefundenen Partikel der äußeren Membran ähneln, wobei es jedoch Unterschiede im Lipid- und Proteinprofil gibt. Des Weiteren fand man heraus, dass diese Membranfragmente auch als intakte Vesikel vorliegen können (Hoekstra, van der Laan, de Leij und Witholt, 1976).

Seit ihrer Entdeckung wurden diese, im Englischen als *outer membrane vesicles* (OMV) bezeichneten, Außenmembranvesikel genauer erforscht und so das Wissen über sie vermehrt. Heute weiß man, dass diese 20-250 nm durchmessenden Vesikel von gramnegativen Bakterien in allen Phasen ihres Wachstums *in-vitro* und auch während der Infektion gebildet werden. Sie bestehen aus der Phospholipiddoppelschicht der äußeren Bakterienmembran und in ihrem Inneren finden sich Bestandteile des Periplasmas. Zusätzlich fand man im Inneren auch einige Proteine der inneren Membran und des Zytosols (Ellis und Kuehn, 2010; Kaparakis-Liaskos und Ferrero, 2015) sowie DNA und RNA (Biller et al., 2014), wie es in Abbildung 1 grafisch veranschaulicht ist.

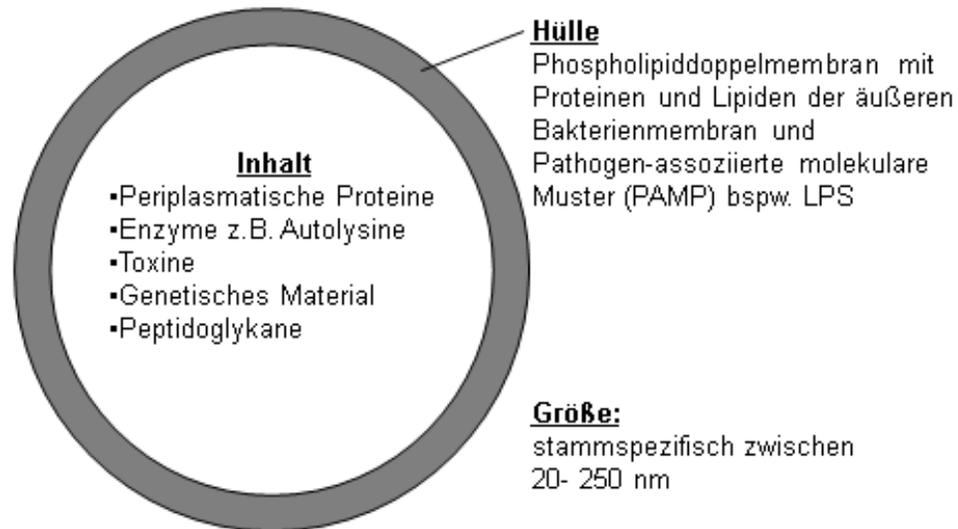


Abbildung 1: Schematischer Aufbau von OMV (Kaparakis-Liaskos und Ferrero, 2015)

Vesikel stellen demnach mehr als schlichte Membranfragmente dar. Ihre Oberfläche besteht hauptsächlich aus charakteristischen Proteinen der äußeren Membran, wobei es auffällige Unterschiede in der Proteinkonstellation im Vergleich zur restlichen Außenmembran gibt. Ausgewählte Proteine sind in OMV angereichert und andere fehlen. Mit der Lipidzusammensetzung verhält es sich ähnlich. Aufgrund dieser Beobachtungen vermutet man, dass es sich bei der Vesikelproduktion um einen regulierten Prozess handelt, der auch deren Zusammensetzung beeinflusst (Kulp und Kuehn, 2010). Jedoch ist es, aufgrund der aktuellen Datenlage, noch nicht möglich dazu konkretere Aussagen zu treffen oder gar Modelle aufzustellen.

2.2 Funktionen der OMV

Als die Forschergruppe um Bishop und Work das erste Mal Vesikel als Membranfragmente im zellfreien Überstand beschrieb (Bishop und Work, 1965), wurde der Entdeckung zunächst keine größere Beachtung geschenkt. Heute wird die Vesikelproduktion als ubiquitärer Prozess von gramnegativen Bakterien angesehen, da man die Vesikelbildung bei schwärmenden und planktonischen Bakterienkulturen auf verschiedenen Nährmedien, sowie auch in natürlicher Umgebung nachweisen konnte (Beveridge, 1999; Biller et al., 2014). Tatsächlich wurden auch während der Infektion von Wirtsgeweben, die Vesikelbildung beobachtet. Dabei blieb die Rolle der Vesikel bis jetzt ungeklärt, da die Untersuchungen aufgrund ihrer geringen Größe und dem Fehlen eines einheitlichen Markers sehr aufwendig sind (Kuehn und Kesty, 2005).

A Einleitung

Auch außerhalb von Infektionsbedingungen haben sich viele Arbeiten mit der Entschlüsselung der Bedeutung von OMV beschäftigt. Dabei wurde eine ganze Reihe an Prozessen gefunden, an denen sie mit zu wirken scheinen. Tabelle 2 gibt hierbei einen Überblick über die wichtigsten Funktionen und einige sollen im Folgenden kurz erläutert werden.

Tabelle 2: Übersicht exemplarischer Aufgaben von Vesikel eingeteilt nach der Wirkung (Olsen und Amano, 2015)

OMV-Eigenschaften	Defensive Funktion	Offensive Funktion
Ihre Hülle zeigt große Ähnlichkeit mit der äußeren Membran der Ursprungsbakterien, sie tragen/sind assoziiert mit Antigenen und Virulenzfaktoren.	<ul style="list-style-type: none">• Schutz des Ursprungsbakteriums durch Abfangfunktion von Antibiotika, Bakteriophagen, Antikörpern und oberflächenaktiven Substanzen.	<ul style="list-style-type: none">• Beeinflussung des angeborenen und erworbenen Immunsystems zugunsten des Bakteriums• Beeinflussung der Wirt-Erreger-Interaktion z. B. Adhäsion, Invasion, (Co-) Aggregation
OMV fungieren als alternatives Sekretionssystem. Ihr Inhalt kann hoch konzentriert, abbaugeschützt über größere Distanzen transportiert werden und über Rezeptor-Ligandenbindung zielgerichtet sezerniert werden.	<ul style="list-style-type: none">• Transport von Signalmolekülen zur Kommunikation mit der Umwelt• Entfernung von akkumulierten und/ oder schädlichen Stoffen aus dem Bakterium• Horizontaler Gentransfer z. B. Antibiotikaresistenzen• Transport von β-Lactamasen reduziert den Stress durch einwirkende Antibiotika• Kollektive Nutzung von hydrolytischen Enzymen in OMV zur Nährstoffgewinnung stabilisiert die Mikroflora im Darm.	<ul style="list-style-type: none">• Transport von biologisch aktiven Toxinen, abbauenden Enzymen und Antibiotika zur Schädigung von Wirtszellen und Ausschaltung konkurrierender Bakterien

Von gramnegativen Bakterien war bereits bekannt, dass sie verschiedene Sekretionsmechanismen nutzen, um durch freigesetzte Botenstoffe mit ihrer Umwelt zu interagieren. Die meisten Sekretionssysteme haben den Nachteil, dass die sezernierten Stoffe entweder frei in die Umgebung abgegeben werden, ohne Schutz vor abbauenden Enzymen, oder aber die Bakterien in direktem Kontakt mit der Zielzelle stehen müssen. Vesikel wurden als

A Einleitung

alternatives Sekretionssystem beschrieben. Sie ermöglichen einen Transport über größere Distanzen, wobei durch die Membranhülle ein gewisser Abbauschutz gewährleistet wird. Außerdem schaffen sie die Voraussetzung, um unlösliche Bestandteile von Bakterium zu Bakterium zu transportieren. So ist es beispielsweise möglich hydrophobe *Quorum-Sensing*-Moleküle zu transportieren und so die Zelldichte einer Bakterienkultur zu regulieren (Kulkarini 2014).

Vesikel bilden somit eine Möglichkeit den Inhalt hoch konzentriert über eine gewisse Transportstrecke zu befördern und sogar über eine spezifische Rezeptor-Liganden-Bindung zielgerichtet zu sezernieren. Die Freisetzung des Inhaltes erfolgt dabei entweder über Lyse der Vesikel, Aufnahme in die Zielzelle oder Fusion (Kulp und Kuehn, 2010).

Neben der Interaktion mit der Umwelt gibt die Vesikelproduktion den Bakterien auch die Möglichkeit sich unerwünschter, eventuell schädlicher Stoffe zu entledigen. Experimente zeigten, dass bei aktiviertem σ E-Stresssystem mehr Vesikel gebildet werden. Dabei wird ihre Produktion aber durch kein bekanntes Stress-Antwort-System kontrolliert. Diese Beobachtung deutet daraufhin, dass Vesikel einen weiteren Mechanismus darstellen, um Stressoren zu begegnen und damit das Überleben der Bakterien zu sichern (McBroom und Kuehn, 2007). Einen Überlebensvorteil bieten OMV auch in Umgebungen mit limitierenden Bedingungen wie zum Beispiel im Wirt. Ihre abbauenden Enzyme und Rezeptoren helfen dort bei der Beschaffung essenzieller Nährstoffe und Spurenelementen oder der Verteidigung gegen das Immunsystem. Besondere Bedeutung haben solche vesikelgebundenen Enzyme auch im Darm. Da sie nicht nur dem Ursprungstamm bei der Nährstofferschließung helfen, sondern auch die Wachstumsnachteile anderer Stämme ausgleichen, tragen sie zur Stabilisierung der bakteriellen Mikroflora bei (Olsen und Amano, 2015).

In der Natur bilden Bakterien häufig Biofilme. In der Biofilmmatrix aller untersuchter gramnegativer Bakterien wurden Vesikel gefunden. Dabei scheinen sie nicht nur Bestandteil des Biofilms zu sein, sondern es liegen auch Hinweise vor, dass auf ihrer Oberfläche assoziierte DNA die Biofilmproduktion überhaupt erst anregt. In der Biofilmmatrix ist es Aufgabe der Vesikel die Bakterien vor Austrocknung, oberflächenaktiven Substanzen und Phagozytose zu schützen. Hierbei fangen Vesikel beispielsweise Antibiotika, Bakteriophagen oder Antikörper ab. Folglich wird die auf die Bakterien einwirkende Konzentration erniedrigt, was ihnen bessere Möglichkeiten verschafft, eine längerfristige Resistenz gegen die antimikrobielle Substanz zu entwickeln (Kulp and Kuehn 2010). Außerdem können in Vesikel befindliche β -Lactamasen Antibiotika inaktivieren. Bei Mischinfektionen sind damit Vesikel eines β -Lactamase-

A Einleitung

produzierenden Stammes auch in der Lage, β -Lactamase-sensible Stämme vor der Antibiotikawirkung zu schützen (Schaar, Nordström, Mörgelin und Riesbeck, 2011).

In der Literatur ist auch die Möglichkeit eines vesikelbasierten Transfers von genetischem Material wie DNA und RNA zwischen Bakterien beschrieben. Zwar ist noch zu klären, welche Rolle diese Variante des horizontalen Gentransfers außerhalb des Labors spielt, aber es konnte bereits die Möglichkeit der vesikelassozierten Verbreitung von Antibiotikaresistenzen nachgewiesen werden (Berleman und Auer, 2013).

Vesikel sind jedoch nicht nur Schutzschild, Transport- und Kommunikationsmittel für Bakterien, sie werden darüber hinaus auch als Waffe genutzt. Die Vesikel pathogener Bakterienstämme enthalten verschiedenste Virulenzfaktoren, weshalb sie auch als „bakterielle Bomben“ bezeichnet werden können. Mit ihnen greifen die Bakterien Wirtszellen (Wai et al., 2003) oder auch andere Mikroorganismen an, um sich gegen sie in ihrer ökologischen Nische zu behaupten (Amano, Takeuchi und Furuta, 2010).

Trotz dieser vielfältigen Funktionen und Aufgaben an denen Vesikel beteiligt zu sein scheinen, gibt es bis heute noch keine verlässlichen Daten über die genaue Vesikelproduktionsmenge einzelner Bakterienstämme. Außerdem ist nicht eindeutig geklärt, ob es sich bei der Vesikelbildung um einen regulierten Prozess handelt und welche Faktoren darauf Einfluss nehmen. Dabei würde das Wissen über die Vesikelproduktion und deren Regulatoren viele neue Möglichkeiten eröffnen.

2.3 Anwendung von OMV in der Medizin

In vorherigen Abschnitt wurde eine große Anzahl verschiedener Prozesse aufgeführt, bei denen Vesikel eine Rolle spielen. Es lässt sich deshalb nur erahnen, wie groß ihre Bedeutung für die gramnegativen Bakterien ist und welche Möglichkeiten sie auch für die Therapie und Prävention von Krankheiten bieten.

Einige Experimente mit Vesikeln eröffneten bereits potenzielle Einsatzgebiete in der Medizin. So stellte man bei Versuchen mit dem gramnegativen Keim *Pseudomonas aeruginosa* fest, dass sich die Vesikelkonzentration durch eine Behandlung mit dem Aminoglykosid Antibiotikum Gentamicin vergrößern lässt (Kadurugamuwa und Beveridge, 1995). Die unter Gentamicin-Behandlung gebildeten Vesikel wurden genauer analysiert und es zeigte sich, dass sie Gentamicin in ihrem Inneren aufwiesen. Da Vesikel von einer Phospholipiddoppelmembran umgeben sind, ist es ihnen möglich, mit der äußeren Membran gramnegativer Keime zu verschmelzen. Durch eine solche Fusion wird ihr Inhalt in das Periplasma der aufnehmenden Bakterienzelle freigesetzt. Über diesen Mechanismus kann auch im Vesikelinneren gespeichertes Gentamicin in das Periplasma anderer gramnegativer Keime gelangen und ins Zytosol transportiert werden. Dort kann es dann seine antibakterielle Wirkung entfalten und die Proteinsynthese behindern (Kadurugamuwa und Beveridge, 1996). Auf diesem Weg ist es möglich, einen Resistenzmechanismus gegen die Antibiotikaaufnahme zu umgehen.

Auch intrazelluläre Bakterien, wie *Shigella spp.* sind mit einer Antibiotikatherapie schwer zu erreichen. Bei Experimenten mit *Shigella flexneri* zeigte sich, dass deren Vesikel die Invasionsproteine ihrer Ursprungsbakterien besitzen und somit in der Lage sind in eukaryote Zellen einzudringen. Da auch ihre Vesikel geringe Mengen Gentamicin bei Ko-Inkubation aufnehmen, konnten sie bei Fusion mit infizierten Wirtszellen das Antibiotikum ins Zellinnere freisetzen und somit intrazellulären Bakterien erreichen (Kadurugamuwa und Beveridge, 1998).

Das Beispiel zeigt, dass die Freisetzung des Vesikelinhaltes zum Teil über eine spezifische Rezeptor-Liganden-Interaktion erfolgt. Wäre dieses System entschlüsselt und synthetisch nachzubilden, würden Vesikel eine neue Möglichkeit darstellen, um Wirkstoffe und Antibiotika gezielter und nebenwirkungsärmer zu applizieren.

Ein weiteres potenzielles Einsatzgebiet der Vesikel ist die Verwendung in oder als Impfstoffe (Berleman und Auer, 2013). Da Vesikel sich von der äußeren bakteriellen Membran abschnüren, besitzen sie auch die Oberflächenantigene ihres Ursprungsbakteriums. Neben den Antigenen enthalten Vesikel zudem auch immunstimulatorische Substanzen (Adjuvanzien). Dadurch sind sie in der Lage eine Immunantwort zu generieren (Beveridge, 1999). Bis heute konnten schon

A Einleitung

verschiedene OMV basierte Immunisierungen gegen ausgewählte Bakterienarten, heterologe Antigene und Parasiten erprobt werden (Mellmann et al., 2008; Choi et al., 2014; Petersen, Nieves, Russell-Lodrigue, Roy und Morici, 2014; Pritsch et al., 2016).

Für die Verwendung in Impfstoffen benötigt man jedoch eine ausreichend hohe Dosis Vesikel. So wurde zunächst versucht mit Detergenzien wie Desoxycholsäure die Vesikel zu extrahieren, was jedoch zu einer Verklumpung und Zusammensetzungsänderung führte. Heute werden keine Detergenzien mehr eingesetzt, sondern es wird durch Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) die Vesikelproduktion gesteigert. EDTA hat den Nachteil, dass es durch die Komplexbildung von Kalziumionen, die LPS-Struktur beschädigen kann. Die mithilfe von EDTA gewonnenen Vesikel behalten aber ihre ursprüngliche Form und Struktur bei und können auch zur Immunisierung eingesetzt werden. Jedoch ist ihre Aufreinigung komplizierter als die von spontan gebildeten OMV. Aus diesem Grund wäre die Entdeckung einer Methode zur Anregung der natürlichen, spontanen Vesikelbildung ein wichtiger Schritt für die vesikelbasierte Impfstoffentwicklung (van de Waterbeemd et al., 2013).

Es wurde bereits versucht durch genetische Veränderungen Mutanten zu erzeugen, die mehr Vesikel bilden. Dazu wurden hauptsächlich Gene ausgeschaltet, die Proteine des Strukturgerüsts zwischen äußerer und innerer Membran codieren. Als Beispiel seien an dieser Stelle die Proteine des Tol-Pal-Systems genannt. So wurde bei Mutanten mit Deletion des TolA eine erhöhte Vesikelproduktion beobachtet (Bernadac, Gavioli, Lazzaroni, Raina und Llobes, 1998). Allerdings ist noch nicht hinreichend untersucht, ob es durch den Defekt des TolA Veränderungen in der Vesikelkomposition gibt.

Grundsätzlich wäre es am effektivsten, direkt in die Regulationskaskade für die Vesikelproduktion einzugreifen. Doch wie bereits erwähnt, ist noch nicht hinreichend bekannt, ob und in welcher Form eine solche Regulation existiert. Weitere Forschungen an dieser Thematik könnten dabei die entscheidenden Erkenntnisse liefern.

3. OMV-Produktion und Quantifizierung

Der genaue Mechanismus der Vesikelproduktion ist noch nicht endgültig geklärt, es wurden aber bereits verschiedene Theorien entwickelt. Abbildung 2 gibt einen groben Überblick über drei Bildungshypothesen.

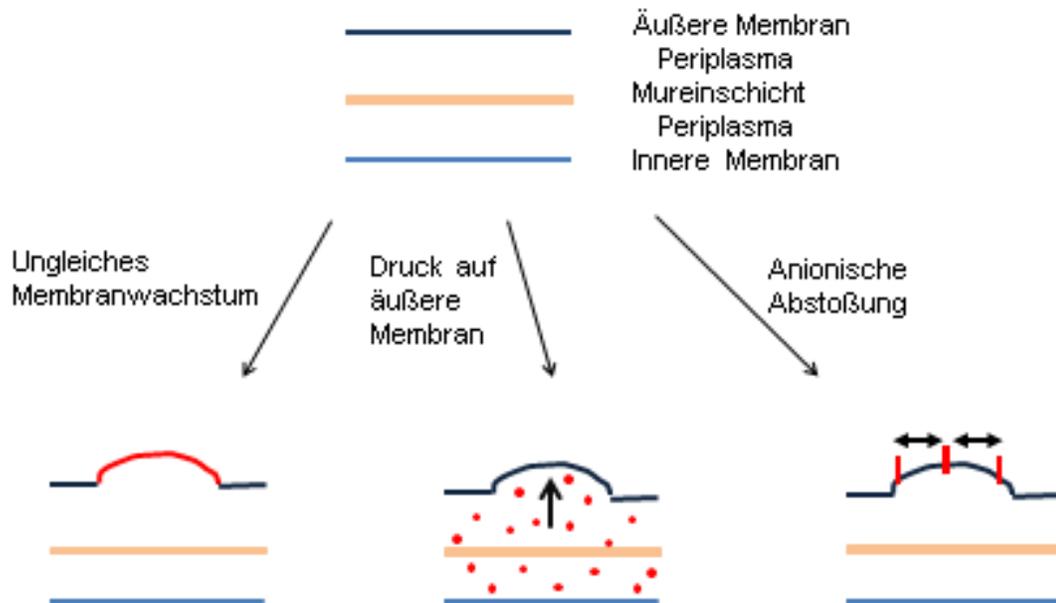


Abbildung 2: Schematische Darstellung des Wandaufbaus gramnegativer Bakterien und drei Hypothesen zur Vesikelbildung (Lee, Choi, Kim und Gho, 2008)

Die erste Hypothese beschreibt die Vesikelbildung als Folge einer Membranintegritätsstörung, verursacht durch ungleiches Wachstum zwischen äußerer Membran und darunter liegender Peptidoglykanschicht. Wenn die Außenmembran zu schnell wächst, kommt es zur Ausstülpung der überschüssigen Membran und schließlich zum Schluss in sich (Wensink und Witholt, 1981). Bekräftigt wurde diese These durch Beobachtungen von oben beschriebenen Mutanten mit Defekt im Tol-Pal-System. Das Tol-Pal-System ist ein Komplex aus mehreren Proteinen, welches zur Aufrechterhaltung der Membranintegrität beiträgt (Lloubes et al., 2001). Damit resultierte die Ausschaltung einzelner Komponenten in einer Destabilisierung der Bakterienwand und damit in einer Hypervesikulation der Stämme (Bernadac, Gavioli, Lazzaroni, Raina und Lloubes, 1998). Neuere Untersuchungen haben jedoch ergeben, dass die OMV-Produktion nicht allein mit einem mangelnden Zusammenhalt der Zellwand oder einer Membranstabilität zu erklären ist (McBroom, Johnson, Vemulapalli und Kuehn, 2006).

A Einleitung

Eine andere Hypothese erklärt die Vesikelbildung durch erhöhten Druck auf die Außenmembran mit daraus folgender Aussackung. Ein solcher erhöhter periplasmatischer Druck entsteht etwa durch freigesetztes Zellwandmaterial während verschiedener Umbauprozesse im bakteriellen Wachstum (Zhou, Srisatjaluk, Justus und Doyle, 1998). Neuere Experimente zeigten, dass eine Aktivierung des σ E-Stresswegs, beispielsweise durch Ansammlung fehlgefalteter Proteine im periplasmatischen Raum, zu einer verstärkten Vesikelbildung führen (Macdonald und Kuehn, 2013). Die akkumulierten fehlgefalteten Proteine lösen eine Stressreaktion aus. Diese Stressreaktion könnte möglicherweise über noch unbekannte Mechanismen die Vesikelproduktion anregen. Es wäre auch denkbar, dass der durch die akkumulierten Proteine erhöhte Druck im periplasmatischen Raum zu einer verstärkten Vesikelbildung führt, wie es die zweite Hypothese suggeriert.

Das dritte Modell beruht auf der Entdeckung, dass hydrophobe Quinolone in Experimenten mit *P. aeruginosa* notwendig waren, um Vesikel bilden zu können (Mashburn und Whiteley, 2005). Diese Signalmoleküle verstärken die anionische Abstoßung zwischen LPS und destabilisieren so die ionische Bindung der äußeren Membran, was über eine Ausbeulung bis hin zur Bläschenbildung führt (Lee, Choi, Kim und Gho, 2008).

Alle drei vorgestellten Modelle schließen sich gegenseitig nicht aus, wahrscheinlich tragen alle Mechanismen ihren Teil zur Vesikelproduktion bei.

Da es sich bei OMV um wenige nanometergroße Partikel handelt, ist es nur möglich sie mittels Röntgenbeugung zu vermessen oder mittels Rasterkraft- oder Elektronenmikroskopie direkt zu visualisieren. Jedoch lässt die Röntgenbeugung eine Bestimmung der Vesikelanzahl methodisch überhaupt nicht zu. Mit den beiden anderen genannten Methoden wäre eine Zählung theoretisch möglich, jedoch mit einem erheblichen technischen Aufwand verbunden. Deshalb wurden Vesikel bisher hauptsächlich anhand der Bestimmung einzelner Komponenten quantifiziert. Aufgrund von Probenverunreinigungen mit nicht-vesikelassoziierten, bakteriellen Produkten wie Proteinkomplexen ist dieser methodische Ansatz störanfällig. Hinzu kommt, dass für dieses Vorgehen alle produzierten Vesikel eine einheitliche Größe und Zusammensetzung besitzen müssten, um eine valide Quantifizierung zu erreichen. Da dies in einem natürlichen System nicht gewährleistet ist, muss davon ausgegangen werden, dass aktuell keine verlässlichen Daten zur Vesikelproduktion existieren.

Kürzlich wurde eine neue Methode entwickelt, mit der oben genannte Fehlerquellen umgangen werden können. Basierend auf einem Fluoreszenzfarbstoff ist es möglich, die Vesikelkonzentration im Kulturüberstand mittels Durchflusszytometrie zu bestimmen (Wieser et

A Einleitung

al., 2014). Damit steht der Forschung eine neue Methode zur einfachen, kostengünstigen Quantifizierung von Vesikel zur Verfügung.

4. Zielsetzung

In dieser Dissertation sollen Durchflusszytometer-basiert die Vesikelproduktionsraten von insgesamt neun verschiedenen *E. coli*-Stämmen aus drei Gruppen untersucht und verglichen werden. Intestinal pathogene *E. coli*, extraintestinal pathogene *E. coli* und Laborstämme (K-12) bilden je eine Gruppe und werden durch jeweils drei Vertreter repräsentiert. Dabei wird der Vergleich der Vesikelproduktionsraten zwischen zwei Wachstumsphasen angestrebt, wie es Abbildung 3 veranschaulicht. Zusätzlich sollen auch die Einflüsse von verschiedenen Wachstumsbedingungen untersucht werden. Neben dem LB-Medium, welches als Vollmedium ein rasches Bakterienwachstum ohne Aktivierung von Stressreaktionen ermöglicht, wurden die Stressoren saurer pH-Wert und Eisenmangel eingesetzt. Diese Stressoren sollten an die Bedingungen während der Infektion im Wirt erinnern und die Anpassungsreaktionen der Bakterien untersuchen.

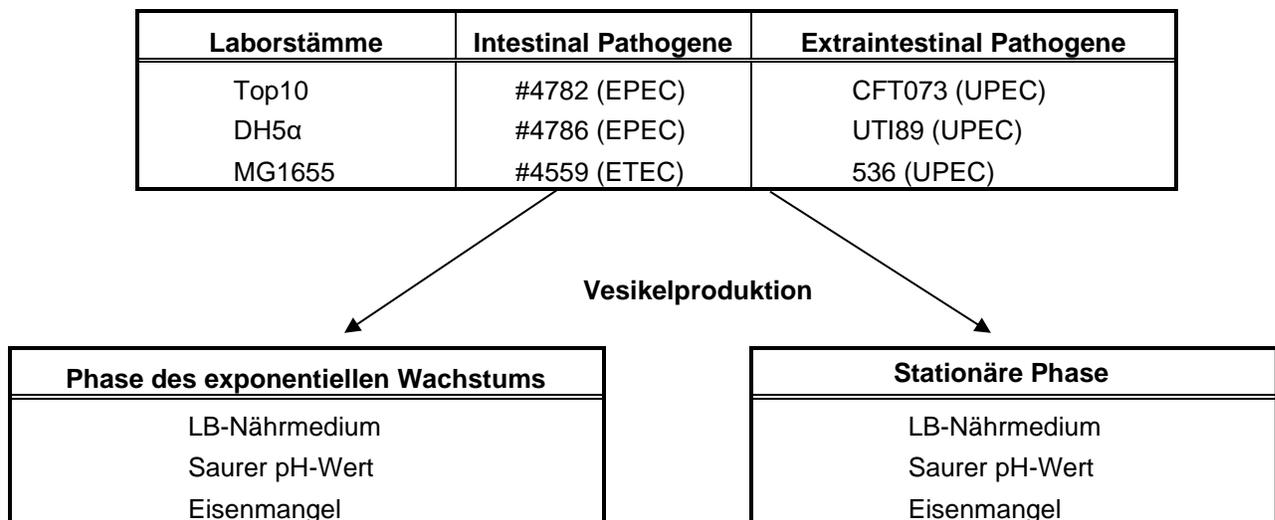


Abbildung 3: Schema des Arbeitsprogramms zur Untersuchung der Vesikelproduktion von *E. coli*

Ergänzend zu den Untersuchungen der Vesikelproduktion, sollen auch die Auswirkungen aufgereinigter Vesikel des uropathogenen Stammes 536 in *in-vitro* und *in-vivo* Versuchen untersucht werden, um weitere Einblicke in die Funktion der Vesikel zu erhalten. Hierfür werden in der Zellkultur Bakterien der Phagozytose durch Makrophagen ausgesetzt, um die Effekte einer hohen Vesikelkonzentration zu untersuchen. Im Mausorganmodell soll durch das Einbringen von uropathogenen *E. coli* ein Harnwegsinfekt induziert und anschließend die Auswirkung von aufgereinigten Vesikel auf das Zytokinprofil untersucht werden. Dabei gibt das

A Einleitung

Zytokinprofil Einblicke in die Reaktionsabläufe des Immunsystems und kann eventuelle Beeinflussungen durch Vesikel aufdecken.

B Material

1. Geräte

Gerät	Firma	Modell
Schüttelinkubator	Stuart Scientific	Orbital Incubator SI50
Thermoschüttler	Eppendorf	Thermomixer compact
Brutschrank	Heraeus Instruments	T6
Brutschrank Zellen	Heraeus Instruments	Cytoperm 2
Kühlschrank	Liebherr Premium	FKV 4310
Gefrierschrank -20°C	Liebherr Premium	LGex 3410 MediLine
Gefrierschrank -80°C	Hera freeze	HFC 486 Top
Zentrifuge	Sigma	3 K30
Zentrifuge	Sigma	1 K15
Zentrifuge	Qualitron	DW-41
Zentrifuge	Eppendorf	Centrifuge 5810R
Ultrazentrifuge	Optima	L-90K
Ultrazentrifugenrotor	Beckman Coulter	SW-32 Ti
Durchflusszytometer	Becton Dickinson	FACS Canto II
OD-Messer	Amersham Bioscience	Ultraspec 3100 pro
pH-Meter	Sartorius	PB-11
ChemiDoc	Biorad	ChemiDoc™ XRS
Laufkammer	Biorad	Mini Protean II™
Gießeinrichtung	Biorad	Mini Protean Casting Stand and Clamps
Netzteil Elektrophorese	Biorad	Power Pac 200
Elektroporationsgerät	Bio Rad	Gene Pulser II
Indifferenzmikroskop	Leitz	Aristoplan
Sicherheitswerkbank	Hera safe	KS 18

2. Material

2.1 Nährmedien

LB (Luria-Bertani)-Medium	
10-fach Konzentrat:	200g Trypton 100g Hefeextrakt 100g NaCl 1,8l Aqua destillata pH-Wert auf 7,4-7,6 einstellen, autoklavieren
Gebrauchslösung:	100 ml 10-fach Konzentrat 900 ml Aqua destillata Autoklavieren
Selektionsmedien:	Chloramphenicol (50 mg/ml) 60 µl/100 ml Medium Kanamycin (50 mg/ml) 100 µl/100 ml Medium

Varianten:

Steril filtriert	Nach Herstellung der Gebrauchslösung mit 0,22 µl Filter (Corning 500 ml Filter System aus Polystyrol) steril filtriert und anschließend autoklaviert.
Eisenmangel	Ausgangspunkt ist gebrauchsfertiges steril filtriertes Medium, welches vor der Benutzung mit 1µl Dipyridin 200 mM pro 1 ml Medium versetzt wird.
Saurer pH-Wert	Nach Herstellung der Gebrauchslösung wurde der pH-Wert des Mediums auf Wert 4,5 (für ExPEC) bzw. 5 (für K-12 und IPEC) mit einer Genauigkeit von 0,1 mithilfe von HCl und NaOH eingestellt, steril filtriert und autoklaviert. *

* Die in der Variante „saurer pH-Wert“ eingesetzten pH-Werte ergeben sich aus einem Vorversuch, bei dem die Bakterien parallel in LB-Medium mit abgestuftem pH-Wert kultiviert wurden. Es war das Ziel möglichst stark gestresste Bakterien zu erhalten, die jedoch noch wachstumsfähig sind. Deswegen wurde jeweils der niedrigste pH-Wert ausgewählt, bei dem die Stämme noch adäquates Wachstum zeigten. Durch die Säuretoleranz der ExPEC wurde der pH-Wert bei 4,5 gewählt und bei den Laborstämmen und den IPEC ein pH-Wert von 5.

B Material

SOC-Medium	
	20g Trypton 5g Hefeextrakt 0,5g NaCl 950 ml Aqua destillata 10 ml 250 mM KCl-Lösung Mit 5N NaOH den pH-Wert auf 7 einstellen, autoklavieren
Nach dem Autoklavieren:	5 ml sterile MgCl ₂ -Lösung (2 M) 20 ml sterile Glukoselösung (ca. 20 mM) Beides zugeben und als 1 ml-Aliquots bei -20°C lagern

Agarplatten	
LB-Agar-Platten	1000 ml LB-Gebrauchslösung 15 g Bacto Agar Autoklavieren, noch warm gießen
Müller-Hinton-Agar-Platten (Firma Oxoid)	300 g/l Rindfleischextrakt-Pulver 17,5 g/l hydrolysiertes Casein 1,5 g/l Stärke 17 g/l Agar pH-Wert wird eingestellt auf 7,3 +/- 0,1 bei 25°C

2.2 Puffer

PBS (Phosphat gepufferte Saline)	
10-fach Konzentrat:	80g NaCl 2g KCl 17,8g Natriumphosphatdihydrat 2,4g Kaliumdihydrogenphosphat 1000 ml Aqua destillata pH-Wert auf 7,3 mit HCl oder NaOH einstellen
Gebrauchslösung:	100 ml 10-fach Konzentrat 900 ml Aqua destillata Autoklavieren
Laemmli-SDS-Laufpuffer	
10-fach Konzentrat:	61,8g Tris Base 288,2g Glycin 20g SDS 2000 ml Aqua destillata pH mit NaOH und HCl auf 8,6 einstellen
Gebrauchslösung:	100 ml 10-fach Konzentrat 900 ml Aqua destillata
Transferpuffer	
10-fach Konzentrat:	30,3g Tris Base 144g Glycin 1000 ml Aqua destillata
Gebrauchslösung:	100 ml 10-fach Konzentrat 200 ml Methanol 700 ml Aqua destillata Kühl lagern

2.3 SDS-Gel

SDS-Gel (10%)	
Trenngel:	5 ml Acrylamid 5,6 ml 1,5M Tris pH: 8,8 4,4 ml Aqua destillata 150 µl SDS 112,5 µl APS 9,45 µl TEMED
Sammelgel:	3 ml Aqua destillata 1 ml Acrylamid 1,5 ml 0,5M Tris pH: 6,8 50 µl SDS 35 µl APS 7 µl TEMED

2.4 Weitere Reagenzien

Verwendete Kits

	Beschreibung
Zytokinmessung	BD Cytometric Bead Array Mouse/Rat Soluble Protein Master Buffer Kit
Plasmidaufreinigung	NucleoBond PC20 (AX20), Mini Prep, Macherey-Nagel (Düren)

Reagenzien

	Firma	Beschreibung
RPMI	Pan Biotech GmbH	RPMI 1640
DPBS	Pan Biotech GmbH	DPBS
F-Aktin	Invitrogen	Alexa Fluor 488® phalloidin
DAPI	Sigma	4'6-Diamidino-2-phenylidol
FM® 1-43	Invitrogen	FM® 1-43
Proteinmarker	Thermo Fisher Scientific	PageRuler™ Prestained Protein Ladder
Antikörper Strep-tag	IBA GmbH	StrepMAB-Classic-HRP
Chemilumineszenz	Thermo Fisher Scientific	SuperSignal® West Pico Chemiluminescent

2.5 Bakterienstämme

	Stamm	Resistenz	Referenz
K-12	Top10 MG1655 DH5 α		Invitrogen (Carlsbad, California, USA) (Blattner et al., 1997) (Grant, Jessee, Bloom und Hanahan, 1990)
IPEC	#4782 = EPEC 348 #4786 = EPEC 10407 #4559 = ETEC H10407		Gegenstand dieser Arbeit Gegenstand dieser Arbeit (Crossman et al., 2010)
ExPEC	CFT073 WT UT189 536 536 Oca 536 pACYC184-TorA dTomato rpsm	 Kn Cm, Kn	(Welch et al., 2002) (Chen et al., 2006); (Mulvey, Schilling und Hultgren, 2001) (Berger, Hacker, Juarez, Hughes und Goebel, 1982) Gegenstand dieser Arbeit Gegenstand dieser Arbeit

2.6 Verwendete Zelllinie

Eingesetzt wurden Makrophagen der Zelllinie J774A.1 (Ralph und Nakoinz, 1975), die ursprünglich aus einem Tumorzitotaxen einer weiblichen BALB/cN-Maus isoliert wurden.

2.7 Plasmid

Plasmid	Resistenz	Quelle
pACYC184-TorA dTomato rpsm	Chloramphenicol	AG Wieser

2.8 Software

Software	Firma	Version
FCAP Array Software	Soft Flow, Inc. (St. Louis Park, Minnesota, USA)	1.0.1
FlowJo	FlowJo, LLC (Ashland, Oregon, USA)	7.6.1
GraphPadPrism	GraphPad Software (La Jolla, California, USA)	5
Image Lab	Bio-Rad Laboratories (Hemel Hempstead, UK)	4.1.16

C Methoden

1. Kryokonservierung

Die Kryokonservierung dient der vorübergehenden oder dauerhaften Aufbewahrung von Bakterienkulturen. Durch die Kälte werden die Stoffwechselfvorgänge verlangsamt und so die Vitalität der Bakterien für lange Zeit bewahrt. Für die Kryokonservierung eines Stammes wurden aus einer Flüssigkultur Bakterien abzentrifugiert. Dieses Pellet wurde in 25% (v/v) Glycerin für -80°C oder 12% (v/v) Glycerin für eine Aufbewahrungstemperatur von -20°C rückgelöst. Das Glycerin soll hierbei die Bildung von großen Eiskristallen verhindern, durch die vor allem die Bakterienmembran beschädigt werden kann. Die Aufbewahrung bei -80°C wurde für längere Zeit, die Aufbewahrung bei -20°C nur für maximal 3 Monate benutzt, da nach Ablauf dieser Zeit mit einer Abnahme der lebenden Erreger gerechnet werden muss.

2. Bakterienkultur

Die Startkulturen für alle Versuche wurden aus kryokonservierten Bakterienlösungen angezüchtet. Grundsätzlich gibt es zwei Arten eine Kultur anzulegen, entweder in Flüssigmedium oder auf Festmedien. Dabei ist zu beachten, dass bei der Kultivierung von Plasmid tragenden Stämmen, Antibiotika entsprechend der auf dem Plasmid kodierten Resistenz zugegeben werden müssen, um einen Verlust des Plasmids während des normalen Wachstums zu verhindern.

Für die Anlage einer Kultur auf festem Nährmedium wurde in der Regel ein Drei-Ösen-Ausstrich durchgeführt. Dies ermöglicht die Isolierung von Einzelklonen und Erkennung von möglichen Kontaminationen. Die beschrifteten Nährmediumsplatten werden je nach Stamm bei unterschiedlichen Temperaturen im Brutschrank inkubiert.

E. coli wächst bei 37°C über Nacht zu deutlich sichtbaren Kulturen heran. Anhand der Morphologie der Kolonien ist bisweilen eine Unterscheidung einzelner Stämme und anderer Erreger möglich, um Kontaminationen auszuschließen.

Bei der Verwendung von Flüssigmedien wird ein steriles Behältnis mit keimfreier Nährlösung gefüllt. Dieses Medium wird mit der Bakterienkultur beimpft, die sich in einem Schüttelinkubator schnell vermehrt. Eine so angelegte Flüssigkultur mit einer Inkubationszeit von 10-12 Stunden wird im Folgenden als Übernacht-Kultur bezeichnet.

3. Wachstumskurven

Eine Wachstumskurve beschreibt die Entwicklung einer Bakterienkultur über die Zeit und verläuft bei Bakterien nach einem bestimmten Muster, wie es in Abbildung 4 schematisch dargestellt ist. Grundsätzlich kann man diese Verlaufskurve durch verschiedene experimentelle Methoden darstellen. Zwei der am häufigsten verwendeten Methoden kamen auch in dieser Arbeit zur Anwendung und werden im Folgenden im Detail beschrieben.

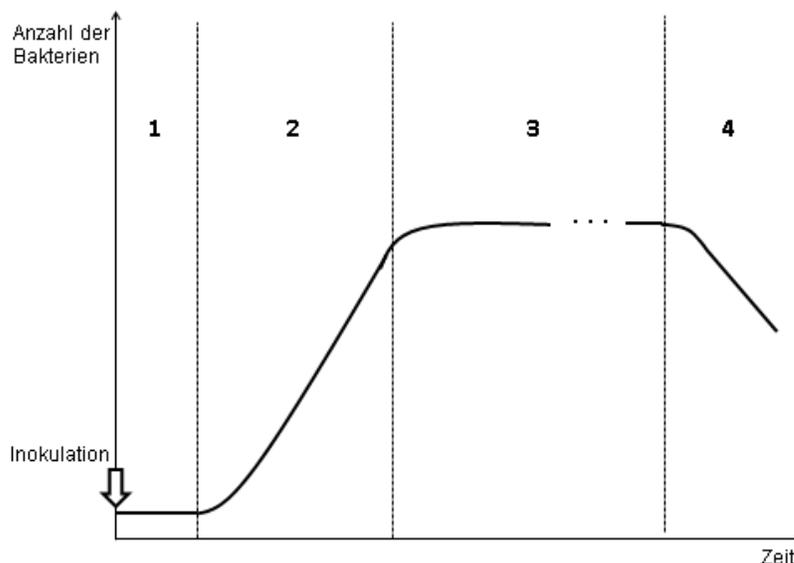


Abbildung 4: Schematischer Wachstumskurvenverlauf mit Inokulation (Pfeil), Anlaufphase (1), Phase des exponentiellen Wachstums (2), stationärer Phase (3) und Absterbephase (4)

3.1 *Photometrische Bestimmung der Dichte der Bakterienkultur*

Die erste Wachstumskurvenbestimmung stellt die Dichtebestimmung mittels Photometer dar. Hierbei wird ausgenutzt, dass Bakterien in Flüssigkultur als kleine Partikel das Licht streuen und bei größerer Menge die optische Dichte der Kultur vergrößern. Für das Bestimmen der Wachstumskurve wurde am Vortag eine Übernacht-Kultur angelegt, indem 3 ml LB-Flüssigmedium mit den Stämmen aus dem -20°C-Gefrierschrank beimpft und anschließend über Nacht bei 200 rpm und 37°C inkubieren wurden. Die für die Versuche eingesetzte Bakterienkultur erhält man durch erneutes Inokulieren von 1 ml der stationären Übernacht-Kultur in 50 ml LB-Medium. Diese Kultur wurde in einem 250 ml Schikanenkolben bei 37°C mit 200 rpm inkubiert. Die optische Dichte wurde bei Licht der Wellenlänge 600 nm stündlich im beschriebenen Zeitraum im Vergleich zum Leerwert (nicht beimpftes Medium) beobachtet. Ab

einer optischen Dichte von ca. 1 wurde dabei die Bakterienkultur für die Messung mit leerwertgleichem LB-Medium verdünnt, um im linearen Messbereich des Photometers zu bleiben.

3.2 *Bestimmung der koloniebildenden Einheiten (KbE)*

Die zweite hier genutzte Möglichkeit das bakterielle Wachstum über die Zeit im Experiment darzustellen, ist die Bestimmung der koloniebildenden Einheiten (KbE) pro Volumen. Diese Methode beruht auf der Möglichkeit ein gewisses Volumen an Kulturmedium auf einem passenden Festmedium auszustreichen und nach dem Wachstum auf den Platten zu zählen, wie viele sichtbare Bakterienkolonien sich gebildet haben.

Dabei entspricht die Bakterienanzahl in einem umschriebenen Volumen näherungsweise den koloniebildenden Einheiten. Es wird jedoch nur die Anzahl der Bakterien erfasst, denen es möglich war, eine Kolonie auf der Platte zu bilden. Des Weiteren kommen als Ausgangswert für eine Kolonie theoretisch auch mehrere Bakterien infrage. Dies ist vor allem bei leicht Klumpenbildenden Organismen eine Fehlerquelle. Die Aussage der beiden Methoden ergänzen sich, da verschiedene Stämme abhängig von ihrem Wachstumsverhalten und der bakteriellen Zellform eine andere optische Dichte bei der gleichen Konzentration bakterieller Organismen haben können.

3.3 *OD-Keimzahl-Korrelation*

In dieser Arbeit wurden beide Methoden eingesetzt, um für jeden verwendeten *E. coli*-Stamm eine Korrelation zwischen optischer Dichte und koloniebildenden Einheiten herstellen zu können. Deswegen wurden in jedem OD-Bereich in Triplikaten die koloniebildenden Einheiten bestimmt. Mit diesen Werten konnte eine mathematische Formel aufgestellt werden, die es ermöglicht von den optischen Dichtewerten auf die koloniebildende Bakterienanzahl des jeweiligen Stammes zurück zu schließen. Dabei wurde die Bestimmung der koloniebildenden Einheiten für die bessere Standardisierung auf industriell gefertigten Müller-Hinton-Agar-Platten der Firma Oxoid durchgeführt.

Am Vortag wurde eine Übernacht-Kultur mit 3 ml Standard-LB-Flüssigmedium im Röhrchen angelegt, indem es mit den gewünschten Stämmen aus dem -20°C-Gefrierschrank beimpft wurde. Dem schloss sich eine Wachstumsphase für mindestens 12h bei 37°C und gleichmäßigen Schüttelbewegungen von 200 rpm an. Nach der Inkubationszeit wurde 1 ml der

C Methoden

Übernacht-Kultur auf 50 ml frisches LB-Flüssigmedium gegeben und anschließend bei 37°C im Schikanenkolben weitergeschüttelt.

Für die Keimzahl-Bestimmung wurden 1,5 ml Mikrozentrifugen-Röhrchen mit 450 µl frisch autoklaviertem PBS vorgelegt und auf Eis gestellt. Zum gewählten Zeitpunkt wurde die OD₆₀₀ gemessen und parallel in das 1. Mikrozentrifugen-Röhrchen 50 µl unverdünnte Bakterienkultur gegeben, die mit dem vorgelegten PBS gründlich gemischt wurde. Von dieser 1:10 Verdünnung wurden 50 µl in das zweite Mikrozentrifugen-Röhrchen übertragen und wieder durch auf- und abpipettieren sowie durch vortexen gemischt. So wurde durch jede Passage eine weitere Verdünnung von 1:10 erzielt. Pro Zeitpunkt und Stamm wurden je drei Müller-Hinton-Agar-Platten jeder aufeinanderfolgenden Verdünnungsstufe mit 50 µl Flüssigkeit beimpft und ausplattiert. Die Nährmedien wurden über Nacht bei 37°C im Brutschrank inkubiert und am nächsten Tag die Bakterienkolonien ausgezählt.

Anschließend wurde die KbE/µl wie folgt berechnet:

(Mittelwert aus (Verdünnungsstufen x Verdünnungsfaktor)): 50 µl = KbE/µl

Die beiden oben beschriebenen Möglichkeiten zur Aufstellung einer Wachstumskurve bieten Vor- und Nachteile. Die Nutzung der optischen Dichte ist ein schnelles Verfahren, um festzustellen, wie stark bewachsen das Flüssigmedium ist. Die Bestimmung der koloniebildenden Einheiten kostet Zeit, aber gibt Aufschluss darüber, wie viele lebende, teilungsfähige Bakterien in der Kultur vorhanden sind.

4. Vesikelzählung

Vesikel der äußeren Bakterienmembran werden während aller Wachstumsphasen gebildet. Ziel dieser Arbeit war es herauszufinden, wie viele Vesikel ein bestimmter Bakterienstamm pro Bakterienzelle und Zeiteinheit in den einzelnen Phasen bildet und ob es Unterschiede in der Vesikelproduktion unter verschiedenen Wachstumsbedingungen gibt. Eine grundlegende Aufgabe ist es also, im standardisierten Vorgehen, Proben zu gewinnen und diese im Folgenden zu verarbeiten.

4.1 Probenansatz

Ausgangspunkt für jede Bakterienkultur war eine Übernacht-Kultur, die in einem Röhrchen mit 3 ml LB-Medium aus den, im -20°C-Gefrierschrank gelagerten, *E. coli*-Stämmen angelegt wurde. Aus dieser Übernacht-Kultur wurde am nächsten Morgen 1 ml auf 50 ml LB-Flüssigmedium der einzelnen Bedingungen übertragen und bei 37°C mit 200 rpm inkubiert. Dabei wurde im Rahmen des Waschvorgangs nach 3 Stunden Inkubationszeit das Flüssigkulturmedium durch vorfiltriertes Flüssigmedium (0,22 µm Porengröße) ausgetauscht, um bei den Messungen den Hintergrund durch nicht vollständig aufgelöste Medienbestandteile und Inhaltsstoffe aus den Startkulturen zu reduzieren. Nach dem Waschvorgang und dem Ablauf der Inkubationszeit wurden aus den Bakterienkulturen Proben zur Bestimmung der Vesikelkonzentration entnommen.

4.2 Vesikelmessung mittels Durchflusszytometrie

Für die Quantifizierung der Vesikel wurde ein Durchflusszytometer FACS CANTO II (Becton-Dickinson, Heidelberg) genutzt, das nach dem folgenden Prinzip arbeitet:

Die zu untersuchende Probe wird in ein Röhrchen gegeben, das luftdicht abgeschlossen in den Durchflusszytometer eingespannt wird. Durch Überdruck auf das Probenbehältnis wird die Probenflüssigkeit über ein dünnes Steigrohr in eine Flusskammer gezwungen. Dort wird die Probe von einer Mantelflüssigkeit mit konstanter Flussrate umhüllt. Durch die hohe Geschwindigkeit der Mantelflüssigkeit werden die Grenzflächen der Probe beschleunigt, dünnen diese im Rahmen einer Fokussierung zentral aus und führen zu einem laminären Fluss der Probe. Durch die konische Form der Flusskammer werden die Partikel in der Probe hydrodynamisch weiter fokussiert und die Abstände der Partikel vergrößert, so dass sie einzeln aufgereiht zentral einen Laser in der Messkammer passieren. Das dabei entstehende Streulicht

(seitlich und geradeaus), sowie mögliche Fluoreszenzsignale werden über verschiedene optische Filter in Detektoren aufgefangen und verstärkt. Die Signale werden im Anschluss weiterverarbeitet.

4.3 Probenverarbeitung

Der vesikelhaltige Überstand wurde wie folgt für eine Messung vorbereitet: 496 μl der Probe in einem Röhrchen mit rundem Bodenstück wurde mit 4 μl FM 1-43 (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA; Murthy und Stevens, 1998) mit einer Konzentration von 0,1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ versetzt und anschließend für rund 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. In dieser Zeit lagert er sich entsprechend der eingesetzten Konzentration in einem konstanten stöchiometrischen Verhältnis reversibel in die Membran ein. Nur eingelagert erzeugt er ein ausreichend starkes Fluoreszenzsignal, das von den Detektoren registriert werden kann. Dadurch benötigt die Färbung der Vesikel keinen zusätzlichen Waschschrift.

Um sicherzugehen, dass trotz hoher OMV-Konzentrationen die zugesetzte Farbstoffkonzentration ausreicht und hinreichend konstant ist, um alle Vesikel in allen Proben in gleicher Weise zu färben, wurde folgende Abschätzung durchgeführt.

Die durchschnittliche Größe von OMV beträgt 50-200 nm, für die Berechnung wurde ein mittlerer Wert von 100 nm verwendet. Die im Durchflusszytometer maximal differenzierbare Anzahl an Messereignissen in der Messkammer beträgt 10.000/s (Datenblatt des Herstellers). Bei einer gemessenen Flussgeschwindigkeit von 0,42 $\mu\text{l}/\text{s}$ ergibt das eine maximal messbare Vesikelkonzentration von rund 24.000 OMV/ μl . Bei einem mittleren Durchmesser von 100 nm (Radius = 50 nm) und einer Membrandicke von 7,5 nm bei *E. coli*, kann man das Membranvolumen durch folgende Gleichung berechnen:

$$V_{\text{Membran}} = V_{\text{OMVaußen}} - V_{\text{OMVinnen}}$$

$$\begin{aligned} V_{\text{Membran}} &= \left(\frac{4}{3} \times \pi \times (50 \text{ nm})^3\right) - \left(\frac{4}{3} \times \pi \times (50 \text{ nm} - 7,5 \text{ nm})^3\right) \\ &= 200.000 \text{ nm}^3/\text{OMV} \end{aligned}$$

$$V_{\text{OMV}} = V_{\text{Membran}} \times \text{OMV-Konzentration} = 200.000 \text{ nm}^3/\text{OMV} \times 24.000 \text{ OMV}/\mu\text{l}$$

$$V_{\text{OMV}} = 4.800.000.000 \text{ nm}^3/\mu\text{l} = 4,8 \times 10^9 \text{ nm}^3/\mu\text{l}$$

Die Membranen in einer Probe mit der maximalen Anzahl an messbaren Vesikel nehmen ein Volumen von $4,8 \times 10^9 \text{ nm}^3/\mu\text{l}$ ein. Umgerechnet ist $1 \mu\text{l} = 1 \times 10^{18} \text{ nm}^3$, demnach überwiegt der

C Methoden

membranfreie Anteil der Probe 2×10^8 -fach. Damit ist das Membranzvolumen vernachlässigbar klein und die Farbstoffkonzentration im Rahmen der messbaren Vesikelkonzentration näherungsweise als konstant anzusehen (Wieser et al., 2014).

Außerdem wurde eine Probe des verwendeten gefilterten Kulturmediums auch mit Fluoreszenzfarbstoff angemischt und als Leerwert von den Einzelmesswerten abgezogen. Berechnungen und Kompensationen erfolgten unter Nutzung der Software FlowJo 7.6.1.

Aus den Triplikaten jeder Probe wurde der Mittelwert gebildet und bei bekannter, mittels TruCount™ (Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland) bestätigter Flussrate von 0,42 µl/s war es möglich, die Vesikel-Konzentration der Probe zu berechnen.

5. Vesikelisolierung mittels Ultrazentrifuge

Für die Vesikelisolierung wurde in 400 ml LB-Flüssigmedium eine Bakterienkultur angelegt, welche für mindestens 12 Stunden bei 37°C im Schikanenkolben geschüttelt wurde. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde die Kultur abzentrifugiert, um größere Partikel wie Bakterien aus dem Medium zu entfernen. Anschließend wurde der Überstand noch steril filtriert (Porengröße 0,45 µm), um auch letzte Bakterien zu entfernen. Aus dem resultierenden Überstand können durch Ultrazentrifugation die vorhandenen Vesikel extrahiert werden. Hierfür wurde das Medium bei 150.000g bei 4°C für 3 Stunden zentrifugiert, der Überstand vorsichtig dekantiert und die Ultrazentrifugenröhrchen auf einem Papiertuch so aufgestellt, dass letzte Medienreste ablaufen können. Das verbleibende OMV-Pellet des ersten Röhrchens stellt sich als leicht glasiger Fleck dar und wurde in 0,5 ml DPBS rückgelöst. In diese Suspension wurden mehrere Vesikelpellets nacheinander aufgenommen, um die Vesikel weiter anzureichern. Die isolierten Vesikel wurden bei 4°C gelagert und nach erfolgreicher Sterilitätskontrolle zügig weiterverwendet. Dabei wurde die Sterilitätskontrolle durchgeführt, indem ein geringes Volumen isolierter Vesikel auf eine Blutplatte ausplattiert und bei 37°C bebrütet wurde. Zeigt sich kein bakterielles Wachstum auf der Platte, so können die Vesikel als nicht bakteriologisch kontaminiert angesehen und weiterverwendet werden.

6. Transformation

Als Transformation wird die stabile Aufnahme fremder DNA verstanden. Für die Transformation ist es notwendig, die aufzunehmende DNA zu isolieren. Außerdem müssen die Zielbakterien, insofern sie keine natürliche Kompetenz besitzen, mittels bestimmter Verfahren transformationskompetent gemacht werden.

6.1 *Plasmid isolation mit NucleoBond PC20 (AX20), Mini Prep*

Ein Plasmid ist eine extrachromosomale DNA-Struktur, welche autonom im Bakterium repliziert wird. Im Versuch sollte Plasmid-DNA von einem Stamm auf einen anderen übertragen werden. Das zu übertragende genetische Material wurde zur einfacheren Handhabung mithilfe des NucleoBond-Kits auf Grundlage der alkalischen Lyse aufbereitet. Für die Aufreinigung wurde am Vortag eine 100 ml LB-Flüssigmedium-Kultur des Plasmid-tragenden Bakterienstammes angesetzt, wobei entsprechend der auf dem Plasmid kodierten Resistenzen, Antibiotika zugegeben wurden. Während der mindestens 12-stündigen Inkubationszeit wurden die Erreger bei 37°C im Schüttelinkubator kultiviert. In dieser Zeit vermehren sich die Bakterien und das gewünschte Plasmid wird entsprechend oft kopiert. Das antibiotikahaltige Medium verhindert dabei, dass sich Bakterien ohne Plasmid weiter vermehren können. Für die Aufreinigung der Plasmide wurden eine stationäre Übernacht-Kultur und ein auf der alkalischen Lyse basierender Plasmidisolationskit eingesetzt. Dabei wurde der Kit wie im Handbuch beschrieben angewendet. Dem folgend wurden im Bakterienpellet zunächst über einen EDTA-haltigen Puffer Kalziumionen komplexiert, was zur Membranstabilisierung und Funktionsverlust einiger DNAsen führt. Außerdem wurde durch die enthaltene RNase einzelsträngige RNA abgebaut. Der zweite Puffer enthält ein Detergenz und ist stark alkalisch, was die Wasserstoffbrücken zwischen den komplementären DNA-Strängen aufbricht. Nach der erfolgreichen Reneutralisierung ist lediglich die Plasmid-DNA aufgrund ihrer stabileren Supercoil-Formation in der Lage sich korrekt zu renaturieren. Die chromosomale DNA bildet aufgrund ungerichteter Einzelstrangverbindungen größere DNA-Komplexe, die durch Zentrifugation leicht abgetrennt werden können. Im Überstand ist die Plasmid-DNA enthalten und wurde zunächst an Silicatgelsäulen gebunden und anschließend herausgelöst.

6.2 Herstellung elektrokompetenter Zellen

Für eine gelungene Transformation werden Zellen benötigt, die fähig sind, das genetische Material aufzunehmen. Da die verwendeten *E. coli* nicht von Natur aus in der Lage sind, freie DNA aufzunehmen, muss ihnen eine künstliche Transformationskompetenz verliehen werden. Ziel dieser Vorbehandlung ist es die Membranpermeabilität der Bakterien mittels Elektroporation zu erhöhen, damit die Plasmide effektiver aufgenommen werden können.

Für die Herstellung elektrokompetenter Zellen benötigt man eine Bakterienkultur, deren optische Dichte OD_{600} bei rund 0,5-0,6 liegt. Hierfür wurde am Versuchstag in 50 ml LB-Flüssigmedium eine Bakterienkultur aus einer entsprechenden Übernacht-Kultur angelegt und bei 37°C im Kreisschüttler inkubiert. Sobald die festgelegte optische Dichte erreicht war, wurden die Bakterien in einer auf 4°C vorgekühlten Zentrifuge abgetrennt und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde anschließend in eisgekühlten 10% (v/v) Glycerin in Aqua destillata resuspendiert, gevortext und erneut bei 14000 rpm für 60 Sekunden zentrifugiert und der Überstand verworfen. Diesem Schema folgend wurde das Bakterienpellet mindestens 5-mal gewaschen, wobei darauf geachtet wurde, dass alle Arbeitsschritte auf Eis oder bei 4°C durchgeführt wurden, um eine Membranreparatur durch die Erreger weitestgehend zu unterbinden. Nach dem letzten Waschschrift wurde das Pellet in 500 µl Puffer aufgenommen und zu 50 µl aliquotiert. Die nun kompetenten Bakterien wurden bei -20°C für 1-2 Stunden zwischengelagert und anschließend im -80°C Gefrierschrank bis zu ihrer Verwendung aufbewahrt.

6.3 Elektroporation

Elektroporation bezeichnet das Verfahren, bei dem durch die Einwirkung eines starken elektrischen Feldes, hervorgerufen durch einen kurzen Hochspannungspuls auf die Küvettenwände, die negativ geladene DNA-Moleküle durch die angegriffene Membran der kompetenten Bakterien gedrückt werden. Dies führt zu einer effizienteren Plasmidaufnahme aus der Umgebung.

Für die Elektroporation wurde 1 µl isoliertes Plasmid auf 50 µl kompetente Bakterien eingesetzt und die Mischung in eine spezielle vorgekühlte Elektroporationsküvette pipettiert. Diese Küvette besitzt auf zwei gegenüberliegenden Seiten eine metallische Kontaktfläche, die als Elektroden fungieren und bei Anlegen einer Spannung ein elektrisches Feld aufbauen. Die bakterielle Membran verändert durch die hohe, kurzzeitig einwirkende Feldstärke ihre Permeabilität, und

C Methoden

die negativ geladene Plasmid-DNA wird entlang des Feldes mechanisch bewegt und kann so ins Zellinnere gelangen.

Jedoch bedeutet der Spannungspuls für die Bakterien großen Stress. Um das Absterben der Bakterien zu verhindern, wurde direkt nach Applikation vorgewärmtes SOC-Medium zugegeben. Dieses nährstoffreiche Flüssigmedium dient der Akklimatisierung der Bakterien, die in ihm für 1-2 Stunden bei 37°C inkubiert wurden. In dieser Zeit kommt es auch zur Produktion von Determinanten bei Plasmid-kodierter Antibiotikaresistenz. Um diese transformierten Bakterien zu selektieren, wurde anschließend ein Teil der Kultur auf antibiotikahaltige Platten ausgestrichen. Nur Bakterien, die durch die Aufnahme des Plasmids die Antibiotikaresistenz erworben hatten, waren in der Lage auf den Platten zu Kolonien heranzuwachsen. Diese Kolonien wurden nach einer 12-stündigen Inkubationszeit bei 37°C im Brutschrank auf den Platten identifiziert, isoliert und zur weiteren Verwendung sowie für die näheren Charakterisierungen gesichert.

7. Zellkultur-Versuche

7.1 Vorbereitung

7.1.1 Kryokonservierung

Für den Versuch wurden Makrophagen der Zelllinie J774 verwendet. Die Zellen wurden in flüssigen Stickstoff mit einer Dichte von 5×10^6 pro Kryoröhrchen in einer Mischung aus 70% RPMI-Medium mit 20% (w/v) BSA und 10% (v/v) Dimethylsulfoxid (DMSO) gelagert.

7.1.2 Auftauen

Wurden frische Zellen aus der Stammsammlung benötigt, so wurde die benötigte Anzahl an Kryoröhrchen entnommen und im Wasserbad erwärmt. Nachdem sich alle Eiskristalle aufgelöst haben, wurde der Inhalt unter der Sterilwerkbank in vorgewärmtes Medium in ein Zentrifugenröhrchen überführt. Anschließend wurden die Zellen bei 200g für 5 Minuten pelletiert, der Überstand verworfen und die Zellen in 10 ml RPMI-Medium mit 10% (w/v) BSA rückgelöst. Anschließend wurde die Suspension in eine 25 cm²-Zellkulturflasche eingebracht und im Brutschrank inkubiert.

7.1.3 Wachstumsbedingungen

Die Zellen wuchsen in einem Brutschrank bei 37°C mit 5% CO₂ und 95%-iger Luftfeuchtigkeit in 75 cm²-Zellkulturflaschen heran. Das Medium bestand dabei aus RPMI-Medium mit Zusatz von 10% (w/v) BSA und 1% (v/v) Penicillin+ Streptomycin (10.000 U/ml Penicillin, 10 mg/ml Streptomycin). Alle 2 bis 3 Tage wurde ein Medienwechsel durchgeführt, indem das alte, verbrauchte Medium abgezogen und durch Frisches ersetzt wurde.

7.1.4 Splitten

Bei genannten Wachstumsbedingungen zeigen die Makrophagen eine Verdopplungszeit von rund 35 Stunden. Dies macht die Anlage einer Subkultur rund zweimal die Woche notwendig. Hierfür wurde das Medium vorsichtig abgesaugt, der Zellrasen am Flaschenboden mit PBS gewaschen und nach Zugabe von Medium durch vorsichtiges Abkratzen vom Boden gelöst. Aus der Suspension wurde dann die Zelldichte am Mikroskop mithilfe einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Die Zellen durch Zentrifugation mit 20g für 5 Minuten abgetrennt und das Pellet in einem entsprechenden Volumen rückgelöst, damit eine Menge von $1-2 \times 10^6$ Zellen pro 75 cm²-Flasche eingesät werden konnten. Die Flaschen wurden dann im Brutschrank aufbewahrt, um den Makrophagen die optimalen Wachstumsbedingungen zu liefern.

7.2 Infektion

7.2.1 Herstellung der Infektionsdosen

Für Makrophagen Infektionsversuche wurde, wie auch im Tierversuch, der uropathogene *E. coli*-Stamm 536 verwendet. Die Vorbereitung der Infektionsdosis erfolgte bei beiden Versuchen nach dem gleichen Schema, indem zunächst 50 ml einer Übernacht-Kultur in Vollmedium abzentrifugiert und das Bakterienpellet in 2 ml 25% (v/v) Glycerin rückgelöst wurde. Diese Bakteriensuspension wurde zu 100 µl aufgeteilt und im -80°C Gefrierschrank kryokonserviert. Die Infektionsversuche wurden immer mit gleichartigen Aliquots durchgeführt.

Der Vorgang der Kryokonservierung und des anschließenden Auftauens reduziert die Zahl der teilungsfähigen Bakterien leicht, weshalb die Bestimmung der koloniebildenden Einheiten (KbE) aus wieder aufgetauten Aliquots durchgeführt wurde. Hierfür wurde in 3 Ansätzen jeweils eine Probe auf Eis aufgetaut, mit 1 ml PBS gewaschen, in 500 µl PBS rückgelöst und daraus die koloniebildenden Einheiten bestimmt. Aus den Ergebnissen der drei Ansätze wurde der Mittelwert gebildet und die Keimzahl der verbleibenden Infektionsdosen somit bestimmt.

7.2.2 Makrophageninfektion

Für den Versuch wurden Makrophagen der Zelllinie J774 verwendet. Am Tag vor dem Versuchsbeginn wurden pro Vertiefung 8×10^5 Makrophagen in eine 24-well-Platte eingesät und in 1 ml Nährmedium über Nacht im Brutschrank inkubiert. Über Nacht ist von einem Wachstum von ca. 20 %, also dem Ansteigen der Zellzahl auf 1×10^6 J774-Makrophagen pro Vertiefung, auszugehen. Am Folgetag wurde das Medium abgesaugt, die Zellen mit 1 ml PBS gewaschen und 300 µl RPMI-Medium mit 10% (w/v) BSA zugegeben. Die Antibiotikazusätze des Nährmediums wurden in Hinblick auf die folgende Infektion weggelassen und den Makrophagen eine Akklimatisierungsphase von 1 Stunde vor der eigentlichen Infektion gegeben.

Im Versuchsaufbau wurde eine MOI (*multiplicity of infection*) von 1 angestrebt, was bedeutet, dass zu Beginn des Versuches auf einen Makrophagen ein Bakterium kommt. Aus der Keimzahlbestimmung ist die Anzahl der teilungsfähigen Bakterien in den einzelnen Infektionsdosen bekannt. Deshalb wurden die Aliquots analog zu ihrer Keimzahlbestimmung vorbereitet. Sie wurden zunächst auf Eis aufgetaut, mit PBS gewaschen und anschließend in 500 µl PBS rückgelöst. Nun wurde pro Napf das Volumen an Bakteriensuspension zugegeben, welches einer Keimzahl von 1×10^6 Bakterien entspricht.

Um den Effekt der OMV auf die Infektionsfähigkeit der Bakterien zu untersuchen, wurden bei einer Versuchsgruppe aufgereinigte Vesikel zugegeben, um eine stabil erhöhte Konzentration

an OMV im Verlauf der Infektion sicherzustellen. Dabei wurde die Konzentration auf rund 8.750 OMV/ μ l Gesamtvolumen eingestellt, wodurch die Vesikelneuproduktion der 1×10^6 Bakterien der Infektionsdosis im Vergleich vernachlässigbar gering ist. Als Negativkontrolle wurde das gleiche Volumen von 0,1% (w/v) BSA in der Kontrollgruppe eingesetzt, um mögliche Nährstoffeffekte durch ungleiche Proteinkonzentrationen in den beiden Versuchsgruppen zu minimieren.

7.3 Keimlastbestimmung

Nach 3h wurde ein Triplikat für die Ermittlung der gesamten Keimlast, und das zweite Triplikat für die Bestimmung der intrazellulären koloniebildenden Einheiten verwendet.

Zum ersten Triplikat wurden 20 μ l 5% (v/v) TritonX-100 zugegeben und dadurch während der Inkubationszeit von 10 Minuten bei Raumtemperatur die Makrophagen lysiert. Anschließend wurden verbleibende adhärenente Bestandteile vom Boden gekratzt und das Medium zur Bestimmung der koloniebildenden Einheiten eingesetzt. So wurde die Gesamtanzahl der Bakterien im Versuchsansatz ermittelt, also alle teilungsfähigen Bakterien im Untersuchungsmaterial.

Beim zweiten Triplikat wurde nach Ablauf der dreistündigen Infektionszeit das Medium abgesaugt, die Zellen dreimal mit PBS gespült und anschließend 1 ml RPMI-Medium mit 10% (w/v) BSA und 100 μ g/ml Gentamicin zugegeben. Das Aminoglykosid-Antibiotikum Gentamicin wirkt bakterizid durch die Hemmung der Proteinsynthese. Durch Inkubation von 1 Stunde Dauer bei 37°C wurden alle noch nicht gewaschenen extrazellulären Bakterien abgetötet. Die intrazellulären Bakterien überlebten, da Gentamicin die Makrophagenmembran nicht durchdringen kann. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde das Medium abgesaugt und Reste durch dreimaliges Spülen entfernt. Die verbleibenden Makrophagen wurden durch Zugabe von 0,1% (v/v) TritonX-100 Lösung permeabilisiert, um die intrazellulären Bakterien freizusetzen. Auch hier wurde nach 10 Minuten Inkubationszeit die Vertiefung vorsichtig ausgekratzt und aus der Suspension eine Verdünnungsreihe zur Bestimmung der koloniebildenden Einheiten angelegt.

Für die Auswertung wurde die Anzahl der isolierten KbE aus dem Makrophageninneren (Triplikat 2) von der Gesamtanzahl aus Triplikat 1 subtrahiert, um die Anzahl der extrazellulären Bakterien zu erhalten. Somit war es möglich die Anzahl der koloniebildenden Einheiten intrazellulär und extrazellulär zu vergleichen.

8. Fluoreszenzmikroskopie

In einem weiteren Zellkulturversuch wurde die modifizierte Innen-Außen-Immunofluoreszenzfärbung zur Anwendung gebracht (Ilchmann, Schroeder und Aepfelbacher, 2002). Hierfür wurden Makrophagen auf Deckgläschen angezüchtet und mit Bakterien und OMV konfrontiert. Nach Ablauf der dreistündigen Infektionszeit wurde das Zellkulturmedium abgezogen und das Deckgläschen dreimal mit sterilem PBS für 5 Minuten gewaschen. Anschließend wurden die Zellen durch Zugabe von 500 µl 3,7% (v/v) Paraformalin (PFA) fixiert. Nach 10-15 Minuten Inkubationszeit bei Raumtemperatur wurde der Überstand verworfen und die Reste durch mehrmaliges Waschen mit PBS entfernt. Mit den nun fixierten Zellen wurden die folgenden Färbeschritte durchgeführt. Zunächst wurde das Aktin der Makrophagen mit einer 1:40-Verdünnung von Alexa Fluor 488 markiertem Phalloidin grün angefärbt. Dazu wurden 25 µl der Lösung auf eine hydrophobe Parafilm-Platte pipettiert und die zu färbende Seite der Deckgläschen auf den Färbelösungstropfen gekippt. So wurde für 30 Minuten bei 37°C in einer feuchten Kammer inkubiert. Nach Ablauf der Zeit wurde die überschüssige Farbe mit 1% (w/v) BSA-Lösung abgewaschen. Im zweiten Schritt der Färbung wurden die Zellkerne blau durch die DAPI-Färbung dargestellt. Hierzu wurden analog zur Aktinfärbung 25 µl 0,0005% (w/v) DAPI vorgelegt und die Zellen 3 Minuten bei Raumtemperatur gefärbt und abschließend gewaschen.

Nach abgeschlossener Färbung wurde das Deckgläschen mit 6 µl Mowiol auf einem Objektträger fixiert und über Nacht lichtgeschützt getrocknet. Nach dem Versiegeln der Deckgläschenränder mit transparentem Nagellack wurden die Objektträger lichtgeschützt bis zum Mikroskopieren aufbewahrt.

Die mikroskopischen Bilder wurden mit dem Fluoreszenzmikroskop (Variophot, Leitz) aufgenommen. Eine Quecksilberdampflampe diente hierbei als Lichtquelle.

Entsprechend der eingesetzten Farbstoffe kam für DAPI ein Filter mit 358 nm BP (Bandpass-Filter) für die Anregung und 463 nm LP (Langpass-Filter) für die Emission zum Einsatz. Die Belichtungszeit lag bei DAPI und Alexa Fluor 488 Phalloidin bei 500 ms. Für Alexa Fluor 488 Phalloidin wurde der Exzitationsfilter mit 493 nm und ein 520 nm Emissionsfilter verwendet. Die Aufnahmen von dTomato erforderten eine Belichtungszeit von 2 Sekunden mit Filter von 554 nm für die Exzitation und 581 nm bei der Emission.

9. Reabsorptionsversuch

Im Reabsorptionsversuch wurden aufgereinigte Vesikel des Stammes 536 Oca verwendet. Oca steht für „oligomeric coiled-coil adhesin“, also ein oligomeres Superhelixadhäsion. Die Oca-Proteinfamilie ist eine Gruppe der Autotransporter-Adhäsine, die in der äußeren Bakterienmembran eine Pore formen und Bestandteil des Typ V Sekretionswegs sind (Ackermann, Tiller, Anding, Roggenkamp und Heesemann, 2008).

Die eingesetzten 536 Oca-Bakterien besitzen eine synthetisch erzeugte klonierte Gensequenz, welche für ein synthetisches Oca-Protein codiert, das sich als Trimer autokatalytisch in die äußere Membran einbaut. Dieses Protein beinhaltet je Monomer ein doppeltes Strep-tag und exponiert dieses nach außen. Dies erlaubt die Detektion mittels Antikörper ohne vorherige Fixierung oder Permeabilisierung (Schmidt und Skerra, 2007). Von diesem Stamm wurden durch Ultrazentrifugation Vesikel aufgereinigt und im Versuch verwendet (Schubert und Wieser, 2013).

Im Versuch wurde eine Übernacht-Kultur des uropathogenen 536 WT abzentrifugiert und im halben Ausgangsvolumen in verbrauchtem, vesikelfreiem Medium rückgelöst. Anschließend wurde die optische Dichte bestimmt, durch die Rückschlüsse auf die Konzentration der koloniebildenden Einheiten der Kultur möglich wurden.

Es wurden 536 WT-Kulturen mit unterschiedlichen Konzentrationen der aufgereinigten Oca-Vesikel bei 37°C und gleichmäßigen Schüttelbewegungen von 400 rpm inkubiert und in 30 Minuten Abständen Proben entnommen. Diese Proben wurden abzentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Das Bakterienpellet wurde dreimal mit 0,9% (w/v) NaCl-Lösung gewaschen und im halben Ausgangsvolumen rückgelöst. Die Proben aus dem Überstand und dem Pellet wurden im Western Blot aufgetragen, in dem mithilfe eines Antikörpers die Strep-Tags auf den OMV detektiert wurden. Dieser Antikörper besitzt eine Meerrettichperoxidase (HRP, *Horse Reddish Peroxidase*), welche ein zugegebenes Chemilumineszenz-Reagenz unter Photonenemission spalten und die Strep-markierte Proteine so zur Darstellung bringen können.

10. Durchführung eines Western Blots

Als Western Blot wird eine immunologische Methode bezeichnet, bei der man durch Gelelektrophorese auf einem Polyacrylamidgel befindliche, aufgetrennte Proteine auf eine Nitrozellulosemembran übertragen und einzelne Proteine hoch sensitiv und spezifisch mittels Antikörpern dargestellt werden (Towbin, Staehelin und J., 1979). Die Durchführung eines solchen Western Blots umfasst mehrere Arbeitsschritte, die im Folgenden erläutert werden.

10.1 *Probenvorbereitung*

Die Proben wurden in 20 µl Aliquots in PCR-Gefäße gegeben und ein Mercaptoethanol Loadingpuffer (LPP) in entsprechender Konzentration, z. B. 2 µl eines 10-fachen Konzentrates, zugegeben. Zusammen mit dem Ladepuffer wurde die Probe bei 97°C für 5- 10 Minuten gekocht, um die Proteine zu denaturieren und Disulfidbrücken zu spalten.

10.2 *SDS-Polyacrylamidgel*

Um ein SDS-Gel vorzubereiten, wurde zuerst das Trenngel-Gemisch angesetzt und zwischen zwei dünnen Glasscheiben gegossen. Anschließend wurde das Trenngel mit Wasser überschichtet, um den Luftabschluss und eine gerade Oberkante des Gels zu gewährleisten. Nach Aushärtung des Trenngels wurde das Sammelgel vorbereitet und auf das Trenngel gegossen. Ein eingebrachter Kamm führte dabei zur Bildung von Probenaschen. Nach dem vollständigen Auspolymerisieren wurde das Gel in die mit Puffer gefüllte Laufkammer gespannt und die Proben in die Taschen appliziert.

Für die Orientierung im Gel wurden neben den Proben zwei Marker eingesetzt. Der Prestained Protein Ladder PageRuler™ (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) ist eine Zusammensetzung von unterschiedlich großen Proteinen, die sich entsprechend ihres Molekulargewichts auftrennen und zur Abschätzung des Gewichts der Probenproteine dienen. Ferner sind die Fragmente bereits eingefärbt, um ohne separaten Färbeschritt im Gel sichtbar zu sein. Der zweite Marker enthält eine Mischung aus 6 rekombinanten Proteinen mit einem Strep-tag, einem synthetischen Octapeptid, das sich im Blot durch einen spezifischen Antikörper (anti-Strep) darstellen lässt.

Nach dem Auftragen der Proben und Marker wird in der Laufkammer ein elektrisches Feld durch die Anlage von 200V an den Elektroden der Blotkammer für 45 Minuten erzeugt. In dieser Zeit können die Proteine wandern, was bedeutet, dass sie sich entsprechend ihrer Ladung im

elektrischen Feld bewegen. Sie werden dabei zunächst am Übergang der beiden Gele fokussiert, bevor sie ins Trenngel übertreten. Dort werden die einzelnen Proteine einer Probe entsprechend ihres molekularen Gewichts aufgetrennt und liegen im Gel als Banden vor.

10.3 *Western Blot*

Im nächsten Arbeitsschritt wurden die im SDS-Polyacrylamidgel befindlichen Proteine auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Dazu wurde das SDS-PAGE auf die Nitrozellulosemembran gelegt und zwischen beidseitigem Filterpapier und Schwamm in die Vorrichtung eingespannt. Dabei ist drauf zu achten, dass alle Bestandteile des Blots gut mit dem Transferpuffer getränkt sind und keine Luftblasen zwischen Gel und Membran die Übertragung behindern können. Auch die Blotkammer wurde mit gekühltem Transferpuffer gefüllt, zusätzlich wurde der Puffer mit einem versenkten Kühlblock gekühlt. So vorbereitet wurden für 1 Stunde 90 V angelegt. Das dabei entstehende elektrische Feld führt dazu, dass die Proteine entsprechend ihrer negativen Ladung zur Anode gezogen und durch die vorgelegte Nitrozellulosemembran abgefangen werden. Sie werden dabei auf der Oberfläche der Membran abgelagert und immobilisiert.

10.4 *Detektion der Proteine*

Die auf der Oberfläche der Nitrozellulose gebundenen Proteine wurden im nächsten Schritt mithilfe eines spezifischen Antikörpers detektiert. Für diese Experimente wurde ein anti-Streptag-HRP-Konjugat benutzt. Vor dem Antikörpereinsatz wurden alle unspezifischen Bindungsstellen durch 3% (w/v) BSA mit 0,5% (v/v) Tween20 blockiert, indem die Membran für 1 Stunde bei Raumtemperatur mit dem Puffer bedeckt wurde. Anschließend wurde eine 1:300.000 Verdünnung des Antikörpers ebenfalls für 1 Stunde mit der Membran ko-inkubiert, bevor der Blot je zweimal mit PBS+ 0,1% Tween20 (v/v) und PBS gewaschen wurde. Durch den Waschvorgang wurden alle nicht, oder unspezifisch gebundenen Antikörper von der Membran entfernt.

Für die Detektion gebundener Antikörper wurde das SuperSignal® West Pico Chemiluminescent eingesetzt. Die Lösungen wurden nach Vorgabe des Herstellers gemischt und auf die Nitrozellulosemembran gegeben, wo sie von der Meerrettichperoxidase (*Horse Reddish Peroxidase*, HRP) des Antikörpers unter Lichterzeugung gespalten werden. Das dabei emittierte Licht ist in der Lage einen aufgelegten Röntgenfilm zu schwärzen, der nach Entwicklung im Fotolabor die Position der gesuchten Proteine zeigt.

C Methoden

Anstatt mithilfe der freiwerdenden Photonen einen Film zu schwärzen, gibt es auch die Möglichkeit die detektierten Banden über eine CCD-Kamera (*Charge Coupled Device*, CCD) darzustellen. Eine solche lichtempfindliche Kamera ist im sogenannten ChemiDoc (Biorad, München) enthalten. Dieses Gerät wurde im beschriebenen Versuch genutzt, um die Chemilumineszenz der Blots unter streng standardisierten Bedingungen zu detektieren und mithilfe der dazugehörigen Software die Bandenstärke zu quantifizieren.

11. Mausmodell

Im Tiermodell wurde mit weiblichen Mäusen des Stamms C57BL/6 (Black 6) im Alter von 7-8 Wochen gearbeitet. Die Tiere wuchsen unter keimarmen (SPF = *specific pathogen free*) Bedingungen auf und wurden mit sterilisiertem Trinkwasser und Mäusefutter versorgt. Gemäß dem Tierschutzgesetz wurden in jedem Käfig maximal fünf Tiere gehalten, um den Stress für die einzelnen Individuen zu reduzieren.

11.1 Vorbereitung des Infektionsversuchs

Auch im Mausmodell wurde der uropathogene Stamm 536 eingesetzt. Analog zur Makrophageninfektion wurden auch hier Infektionsdosen vorbereitet und bis zur Weiterverarbeitung im -80°C-Gefrierschrank gelagert. Kurz vor der Infektion wurde dann ein Aliquot auf Eis aufgetaut, mit 1 ml PBS gewaschen, zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und in 500 µl PBS rückgelöst. Jede Infektionsdosis enthält eine zuvor bestimmte Anzahl koloniebildender Einheiten und alle Versuche wurden mit gleichartigen Aliquots durchgeführt. Um die Auswirkung zusätzlich eingebrachter OMV bei der Blaseninfektion quantifizieren zu können, wurden 2 Gruppen gebildet. Die Harnblasen der Versuchsgruppe wurden mit Bakterien und OMV und die Harnblasen der Kontrollgruppe nur mit Bakterien konfrontiert.

11.2 Infektion

Die Harnblasen der Mäuse wurden *post-mortem* katheterisiert und die entsprechende Infektionsdosis in 50 µl Volumen in die Harnblase injiziert. Die Organe wurden außerhalb des Tierkörpers mittels Lebenserhaltungssystem am Leben erhalten (Wieser et al. 2011).

11.3 Auswertung

Vierundzwanzig Stunden nach der Infektion wurden die explantierten Blasen für die Analyse in 200 µl sterilem PBS mit 0,05% Tween85 (v/v) auf Eis überführt.

Alle Organe wurden gewogen und in der Organmühle (mit sterilen Edelstahlkugeln) zerkleinert. Das Homogenisat wurde abzentrifugiert, der Überstand vorsichtig abgezogen und zur Bestimmung von Zytokinen im -80°C-Gefrierschrank aufbewahrt.

12. Zytokinmessung der Organhomogenisate

Die Zytokinbestimmung aus den Homogenisaten der Mausblasen wurde mit dem BD CBA (*Cytometric Bead Array*) Mouse/Rat Kit durchgeführt. Der Bedienungsanleitung folgend wurde zunächst eine Standardkurve angelegt, die alle zu messenden Zytokine repräsentiert. In diesem Fall wurden 10 Zytokine erfasst: IFN γ , IL6, IL10, IL17, IL1 β , MCP1, MIP1a, MIP1 β , TNF α und KC. Alle ausgewählten Zytokine wurden aus den einzelnen, gefriergetrockneten Standards zusammenfügt. Nach Auflösung der Standards wurde einer Verdünnungsreihe bis 1:256 aufgestellt, die zusammen mit einer Negativkontrolle die Eichkurve aller Messungen bildete.

Für die Probenmessung sind zwei Reagenzien wichtig: Das Bindungsreagenz (*Capture Beads*) bindet spezifisch einzelne Zytokine mittels Bead-gebundener Antikörper und immobilisiert sie auf der Oberfläche. Das Detektionsreagenz (*Detection Reagent*) enthält einen Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt an einen zweiten Antikörper, der an den Zytokin-Beadkomplex an einer anderen Stelle bindet und im Durchflusszytometer als Fluoreszenzsignal erkannt werden kann. Beide wurden vom Hersteller in einer 50-fachen Konzentration geliefert und mussten vor dem Einsatz erst entsprechend verdünnt werden. Auch die Proben selbst wurden aufgrund von eventuell auftretenden Überlagerungseffekten durch hohe Proteinkonzentrationen in den Organhomogenisaten in einer 1:1 Verdünnung eingesetzt.

Jeweils 50 μ l der Probe wurde zunächst mit 50 μ l Bindungs- und anschließend mit 50 μ l Detektionsreagenz versetzt. Dabei wurden die Inkubationszeiten der einzelnen Reagenzien streng beachtet und die Probe abschließend von unspezifischen Bindungen und überschüssigen Reagenzien durch einen Waschschrift befreit. Zuletzt wurden die Proben mithilfe des Durchflusszytometers gemessen und die Daten unter Nutzung der FCAP Array Software (Soft Flow Inc, Ungarn) ausgewertet.

D Ergebnisse

1. Wachstumskurven

Ziel dieser Arbeit ist es, die OMV-Produktion ausgewählter *E. coli*-Stämme in verschiedenen Wachstumsphasen zu messen und zu vergleichen. Grundsätzlich zeigen Bakterien einen Wachstumszyklus bestehend aus vier Phasen, wie er in Abbildung 5 schematisch abgebildet ist.

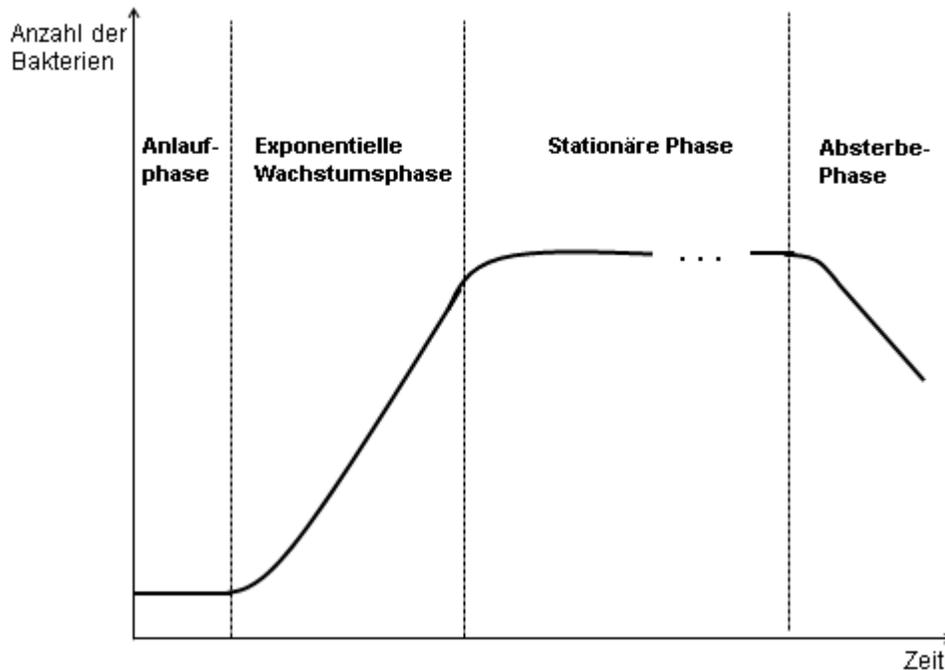


Abbildung 5: Schema einer bakteriellen Wachstumskurve

In der ersten Phase, der Anlauf- oder lag-Phase, gewöhnen sich die Bakterien an ihren neuen Lebensraum und regulieren ihren Stoffwechsel. Ist diese Anpassungsphase vorbei, beginnen die Bakterien damit sich zu teilen. Unter idealen Wachstumsbedingungen benötigt ein *E. coli*-Bakterium 20-35 Minuten, um aus einer Mutterzelle zwei gleichwertige Tochterzellen hervorzubringen, die sich ihrerseits anschließend auch teilen können. Somit steigt die Bakterienanzahl exponentiell an, weshalb diese Wachstumsphase auch exponentielle oder log-Phase genannt wird. Doch ein unbegrenztes Wachstum ist hierbei dauerhaft nicht möglich. Werden Lebensraum und Nährstoffe knapp, sind die Bakterien gezwungen, ihre Vermehrung zu drosseln. Sie gehen in die stationäre Phase über, die eine Phase des Gleichgewichts zwischen beginnendem Absterben und langsamerem Teilen der Bakterien darstellt. Der poststationäre Zyklusabschnitt wird auch als Absterbephase bezeichnet. Hier überwiegt in der Bakterienkultur

D Ergebnisse

aufgrund von Nährstoffmangel und angesammelten Stoffwechselendprodukten das Sterben der Bakterien gegenüber der Teilung.

1.1 Wachstumskurven in Vollmedium

Wenn sich auch der Ablauf des Wachstums gleicht, so variiert doch die Länge und Ausprägung der einzelnen Phasen. Um auch diskrete Unterschiede im Wachstumsverhalten der verwendeten *E. coli* aufzudecken, wurden von jedem Stamm unter jeweils gleichen Bedingungen Wachstumskurven angefertigt.

Die Ergebnisse sind in Abbildung 6 dargestellt. Hier sind alle drei *E. coli*-Gruppen gegeneinander aufgetragen. Dabei wurden die Stämme MG1655, DH5 α und Top10 als Vertreter der Laborstämme ausgewählt. Sie dienen als Referenzgruppe und gehören zu den am besten erforschten Mikroorganismen. Die zweite Gruppe fasst die intestinal pathogenen *E. coli* zusammen. Hier wurden zwei EPEC-Stämme, #4782 und #4786, untersucht. Der dritte Stellvertreter der intestinal Pathogenen ist Stamm #4559. Dieser Stamm ist ein enterotoxischer *E. coli*, dieser Pathotyp zeichnet sich durch die Freisetzung von Enterotoxinen im Dünndarm aus. Diese Enterotoxine steigern die Sekretion und lösen so einen wässrigen Durchfall aus (Kaper, Nataro und Mobley, 2004).

CFT073, UTI89 und 536 bilden die dritte Gruppe und stehen für die extraintestinal pathogenen *E. coli* (ExPEC). Alle drei Stämme gehören der größten Gruppe der ExPEC, den uropathogenen *E. coli* (UPEC) an, die vor allem unkomplizierte Harnwegsinfekte und akute Pyelonephritiden bis hin zur Urosepsis verursachen. Im Gegensatz zu den intestinal Pathogenen besiedeln UPEC in der Regel den Darm asymptomatisch (Johnson und Russo, 2002). Somit sind diese Stämme in der Lage, sowohl in den ableitenden Harnwegen als auch im Darmmilieu zu überleben. Daher ist anzunehmen, dass sich diese Stämme an recht unterschiedliche Lebensräume angepasst haben.

Auch scheinen sich die pathogenen *E. coli*-Stämme schneller an neue Umgebungsbedingungen anzupassen. Ihre lag-Phase ist kürzer und sie gehen schneller in die Phase des exponentiellen Wachstums über als die apathogenen Laborstämme. Auch die maximal erreichte Dichte der Laborstämme ist im Durchschnitt niedriger als die der pathogenen Organismen.

Eine Ausnahme bildet hier der K-12 *E. coli* MG1655 dessen Dichte mit rund 3,94 bei OD₆₀₀ der von pathogenen Stämmen ähnelt. Die beiden anderen Laborstämme erreichen lediglich eine durchschnittliche stationäre optische Dichte von 2,30 und 2,64.

D Ergebnisse

Sehr einheitlich verhalten sich die intestinal pathogenen Stämme #4559, #4782 und #4786, deren mittlere Dichtewerte in der stationären Phase von 4,50 bis 4,53 streuen. Hingegen bei den UPEC findet man in der stationären Phase OD_{600nm}-Werte von 3,74 vom CFT073 über 4,26 bei UT189 bis 4,79 für 536.

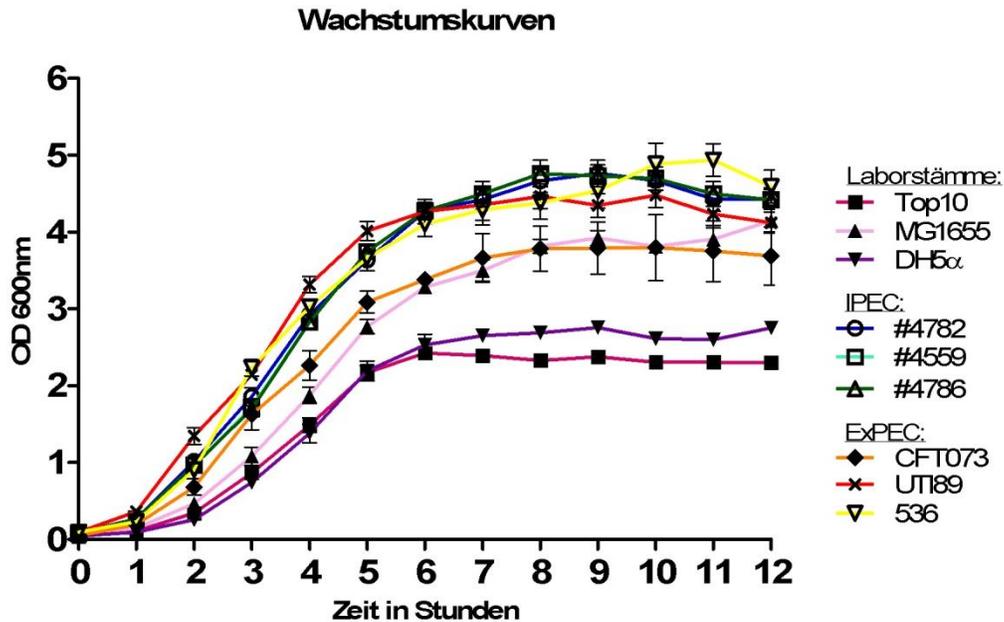


Abbildung 6: Darstellung der optischen Dichte der Bakterienkultur (MW \pm SEM) im Zeitraum 0-12 Stunden in reichem Nährmedium (LB-Medium) für alle untersuchten *E. coli*-Stämme

1.2 Wachstumskurven unter Stressbedingungen

Neben der Kultivierung in LB-Medium als reiches Vollmedium, wurden im weiteren Verlauf auch zwei andere Bedingungen getestet. Dabei sollten durch Eisenmangel und einen niedrigen pH-Wert des Mediums die Bakterien in einer Stresssituation kultiviert werden. In Abbildung 7 sind die Wachstumskurven aller untersuchten Bedingungen für jeden Stamm einzeln gegenübergestellt. Die Daten entstanden aus einer Messreihe mit drei unabhängigen Versuchen. In der Grafik sind die Mittelwerte aufgetragen, die Fehlerbalken repräsentieren den Standardfehler des Mittelwerts.

D Ergebnisse

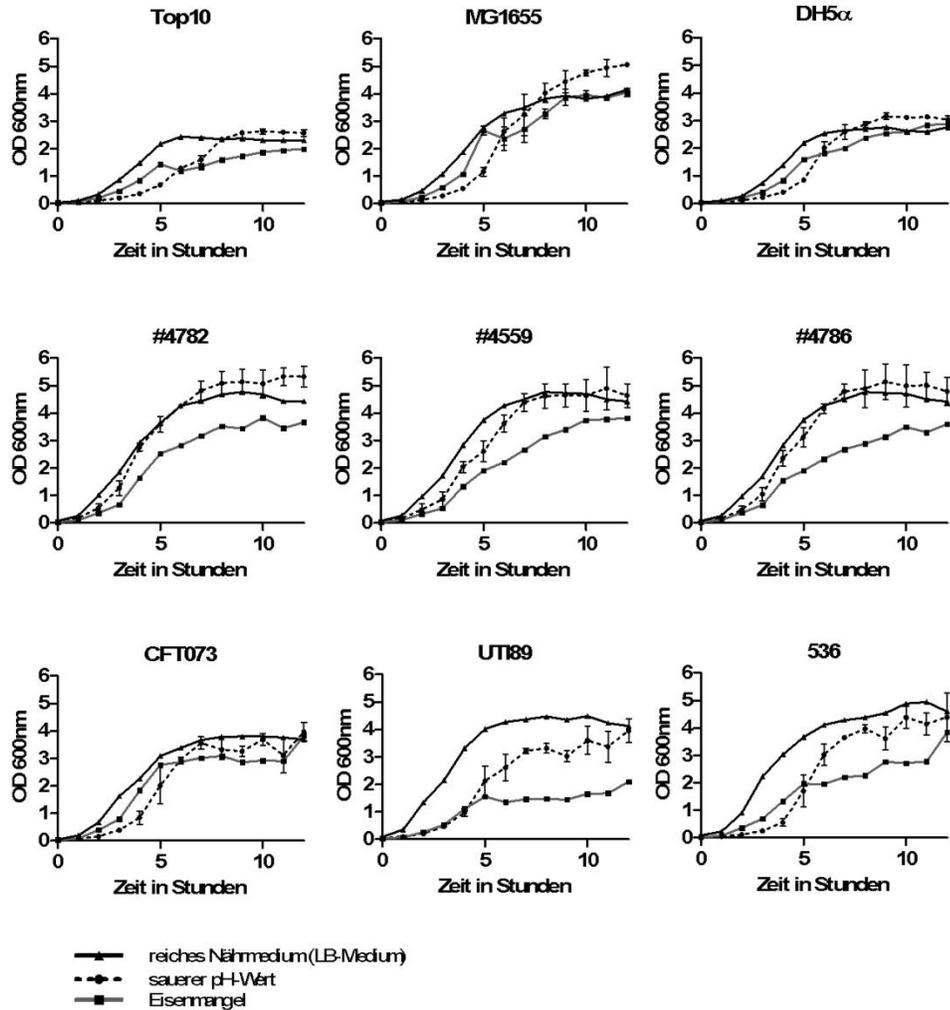


Abbildung 7: Stammspezifische Gegenüberstellung der optischen Dichte (MW \pm SD, n = 3) der Bakterienkultur mit den Bedingungen: reiches Nährmedium, angesäuertes Medium und Eisenmangel-Medium im Zeitverlauf von 0-12 Stunden

Dabei unterscheidet sich das Wachstumsverhalten der Erreger unter Stressbedingungen deutlich von dem in Vollmedium. Bei den beiden Stressbedingungen: saurer pH-Wert und Eisenmangel gehen die Stämme einheitlich später in die exponentielle Phase über. Daran lässt sich erkennen, dass die Bakterien unter den Stressbedingungen eine größere Zeitspanne zur Anpassung benötigen.

Für die Laborstämme gilt, dass sie besonders in saurem Medium lange benötigen, um in die Phase des exponentiellen Wachstums überzugehen. Doch einmal an die Bedingung angepasst, erreichen sie in der stationären Phase eine höhere optische Dichte als in reichem Vollmedium. Besonders ausgeprägt ist dieser Effekt beim Stamm MG1655, dessen mittlere optische Dichte in

D Ergebnisse

angesäuertem Medium in der stationären Phase bei 4,92 liegt. Eine MG1655-Kultur in neutralem LB-Medium erreicht zum gleichen Zeitpunkt nur eine mittlere OD₆₀₀ von 3,94.

Tabelle 3: Vergleich der OD-Werte (MW; +/- SD in Klammern) in der stationären Phase (* = p ≤ 0,05, ** = p ≤ 0,01, *** = p ≤ 0,001)

Stamm	LB-Medium	Eisenmangel	Eisenmangel vs. LB-Medium (p-Wert)		Saurer pH		Saurer pH vs. LB-Medium (p-Wert)	
Top10	2,305 (0,086)	1,931 (0,092)	< 0.0001	***	2,598 (0,083)	< 0.0001	***	
MG1655	3,943 (0,287)	3,946 (0,141)	0,9789		4,917 (0,210)	< 0.0001	***	
DH5α	2,645 (0,116)	2,762 (0,245)	0,2109		3,09 (0,099)	< 0.0001	***	
#4782	4,496 (0,397)	3,647 (0,309)	< 0.0001	***	5,237 (0,379)	< 0.0001	***	
#4559	4,525 (0,442)	3,774 (0,379)	< 0.0001	***	4,72 (0,550)	0,2998		
#4786	4,525 (0,442)	3,466 (0,352)	< 0.0001	***	4,924 (0,533)	0,0366	*	
CFT073	3,742 (0,763)	3,219 (0,674)	0,1136		3,587 (0,535)	0,6056		
UTI89	4,258 (0,432)	1,811 (0,512)	< 0.0001	***	3,639 (0,504)	0,0013	**	
536	4,79 (0,661)	3,113 (0,569)	< 0.0001	***	4,301 (0,542)	0,0568		

Die Wachstumskurven der intestinal pathogenen *E. coli*-Stämme unter Eisenmangel und in saurem Milieu unterscheiden sich analog zu den Wachstumskurven in reichem Nährmedium nur gering voneinander. Unter sauren Bedingungen wachsen sie nach der Akklimatisierungsphase in der exponentiellen Phase zu einer optisch dichteren Kultur heran als die Referenzkulturen in Vollmedium. Im Hinblick auf das angestammte Infektionsgebiet der eingesetzten IPEC, sprich den Dünndarm, in dem ein leicht basischer pH von durchschnittlich 7,3 (Evans et al., 1988) vorliegt, überrascht dieses Ergebnis.

Anders sieht es unter Eisenmangel-Bedingung aus, hier ist das Wachstum der intestinal pathogenen Stämme stärker beeinträchtigt. Das ist deutlich erkennbar am geringen Anstieg in der exponentiellen Phase und der verringerten maximalen Dichte. Deutlich wird diese Entwicklung in Tabelle 3. Hier sind die mittleren optischen Dichte-Werte aller Stämme in der stationären Phase nach Bedingungen aufgelistet. Darüber hinaus wurden die Stressbedingungen gegen das reiche LB-Medium auf bestehende signifikante Unterschiede getestet. Alle untersuchten intestinal pathogenen Stämme zeigten einen signifikanten Wachstumsnachteil im Eisenmangelmedium, aber auch die uropathogenen Stämme reagieren empfindlich auf den Mangel an essenziellem Eisen. Insbesondere das Wachstum von UTI89 wird durch den Eisenmangel stark erschwert.

Die Gruppe der extraintestinal pathogenen *E. coli* infiziert häufig den Urogenitaltrakt, wo sie mit dem sauren Urin in Kontakt kommen und entsprechend angepasst sind. Deswegen wurde im

D Ergebnisse

Vergleich zu den beiden anderen beobachteten Gruppen auch ein niedrigerer pH-Wert verwendet. Es wurde experimentell in Vorversuchen ein Medium mit einem pH-Wert von 4,5 identifiziert, das als Stressor wirken konnte. Da ein höherer pH-Wert nicht ausreichend Druck auf die Uropathogenen ausgeübt hatte, denn das Wachstum war kaum beeinflusst. Bei einem pH-Wert von 4,5 zeigten sich besonders bei den Stämmen UTI89 und 536 Wachstumsnachteile im Vergleich zu neutralem LB-Medium, im Fall des UTI89 ist dieser sogar signifikant.

1.3 *Bestimmung der koloniebildenden Einheiten*

Neben der Möglichkeit die Wachstumskurven der einzelnen Stämme mithilfe der optischen Dichte zu erheben, besteht auch die Möglichkeit die Anzahl der koloniebildenden Einheiten (KbE) im Wachstumsverlauf zu bestimmen. In dieser Arbeit wurden beide Methoden durchgeführt, die optische Dichte im Wachstumsverlauf gemessen und anschließend die Anzahl der koloniebildenden Einheiten ermittelt. Dafür wurden Verdünnungsstufen der Bakterienkultur erstellt und auf Müller-Hinton-Agar-Platten ausplattiert. Die Platten wurden über Nacht im Brutschrank inkubiert und anschließend die Einzelkolonien auf den Platten ausgezählt. Die ermittelte Keimzahl wurde der optischen Dichte gegenübergestellt. Es wurden für jeden Stamm im Verlauf der Wachstumskurve mehrere Datenpaare erhoben, mit denen eine Korrelation ermittelt werden konnte.

Bei drei Stämmen #4786, DH5 α und MG1655, konnte mit dem methodischen Ansatz zunächst nur eine unzureichende Korrelation erreicht werden. Außerdem zeigten die Kolonien auf den Agarplatten ein konfluierendes und streuendes Wachstum. Möglicherweise störten verklumpende Erreger die Verdünnungsreihe und führten zu einer falsch niedrigen Anzahl an koloniebildenden Einheiten. Deshalb wurde die Bestimmung der Keimzahl wiederholt, wobei in den Verdünnungsreihen dem PBS 0,01 % v/v Tween 20 zugesetzt wurde. Während die mit Tween bestimmten Datenpaare der anderen Stämme vergleichbar zu denen ohne Detergenz waren, zeigten die Stämme #4786, DH5 α und MG1655 ohne die bakteriellen Klumpen einen korrekten Anstieg der KbE, insbesondere bei höheren OD-Werten, weshalb nur diese Werte für die weitere Auswertung herangezogen wurden.

1.4 *Korrelation optische Dichte-koloniebildende Einheiten*

Nach Erhebung einer ausreichenden Anzahl an Datenpaaren im Wachstumskurvenverlauf war es möglich, eine OD-KbE-Korrelation aufzustellen. Dabei wurde eine lineare Korrelation beider

D Ergebnisse

Messwerte beobachtet und die entsprechenden Formeln ermittelt. Die OD-KbE-Korrelationen sind der Tabelle 4 zu entnehmen.

Tabelle 4: OD₆₀₀-KbE- Korrelationen für die untersuchten Stämme

Stamm	OD-KbE-Korrelation
Top10	$\text{KbE}/\mu\text{l} = 923.126,45 \times \text{OD}_{600}$
MG1655	$\text{KbE}/\mu\text{l} = 1.338.528,14 \times \text{OD}_{600}$
DH5 α	$\text{KbE}/\mu\text{l} = 601.875,17 \times \text{OD}_{600}$
#4782	$\text{KbE}/\mu\text{l} = 470.415,60 \times \text{OD}_{600}$
#4559	$\text{KbE}/\mu\text{l} = 494.282,34 \times \text{OD}_{600}$
#4786	$\text{KbE}/\mu\text{l} = 1.723.627,47 \times \text{OD}_{600}$
CFT073	$\text{KbE}/\mu\text{l} = 412.110,40 \times \text{OD}_{600}$
UTI89	$\text{KbE}/\mu\text{l} = 620.576,08 \times \text{OD}_{600}$
536	$\text{KbE}/\mu\text{l} = 572.684,37 \times \text{OD}_{600}$

Diese aufgestellten Formeln erlaubten es im Arbeitsablauf die zeitsparende Variante der OD₆₀₀-Bestimmung anzuwenden und gleichzeitig Informationen über die Anzahl der koloniebildenden Einheiten zu erhalten. Durch die Bestimmung der OD₆₀₀-Werte am Anfang und am Ende des beobachteten Zeitabschnitts ließ sich nachträglich aufstellen, in welchem Bereich der Wachstumskurve sich diese Kultur genau befindet und welche Bakterienanzahl zu erwarten ist. Dabei entspricht der Bereich unter der aufgestellten Wachstumskurve dem Integral der Bakterienanzahl nach der Zeit, also der bakteriellen Lebenszeit, angegeben in bakterieller Minute oder bakterieller Stunde. Für die Messung der Vesikelproduktion wurde die bakterielle Stunde verwendet, was einem bakteriellen Äquivalent entspricht, das eine Stunde lang lebt. Das Prinzip ist in Abbildung 8 grafisch veranschaulicht. Dabei erlaubte die Einheit im weiteren Verlauf die Berechnung der Vesikelproduktion in einzelnen Wachstumsphasen und den Vergleich zwischen verschiedenen Wachstumsbedingungen.

D Ergebnisse

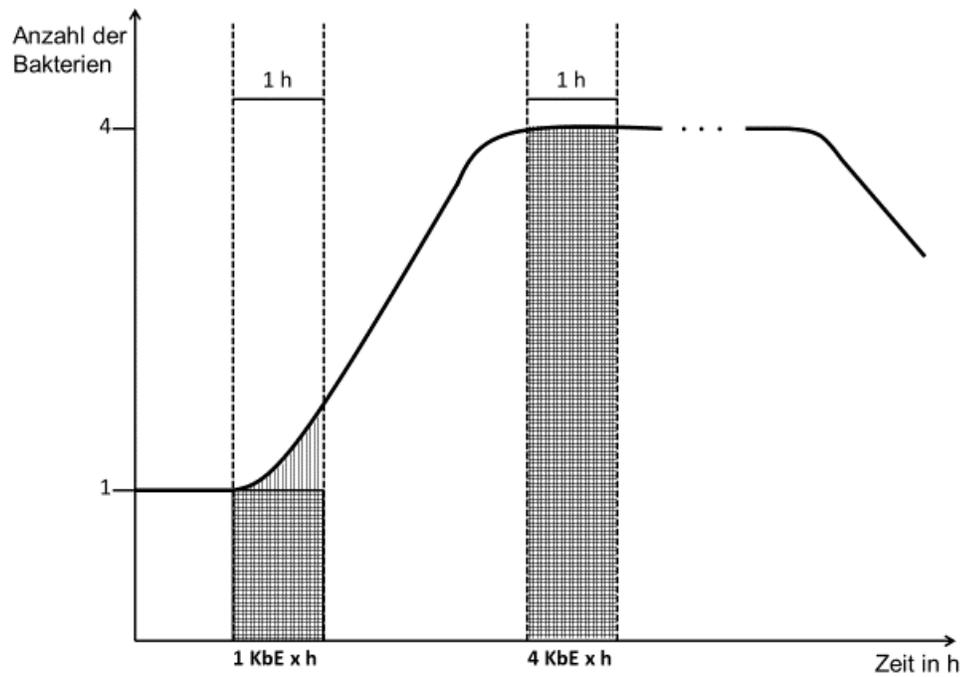


Abbildung 8: Schematische Wachstumskurve zur Veranschaulichung der bakteriellen Lebenszeit (vertikal gestreift) mit exemplarischer Darstellung der Maßeinheit bakterielle Stunde (KbE x h, horizontal gestreift) in der exponentiellen Wachstumsphase (links) und der stationären Wachstumsphase (rechts)

2. Vesikelquantifizierung mittels Durchflusszytometrie

2.1 *Probenentnahme und –aufbereitung*

Die Methode der Vesikelquantifizierung mittels Durchflusszytometrie erlaubt die Messung im Überstand der Bakterienkultur ohne zusätzlichen Waschschrift. Für die Quantifizierung der Vesikel wurde die Bakterienkultur in steril filtriertem (0,22 µm) LB-Flüssigmedium angesetzt. Die Probengewinnung erfolgte über die Entnahme von 15 ml Flüssigkultur, welche anschließend bei 10397 g, 30 min bei 4°C zentrifugiert wurde. In der Zentrifuge werden die Bestandteile mit höherer Dichte, also die Bakterien, vom Überstand abgetrennt. Die Vesikel sind aufgrund ihrer geringen Masse weiterhin annähernd gleichmäßig im gesamten Probenvolumen zu finden. Deshalb wurden dem Überstand 5 ml entnommen und durch kühles Lagern und die Zugabe von 8 µl Gentamicin (100 mg/dl) vor sekundärer bakterieller Verunreinigung geschützt. Der Antibiotikazusatz hemmt zuverlässig die sekundäre Vermehrung Gentamicin-empfindlicher Stämme und somit die nachträgliche Vesikelbildung. Zum nächstmöglichen Zeitpunkt, nicht später als 36 Stunden nach Entnahme, wurde dann die Quantifizierung der Vesikel durchgeführt.

2.2 *Durchflusszytometrie*

Das allgemeine Funktionsprinzip eines Durchflusszytometers wurde bereits im Methodenteil beschrieben. Bei der konventionellen Durchflusszytometrie müssen die zu messenden Partikel größer als die Wellenlänge des verwendeten Lichts sein. Nur so ist eine Lichtstreuung und damit eine Detektion eines Partikels (*event*) in der Messkammer möglich. Bei der Quantifizierung der *outer membrane vesicles* mit Hilfe eines Durchflusszytometers kamen deswegen Fluoreszenzfarbstoffe zum Einsatz, da die Größe der OMV im Bereich zwischen 50 und 250 nm, also unter der Wellenlänge des sichtbaren Lichtes liegt.

Eine Fluoreszenz entsteht, wenn ein Farbstoff Energie aufnimmt, zum Beispiel durch die Absorption von Photonen, seine Valenzelektronen auf ein höheres Energieniveau gehoben werden, von welchem sie unter Energieabgabe in Form von Licht wieder in das Grundniveau zurückfallen. Das dabei ausgesendete Licht strahlt in alle Raumrichtungen und trifft auch auf die Detektoren, die in 90° Stellung zur Einstrahlrichtung des Lasers angebracht sind.

Mit Fluoreszenzfarbstoffen markierte Partikel, können folglich anhand ihrer Fluoreszenz auch im Durchflusszytometer erkannt werden, wenn ihre Größe geringer ist als die eingesetzte Lichtwellenlänge.

D Ergebnisse

Aufgrund ihrer Größe und der damit verbundenen geringen Bindungsfläche des Farbstoffes ist das zu erwartende Signal jedoch sehr schwach. Aus diesem Grund wurde zur Optimierung der Signalerkennung nach Absprache mit dem technischen Dienst des Geräteherstellers, eine kleine Veränderung im Spiegelsystem vorgenommen, um die Fluoreszenz ohne unnötige Energieverluste in einen der ersten Photoelektronenvervielfacher zu leiten (Wieser et al., 2014).

Um das Auftreten von unspezifischen Signalen im Durchflusszytometer zu verringern, wurde für die Probenvorbereitung 0,22 µm steril filtriertes LB-Medium verwendet. Außerdem wurde vor Beginn jeder Messung das Durchflusszytometer mit DPBS durchgespült, um es von störenden Dreckpartikeln zu befreien. Die zu untersuchende Probe wurde direkt vor der Messung für 5 Sekunden erneut mittels Tischmixers gemischt, danach eingespannt und die Messung begonnen. Die Aufzeichnung wurde dabei erst nach 15 Sekunden gestartet, da erst zu diesem Zeitpunkt eine stabile Flussrate vorliegt (Wieser et al., 2014).

Gemessen wurde die Vesikelkonzentration der Probe in Triplikaten bei mittlerer Flussrate für 1 Minute. Zwischen den einzelnen Messungen wurde die Probe erneut 5 Sekunden gemischt und vor dem Wechsel zu einer anderen Probe das System gespült.

3. Vesikelkonzentration von Bakterienkulturen

Bis jetzt war es aufgrund des Fehlens einer geeigneten Methode nicht möglich, die Vesikelkonzentration in einer Probe zu quantifizieren. Alle bis dahin erhobenen Daten basierten auf der Quantifizierung von Membrankomponenten. Diese Methode birgt ein hohes Fehlerpotential durch verfälschte Werte aufgrund von ungleichen oder inhomogenen Vesikelpopulationen und Verunreinigungen durch nicht-vesikelassoziierte bakterielle Bestandteile. Dementsprechend liegen keine Informationen über die Vesikelkonzentration im Überstand der Bakterienkultur vor. Dank der Entwicklung des durchflusszytometrischen Verfahrens in der Arbeitsgruppe ist es nun möglich, die OMV schnell und effizient zu quantifizieren.

3.1 Vesikelquantifizierung in ausgewählten Wachstumsphasen

3.1.1 Phase des exponentiellen Wachstums

Durch die Wachstumskurven wurden die günstigen Zeiträume für die vergleichende Messung der Vesikelkonzentration in verschiedenen Wachstumsphasen bestimmt. Nach 4 Stunden Inkubation befanden sich alle untersuchten *E. coli*-Stämme in etwa in der Mitte der Phase des exponentiellen Wachstums. Der Vesikelgehalt dieses durch exponentielle Teilung geprägten Abschnitts sollte bestimmt und zwischen den Stämmen verglichen werden. Im zweiten Ansatz sollten die OMV-Produktionsraten der stationären Phase bestimmt und mit den Vorwerten verglichen werden. Aus diesem Grund wurden Probeentnahmezeiten nach 4 Stunden für die exponentielle Wachstumsphase und nach 11 Stunden für die stationäre Phase festgelegt.

Aus einer Übernacht-Kultur wurde in steril filtriertem LB-Flüssigmedium eine Bakterienkultur angelegt und bei 37 °C und gleichmäßigen Schüttelbewegungen inkubiert. Unter diesen, für *E. coli* günstigen Wachstumsbedingungen, wurden nach 4 und 11 Stunden Proben für die Bestimmung der Vesikelkonzentration entnommen.

Abbildung 9 macht deutlich, dass sich der gemessene Vesikelgehalt bereits gruppenintern deutlich variiert. So besitzt der Stamm DH5 α eine signifikant erhöhte Vesikelkonzentration im Vergleich zu den beiden anderen Vertretern der Laborstämme. Außerdem lag der gemessene Vesikelgehalt des DH5 α signifikant über der des intestinal pathogenen Stammes #4782. Bei Vernachlässigung des Messergebnisses des DH5 α , zeigte sich bei den pathogenen *E. coli* im Mittel nach 4 Stunden Wachstum eine höhere Vesikelkonzentration als bei den apathogenen Stämmen.

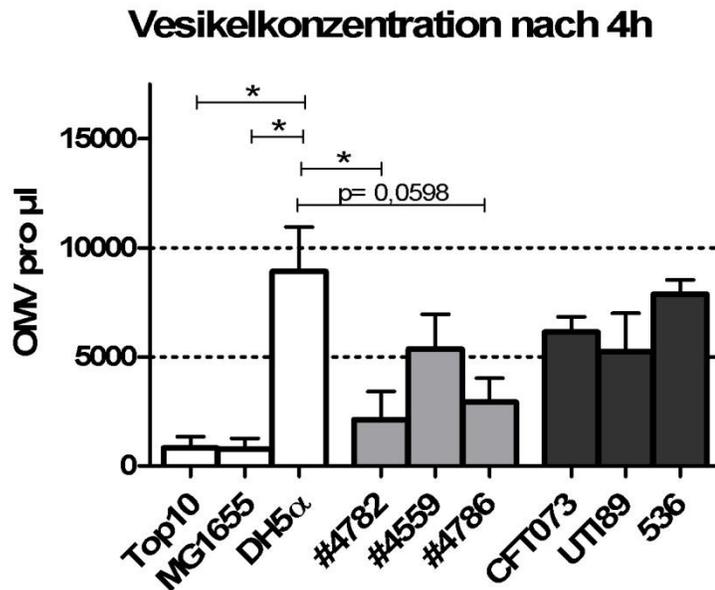


Abbildung 9: Vesikelkonzentration (MW +/- SEM, n = 3) von *E. coli*-Kulturen in reichem Nährmedium (LB-Medium) nach 4 Stunden Wachstum unter idealen Wachstumsbedingungen (* = $p \leq 0,05$, nicht signifikante Vergleiche nicht eingetragen)

3.1.2 Stationäre Phase

Die zweite Probe wurde in der stationären Phase nach 11 Stunden Wachstum entnommen und Abbildung 10 visualisiert die Vesikelkonzentrationen der untersuchten Stämme. Auch hier ist die mittlere OMV-Konzentration im Kulturüberstand des DH5α höher als bei den beiden anderen Laborstämmen. Auffällig ist, dass bei DH5α die Messwerte zwischen rund 2.000 und 22.000 Vesikel pro µl Bakterienkultur schwankten. Dabei korreliert die gemessene Vesikelmenge nicht streng mit der bakteriellen Dichte, also der Anzahl der vesikelproduzierenden Bakterien. Zudem wurden nur drei Wiederholungen durchgeführt, was zu einer großen Standardabweichung mit entsprechend hohem Standardfehler führte, wie Abbildung 10 zeigt. Trotzdem ermöglicht dieser Versuchsansatz, eine grobe Vorstellung über den Vesikelgehalt einer Bakterienkultur zu erhalten.

Bei den pathogenen Stämmen konnten erneut in der Gruppe der extraintestinal pathogenen *E. coli* keine signifikanten Unterschiede zwischen den Vesikelkonzentrationen der einzelnen Stämme festgestellt werden. Bei den intestinal pathogenen *E. coli* hingegen lag der Vesikelgehalt des EPEC #4782 signifikant über dem der beiden anderen Stämme. Bei diesen beiden anderen Vertretern der intestinal pathogenen *E. coli* wurden nur mittlere Vesikelkonzentrationen von rund 760 für den #4786 bzw. 1.000 OMV pro µl Kultur bei dem #4559 verzeichnet. Damit liegt ihre mittlere Vesikelkonzentration in der stationären Phase unter

D Ergebnisse

dem nach 4 Stunden bestimmten Wert, denn hier wurden mittlere Vesikelkonzentrationen von gerundet 2.900 bis 5.400 Vesikel pro μl Kulturüberstand gemessen. Das würde bedeuten, dass die Vesikelkonzentration dieser Stämme im Rahmen des Wachstumskurvenverlaufs abgenommen hat.

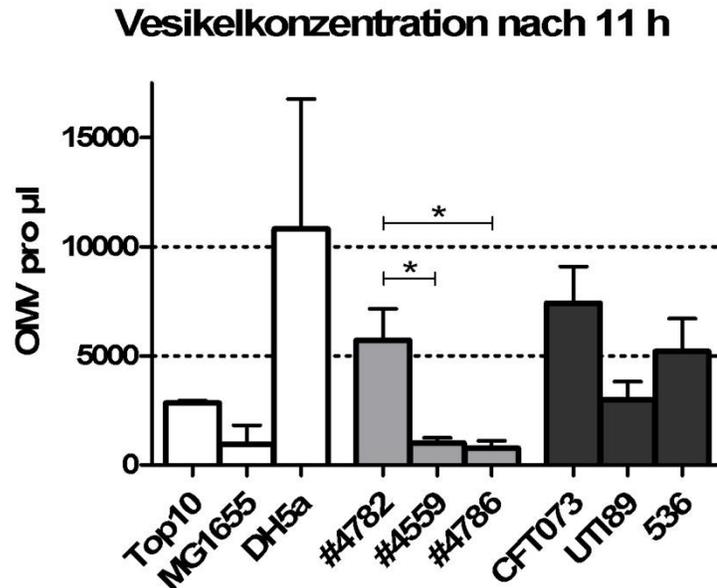


Abbildung 10: Vesikelkonzentration (MW \pm SEM, n = 3) von *E. coli*-Kulturen in reichem Nährmedium (LB-Medium) nach 11 Stunden Wachstum unter idealen Bedingungen (* = $p \leq 0,05$, nicht signifikante Vergleiche nicht eingetragen)

Um diesem Ergebnis nachzugehen, wurden die Messdaten der Vesikelkonzentrationen neu aufbereitet. Es wurde von jedem Versuch der Quotient aus dem 11 Stunden-Wert und dem 4 Stunden-Wert gebildet und diese Quotienten in Abbildung 11 aufgetragen.

In Abbildung 11 entspricht ein Wert von 1 keiner Änderung der Vesikelkonzentration im Verlauf der Wachstumskurve. Wohingegen ein Wert >1 eine Akkumulation der Vesikel in der stationären Phase anzeigt und ein Wert <1 auf eine Abnahme des Vesikel im Überstand hindeutet. Betrachtet man die Grafik, so fällt auf, dass sich die Stämme in ihrem Verhalten stark unterscheiden. Es gibt zwei Stämme, deren Vesikelgehalt in der stationären Phase in allen Messungen im Vergleich zur Phase des exponentiellen Wachstums höher war und ihre Quotienten damit immer größer als 1 sind. Somit zeigen der Laborstamm Top10 und der intestinal pathogene *E. coli* #4782 eine deutliche Vesikelakkumulation im Verlauf der Wachstumskurve.

Vergleich OMV-Konzentration

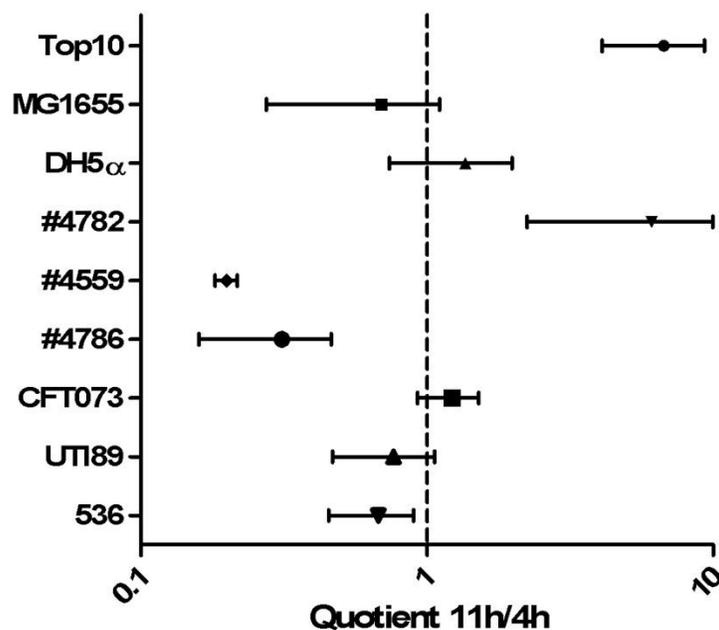


Abbildung 11: Dargestellt ist der Quotient (MW \pm SEM) aus der Vesikelkonzentration einer Bakterienkultur nach 11 Stunden dividiert durch den Wert nach 4 Stunden

Dabei ist interessant, dass die beiden anderen intestinal pathogenen Stämme, trotz nahezu identischer optischer Dichte im Beobachtungszeitraum und enger genetischer Verwandtschaft den höchsten Vesikelgehalt in der exponentiellen Wachstumsphase aufweisen und im stationären Wachstum nur noch einen Bruchteil der Vesikel im Kulturüberstand zeigen. Da die Quotienten aus den Messwerten einer Kultur in ihrem Wachstumsverlauf erhoben wurden, muss es zwischen 4 und 11 Stunden zu einer Abnahme der Vesikelkonzentration im Medium bei gleichzeitiger Zunahme der bakteriellen Masse gekommen sein.

Der Versuch verdeutlicht, dass sich der Vesikelgehalt in einer Bakterienkultur im Laufe des Wachstums unterschiedlich verändern kann. Die Ergebnisse geben Hinweise darauf, dass eine Wiederaufnahme von Vesikel in die bakteriellen Zellen im Laufe des Wachstums möglich sein muss, um die für die einzelnen Stämme gemessenen Vesikelkonzentrationen zu erreichen. Da sich dieses Experiment ausschließlich mit der Vesikelkonzentration im Überstand zu verschiedenen Zeitpunkten beschäftigt, lässt sich so leider keinerlei Aussage über die Produktionsrate der Vesikel ableiten. Um der Frage nach der Vesikelbildungsrate der einzelnen Stämme nachzugehen, wurden die folgenden Versuche durchgeführt (siehe D Ergebnisse, 4. Vesikelproduktion in der Phase des exponentiellen Wachstums).

4. Vesikelproduktion in der Phase des exponentiellen Wachstums

4.1 *Probenvorbereitung*

Für die Ermittlung der Produktionsrate war es notwendig, einen Ausgangs- und Endwert zu messen. Deshalb wurde zu Beginn des Beobachtungszeitraums ein Waschschrift eingefügt, bei dem das Kulturmedium gegen frisches filtriertes Medium ausgetauscht, und somit der Vesikelgehalt im Medium der Kultur auf null gesetzt wurde. Dazu wurde nach 3 Stunden Inkubationszeit unter 400 rpm, 37°C die Bakterienkultur mit 397g für 12 min bei 4°C zentrifugiert. Durch die Zentrifugation wurden die Bakterien abgetrennt und der vesikelhaltige Überstand verworfen. Anschließend wurden die Bakterien in 37°C warmem, steril filtriertem (0,22 µm) LB-Flüssigmedium der entsprechenden Bedingung rückgelöst und weiter inkubiert.

Nach Zugabe des vesikelfreien neuen Mediums ist ein Nullwert geschaffen, der es ermöglicht die Neuproduktion zu ermitteln. Hierfür wurden nach zwei weiteren Stunden Proben zur Bestimmung der Vesikelkonzentration entnommen und nach beschriebenem Schema (siehe 4.3) aufbereitet.

Wie bereits erwähnt, sollte die Vesikelproduktion auf die Einheit der individuellen bakteriellen Lebenszeit bezogen werden. Hierfür ist es notwendig zu wissen, wie viele Bakterien sich im Beobachtungszeitraum in der Kultur befinden. Dafür wurde am Anfang und am Ende des Abschnittes die optische Dichte der Kultur bestimmt und anschließend auf Grundlage der OD-Keimzahl-Korrelation der Verlauf der bakteriellen Keimzahl hochgerechnet. Entsprechend der Anzahl der koloniebildenden Einheiten (KbE) im Wachstumskurvenverlauf integriert über den Beobachtungszeitraum konnte die bakterielle Lebenszeit für besagten Zeitraum berechnet werden. Als Maßeinheit wurde hier die bakterielle Stunde verwendet, was einer Stunde Lebenszeit eines bakteriellen Äquivalentes entspricht (siehe D Ergebnisse, 1.4 Korrelation optische Dichte-koloniebildende Einheiten).

4.2 *Vesikelproduktion in reichem Nährmedium*

Zunächst wurde die Vesikelbildungsrate in guten Wachstumsbedingungen untersucht. Alle Bakterienkulturen wurden in reichem Nährmedium (LB-Medium) angesetzt und die Proben entsprechend des Protokolls vorbereitet.

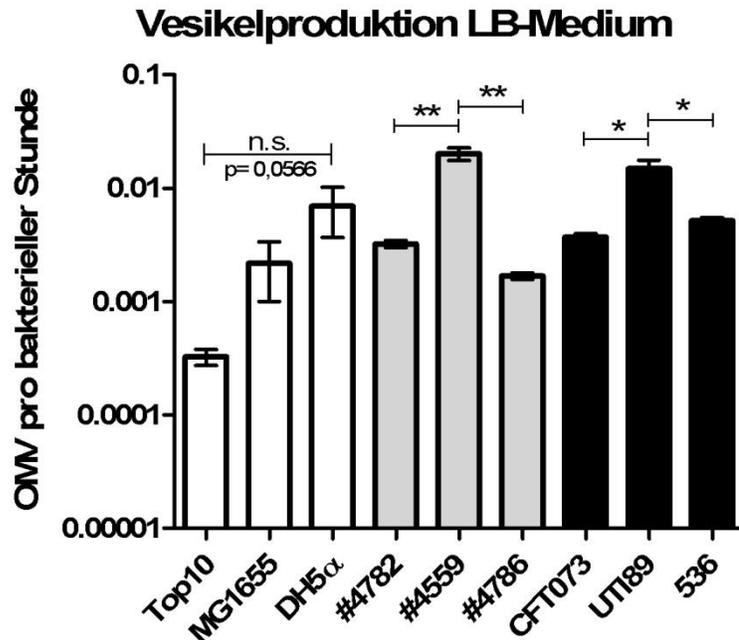


Abbildung 12: Vesikelproduktionsraten (MW +/- SEM, n = 4-10) aller untersuchter *E. coli*-Stämme in reichem Nährmedium (LB-Medium) in der Phase des exponentiellen Wachstums (* = $p \leq 0,05$, ** = $p \leq 0,01$)

Die Abbildung 12 stellt die Vesikelproduktionsraten, pro bakterielle Stunde (KbE x h), aller 9 untersuchten Stämme vergleichend gegenüber. Zunächst fällt auf, dass die Produktion überraschend niedrig ist. Die niedrigste, gemessene Produktionsrate liegt bei $0,33 \times 10^{-3}$ OMV/KbE x h für den Top10, während der #4559 die höchste Vesikelproduktion mit $20,1 \times 10^{-3}$ OMV/KbE x h besitzt. Umgerechnet bedeutet es, dass 10.000 Bakterien des Stammes Top10 innerhalb 1 Stunde in der Phase des exponentiellen Wachstums ca. 3 Vesikel bilden. Beobachtet man 10.000 Bakterien des Stammes #4559 so werden in derselben Zeit rund 201 frei im Medium messbare Vesikel produziert.

Durch dieses Rechenbeispiel wird gezeigt, dass es innerhalb der untersuchten *E. coli*-Stämme deutliche Unterschiede (ca. zwei Größenordnungen) in der Vesikelproduktion gibt. Nicht nur zwischen den einzelnen Stämmen, sondern auch innerhalb einer *E. coli*-Gruppe gibt es signifikante Unterschiede in den Produktionsraten. Abbildung 12 enthält auch die Ergebnisse der Testung des Signifikanzniveaus. Hier zeigt der Vergleich der Gruppen der intestinal und extraintestinal pathogenen *E. coli*, dass sich trotz hoher genetischer Kongruenzen und einheitlichen Wachstumsbedingungen die Vesikelproduktion signifikant unterscheidet.

4.3 Vesikelproduktion unter Stressbedingung

Neben der Produktionsrate unter guten Wachstumsbedingungen in reichem LB-Flüssignährmedium sollte auch die Vesikelbildung unter Stress untersucht werden. Hierfür wurden die Bedingungen saurer pH-Wert und Eisenmangel mit ihren Auswirkungen auf die Vesikelbildung erforscht. Beide untersuchten Bedingungen repräsentieren Zustände wie sie Bakterien im Rahmen einer Infektion im Wirt vorfinden können. Damit verfügen die Ergebnisse über eine gewisse Aussagekraft in Bezug auf die Beeinflussung der Vesikelproduktion durch das Wirtsmilieu.

Die Abbildung 13 bis 15 stellen die mittleren Produktionsraten der einzelnen *E. coli*-Gruppen unter den drei untersuchten Bedingungen dar. Die Vesikelproduktion wird dabei durch die Wachstumsbedingungen deutlich beeinflusst.

4.3.1 Laborstämme

Abbildung 13 stellt die Vesikelbildungsraten der Laborstämme gegenüber. Es ist deutlich zu erkennen, wie unterschiedlich die Laborstämme auf die Stressoren reagieren. Der Stamm Top10 beispielsweise reagiert auf den sauren pH-Wert des Mediums mit einer gesteigerten Vesikelproduktionsrate. Ein ähnliches Verhalten wurde auch beim Laborstamm DH5 α beobachtet, wohingegen MG1655 im sauren Milieu seine Vesikelproduktion reduziert. So wurden von 100.000 MG1655-Bakterien innerhalb einer Stunde Wachstum in Medium mit saurem pH-Wert nur 36 Vesikel gebildet. Im Vergleich dazu lag der Wert unter idealen Wachstumsbedingungen bei rund 218 produzierten Vesikel. Das entspricht einer Abnahme der mittleren Produktion um den Faktor 6.

Für die Bedingung Eisenmangel reagieren die Laborstämme ähnlich uneinheitlich wie im sauren Medium. Auch hier führen die veränderten Umgebungsbedingungen beim Top10 zu einer gesteigerten Vesikelproduktion. Der DH5 α hält seine Produktionsrate nahezu stabil, während der MG1655 noch weniger Vesikel bildet wie unter sauren Bedingungen. Hunderttausend MG1655 Bakterien produzieren in einer Stunde Wachstum in eisenarmer Umgebung statistisch gesehen nur 5,6 Vesikel. Damit bildet er unter Eisenmangel gerade einmal 2,6% von seiner mittleren Vesikelproduktion unter optimalen Wachstumsbedingungen.

Es lässt sich also für die Laborstämme zusammenfassend feststellen, dass der Top10 auf die getesteten Stresssituationen mit einer gesteigerten Vesikelproduktion reagiert. Sein Verwandter der MG1655 drosselt unter den gleichen Bedingungen seine Produktionsrate, während der DH5 α seine Produktion unter allen getesteten Bedingungen annähernd konstant hält.

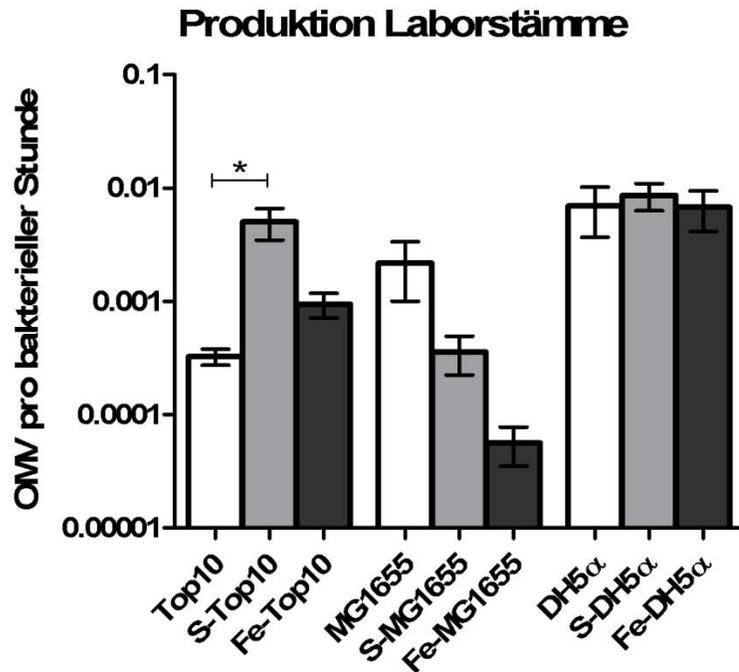


Abbildung 13: Übersicht der Vesikelproduktion (MW +/- SEM, n = 4-10) in der Phase des exponentiellen Wachstums für die Laborstämme für die Bedingung reiches Nährmedium (weiß), saurer pH-Wert (grau) und Eisenmangel (schwarz); * = $p \leq 0,05$, nicht signifikante Vergleiche wurden nicht eingetragen

4.3.2 Intestinal pathogene *E. coli*

Auch die Vesikelproduktion der darmpathogenen *E. coli* wurde unter den genannten Stressbedingungen untersucht und das Ergebnis grafisch in Abbildung 14 dargestellt. Vergleicht man die Vesikelproduktion der Stämme unter idealen Wachstumsbedingungen mit der in saurem Medium, so zeichnet sich für die Stämme #4782 und #4786 eine Tendenz zur Produktionssteigerung ab. Die hier erhobenen Mittelwerte sind größer als die mittlere Vesikelproduktion in reichem Nährmedium (LB-Medium), jedoch ohne statistische Signifikanz. Während der Stressor niedriger pH-Wert bei den beiden EPEC-Stämmen die Vesikelbildung zu stimulieren scheint, reagiert der enterotoxische *E. coli* #4559 mit einer verringerten Bildungsrate. Dabei unterscheiden sich seine Produktionsraten unter idealen Wachstumsbedingungen und unter dem Einfluss des sauren Milieus signifikant. Im Vergleich zum sauren pH-Wert verursacht Eisenmangel bei jedem der drei IPEC eine verstärkte Vesikelbildung. Für den EPEC #4786 konnte sogar ein signifikantes Ergebnis verzeichnet werden.

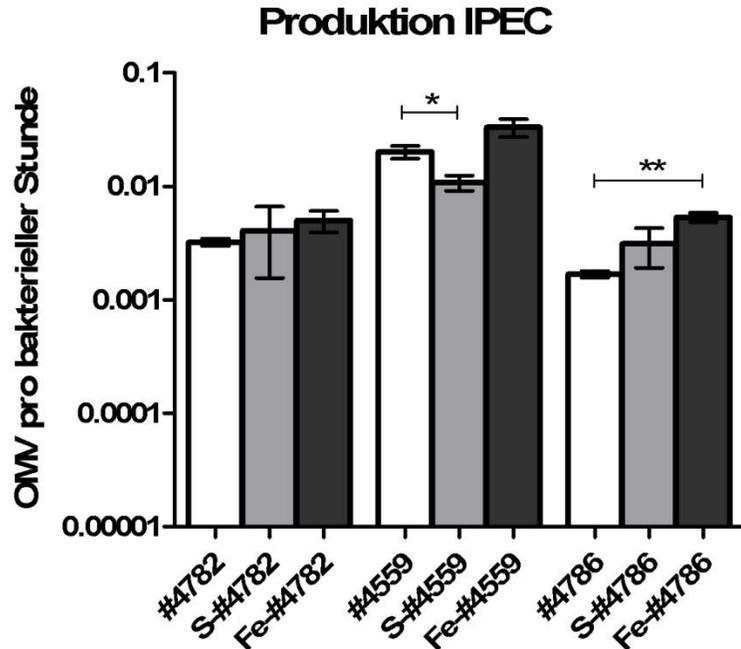


Abbildung 14: Übersicht der Vesikelproduktion (MW +/- SEM, n = 4-8) in der Phase des exponentiellen Wachstums für die intestinal pathogenen *E. coli* für die Bedingung reiches Nährmedium (weiß), saurer pH-Wert (grau) und Eisenmangel (schwarz), * = $p \leq 0,05$, ** = $p \leq 0,01$, nicht signifikante Vergleiche wurden nicht eingetragen

Zusammenfassend wird die Vesikelproduktion in der Phase des exponentiellen Wachstums bei den intestinal pathogenen Stämmen einheitlich durch Eisenmangelbedingungen verstärkt. Eine erhöhte Produktionsrate wurde auch bei den enteropathogenen Stämmen #4782 und #4786 unter Wachstum in angesäuertem Medium beobachtet. Dagegen wurde bei dem untersuchten enterotoxischen Stamm #4559 der gegenteilige Effekt beobachtet. Die Vesikelproduktion dieses Stammes sank unter dem Einfluss des sauren pH-Wertes.

4.3.3 Extraintestinal pathogene *E. coli*

Die letzte untersuchte Gruppe repräsentiert die extraintestinal pathogenen *E. coli*. Auch hier wurden beide Stressoren, niedriger pH-Wert und Eisenmangel, eingesetzt und die Vesikelbildungsrate mit dem Wachstum unter stressfreien Bedingungen verglichen. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte mit dem Standardfehler in Abbildung 15 dargestellt.

Dieser Grafik lässt erkennen, dass bei zwei der Stämme, CFT073 und 536, die Vesikelbildung in saurem Medium höher ist als im Medium mit neutralen pH-Wert.

Der dritte Vertreter der ExPEC UTI89 scheint in saurem Medium etwas weniger Vesikel zu produzieren. Seine mittlere Bildungsrate liegt mit $10,1 \times 10^{-3}$ OMV pro bakterieller Stunde (KbE x

D Ergebnisse

h) nicht signifikant unter der in neutralem LB-Medium mit $14,9 \times 10^{-3}$. Durch diese gegensätzliche Reaktion auf den Stressor hebt er sich von den beiden anderen Vertretern der uropathogenen *E. coli* ab.

Unter Eisenmangel reagieren auch die extraintestinal pathogenen *E. coli* einheitlich. Ähnlich wie bei den intestinal pathogenen Stämmen bewirkt der Mangel an essenziellen Eisen einen Trend zur verstärkten Vesikelbildung. Im Fall des 536 war diese Anpassungsreaktion so deutlich, dass ein signifikanter Unterschied zwischen der Produktionsrate unter Vollmedium und Eisenmangelbedingung nachgewiesen werden konnte.

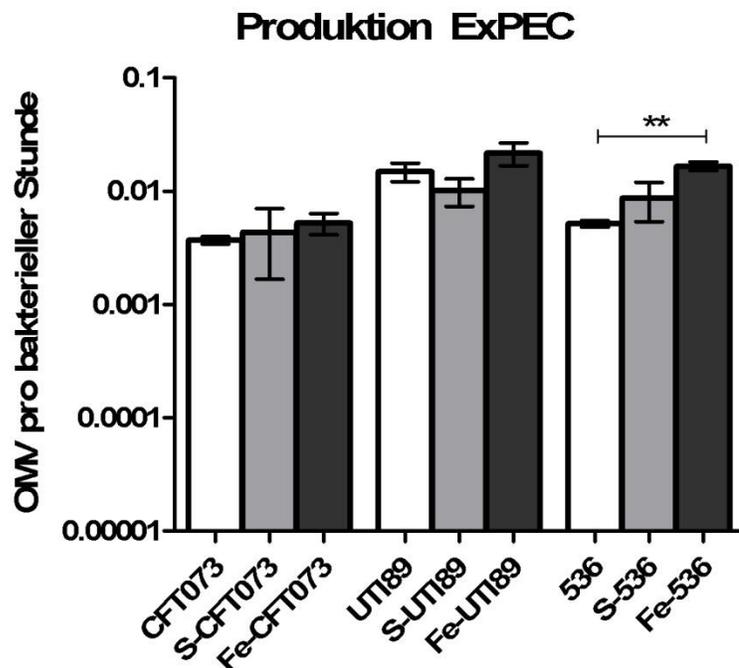


Abbildung 15: Übersicht der Vesikelproduktion (MW +/- SEM, n = 3-6) in der Phase des exponentiellen Wachstums für die extraintestinal pathogenen *E. coli* für die Bedingung reiches Nährmedium (weiß), saurer pH-Wert (grau) und Eisenmangel (schwarz), ** = $p \leq 0,01$, nicht signifikante Vergleiche wurden nicht eingetragen

Demnach ist Eisenmangel nicht nur als Stimulator der Vesikelproduktion für intestinal pathogene, sondern auch für extraintestinal pathogene *E. coli* zu beobachten. Ein niedriger pH-Wert führte zu keiner signifikanten oder innerhalb der Gruppe einheitlichen Anpassung der Produktionsrate.

5. Vesikelproduktion in der stationären Phase

5.1 Probengewinnung in der stationären Phase

Auch in der stationären Phase sollte die Vesikelproduktion bestimmt werden. Dafür wurde unter Berücksichtigung der Wachstumskurve der Zeitraum zwischen 10 und 12 Stunden Inkubation ausgewählt.

Analog zum Vorgehen in der Phase des exponentiellen Wachstums wird ein Referenzwert zur Bestimmung der Vesikelproduktion benötigt. Dieser kann durch einen Waschschrift erreicht werden, indem das Kulturmedium ausgetauscht wird. Damit werden alle bis dahin produzierten Vesikel entfernt und es kann die Neuproduktion nach Ablauf des Beobachtungszeitraums bestimmt werden. Bei Vorversuchen wurde festgestellt, dass diese Methodik in der stationären Phase nicht zu Anwendung kommen kann.

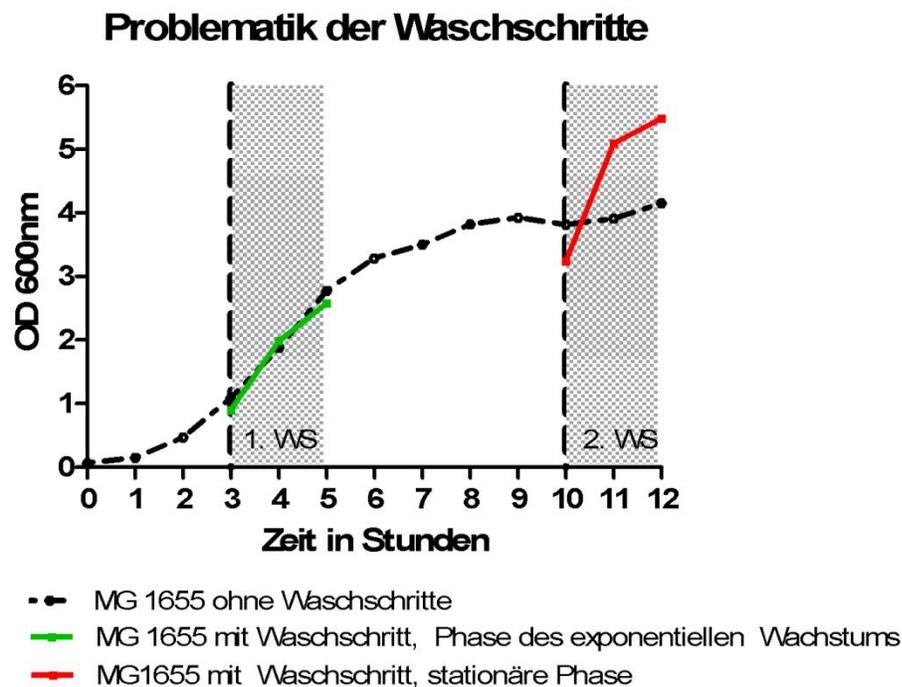


Abbildung 16: Darstellung des Wachstumsverlaufs anhand der optischen Dichte für den Laborstamm MG1655 im Vergleich ohne Waschschrift (Abkürzung: WS, schwarze Kurve), mit einem Waschschrift (grüne Kurve) und mit zwei Waschschriffen (rote Kurve). Die verwendeten Beobachtungszeiträume in der Phase des exponentiellen Wachstums und der stationären Phase sind grau hinterlegt.

D Ergebnisse

Wie in Abbildung 16 gezeigt, nimmt der erste Waschschrift in der Phase des exponentiellen Wachstums keinen Einfluss auf die weitere Entwicklung der Bakterienkultur (Abbildung 16, grüne Kurve). Der Kurvenverlauf der optischen Dichte der Bakterienkultur verläuft nahezu deckungsgleich mit oder ohne Waschschrift. Nach dem zweiten Waschschrift in der stationären Phase nach 10 Stunden Wachstum jedoch führt der Austausch des Mediums zu einem veränderten Wachstumsmuster (Abbildung 16, rote Kurve). Zu diesem vergleichsweise späten Zeitpunkt im bakteriellen Lebenszyklus haben die Bakterien das Nährmedium durch ihr Wachstum bereits signifikant verändert. Es wurden nicht nur Nährstoffe verbraucht und Stoffwechselprodukte im Medium angesammelt, sondern vermutlich auch *Quorum-Sensing*-Moleküle gebildet, welche die Teilungsrate der Bakterien limitieren. Durch den Austausch des Mediums werden diese wachstumshemmenden Faktoren zusammen mit den Vesikeln entfernt. Das neu zugegebene Medium besitzt darüber hinaus wieder eine erhöhte Nährstoffdichte, was dazu führt, dass die Bakterienkultur erneut in eine Phase des exponentiellen Wachstums übergeht. Dabei erreicht die Kultur bereits 2 Stunden nach der Waschung eine optische Dichte, die deutlich über der durchschnittlichen optischen Dichte einer stationären Kultur liegt.

Aufgrund dieser Problematik können keine repräsentativen Messwerte aus der stationären Wachstumsphase gewonnen werden, wenn die Kultur gewaschen wird. Eine erneute Stimulation der Teilung ist per definitionem nicht mit einer stationären (= nicht teilenden) Kultur vereinbar. Daher musste ein alternatives Vorgehen zur Ermittlung der Produktionsrate gefunden werden.

Da in der stationären Phase sich die Bakterienanzahl und damit auch die optische Dichte näherungsweise konstant hält, ist durch eine Bestimmung der Vesikelkonzentration zu Beginn und am Ende des Beobachtungszeitraums eine Berechnung der Nettoproduktionsrate (entspricht der Gesamtproduktion abzüglich der Reabsorption) möglich. Dieser methodische Ansatz kam im Folgenden zum Einsatz.

5.2 *OMV-Nettoproduktion unter stressfreien Wachstumsbedingungen*

Die Vesikelproduktion sollte ins Verhältnis zur bakteriellen Lebenszeit gesetzt werden. Während in der Wachstumsphase die Bakterienanzahl exponentiell ansteigt, ist sie in der stationären Phase definitionsgemäß nahezu konstant. Demnach wurden keine großen Schwankungen zwischen der bestimmten optischen Dichte zu Beginn und am Ende des Beobachtungszeitraumes erwartet. Tabelle 5 zeigt die exemplarischen Rohdaten für die stationäre Phase des Laborstamms Top10. Diese Daten zeigen, dass die gemessene OD_{600} nur geringfügig im Rahmen der Messgenauigkeit schwankt. Durch die Korrelation zwischen

D Ergebnisse

optischer Dichte und Keimzahl kann diese Aussage auch auf die Anzahl der koloniebildenden Einheiten (KbE) in der Kultur übertragen werden.

Tabelle 5: Datenauszug für die stationäre Phase des Top10 in reichem Nährmedium

OD₆₀₀ 10h	OD₆₀₀ 12h	OMV/μl 10h	OMV/μl 12h	Differenz 12h-10h	Quotient (12h/10h)
3,05	3,05	1902,99	3067,76	1164,77	1,612
2,91	2,75	7576,57	3313,37	-4263,2	0,437
2,62	2,68	3546,94	1903,91	-1643,03	0,537
2,8	2,66	6987,78	6018,09	-969,69	0,861

Darüber hinaus sind die gemessenen Vesikel im Überstand pro μl Bakterienkultur angegeben. Die fünfte Spalte zeigt die Differenz zwischen den beiden Werten und damit die Nettoproduktion im Beobachtungszeitraum. Hier ist ersichtlich, dass der Laborstamm Top10 in der ersten Messung im Zeitraum zwischen 10 und 12 Stunden Wachstum seine Vesikelkonzentration im Überstand erhöht. In den restlichen drei Messungen hingegen wurde eine negative Nettoproduktion beobachtet. Da es sich dabei um absolute Werte handelt, wurde zur besseren Übersichtlichkeit und Vergleichbarkeit der Quotient aus dem 12- und 10-Stunden-Wert eingeführt. Ein Quotient größer 1 bedeutet dabei, dass der Vesikelgehalt am Ende des Beobachtungszeitraumes höher war als am Anfang. Während ein Quotient kleiner 1 auf eine Abnahme der Vesikeldichte im Zeitverlauf hinweist. Ein Wert des Quotienten von 1 ist dabei gleichbedeutend mit einer konstanten Vesikelkonzentration. Sämtliche erhobene OMV-Messdaten wurden nach diesem Prinzip aufgearbeitet und in den folgenden Abbildungen visualisiert.

Abbildung 17 visualisiert dabei die Quotienten der Vesikelmessungen aller untersuchten Stämme in der stationären Phase bei Wachstum in reichem Flüssignährmedium (LB-Medium).

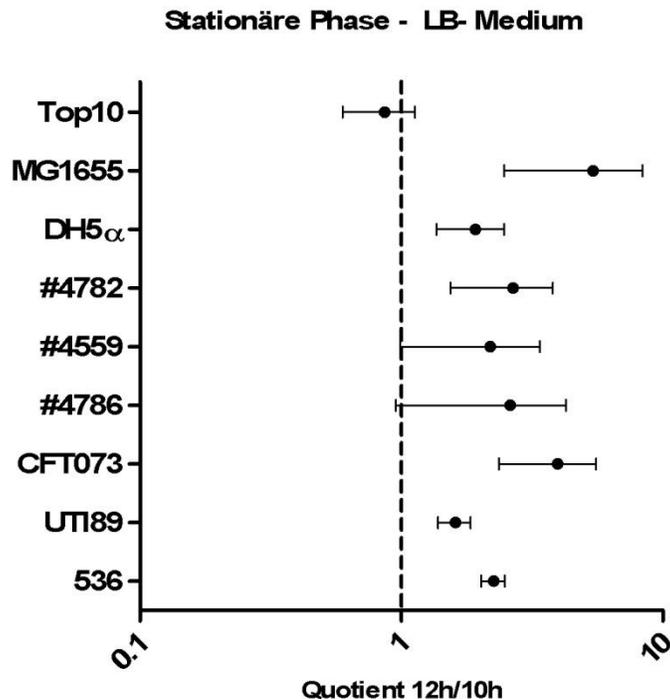


Abbildung 17: Darstellung der Vesikelkonzentration als Quotient aus dem Messwert nach 12 Stunden und nach 10 Stunden (MW \pm SEM, n = 3-5) in reichem Nährmedium (LB-Medium)

Hieraus ist ersichtlich, dass die Mittelwerte fast aller Stämme größer als 1 sind. Das bedeutet, dass im Mittel die Konzentration der Vesikel im Beobachtungszeitraum zunimmt, auch wenn die Schwankungen der Werte teilweise erheblich sind (siehe Standardfehler in Abbildung 17). Damit ist die Nettoproduktion in der stationären Phase für den Großteil der Stämme positiv, die Vesikel akkumulieren also.

Eine Ausnahme bildet dabei der bereits erwähnte Laborstamm Top10. Sein mittlerer Quotient ist kleiner als 1. Im Durchschnitt nimmt demnach seine Vesikelkonzentration im Zeitverlauf der stationären Phase tendenziell eher ab. Anhand des Standardfehlers ist dabei ersichtlich, dass es auch zu einem Anstieg der Vesikelkonzentration im Zeitverlauf kommen kann. Da die Daten aus je einer über die Zeit nachverfolgten Probe erhoben wurden, lässt sich folglich nur eine Tendenz zu einer abnehmenden Vesikelkonzentration im Zeitverlauf festhalten. Auch bei anderen Stämmen zeigte sich bei der Durchsicht der Quotienten, dass sich einzelne Proben auch gegenläufig zum Trend der Vesikelakkumulation im Zeitverlauf entwickelten. Lediglich bei den Stämmen #4782, CFT073 und 536 zeigten alle erhobenen Daten einen Anstieg der Vesikelkonzentration während des Beobachtungszeitraums in der stationären Phase.

D Ergebnisse

In Abbildung 18 wird der durchschnittlichen Nettoproduktion in der stationären Phase eine theoretische Neuproduktion basierend auf den Vesikelbildungsraten in der Phase des exponentiellen Wachstums gegenübergestellt. Dabei wurde die mittlere Differenz der Vesikelkonzentration pro μl Bakterienkultur zwischen dem 12-Stunden-Wert und dem 10-Stunden-Wert aufgetragen. Aufgrund der deutlichen Varianz der Werte, wie es die eingezeichneten Maximal- und Minimalwerte erkennen lassen, bietet dieser Mittelwert lediglich einen groben Anhaltspunkt für die Entwicklung der Vesikelkonzentration im Zeitverlauf. Er wird trotz der damit einhergehenden Ungenauigkeit eingetragen, um einen Vergleich mit der theoretischen Neuproduktion zu ermöglichen. Die theoretische Neuproduktion wurde anhand der mittleren Anzahl der koloniebildenden Einheiten und der Vesikelproduktionsrate in der Phase des exponentiellen Wachstums für den Beobachtungszeitraum berechnet.

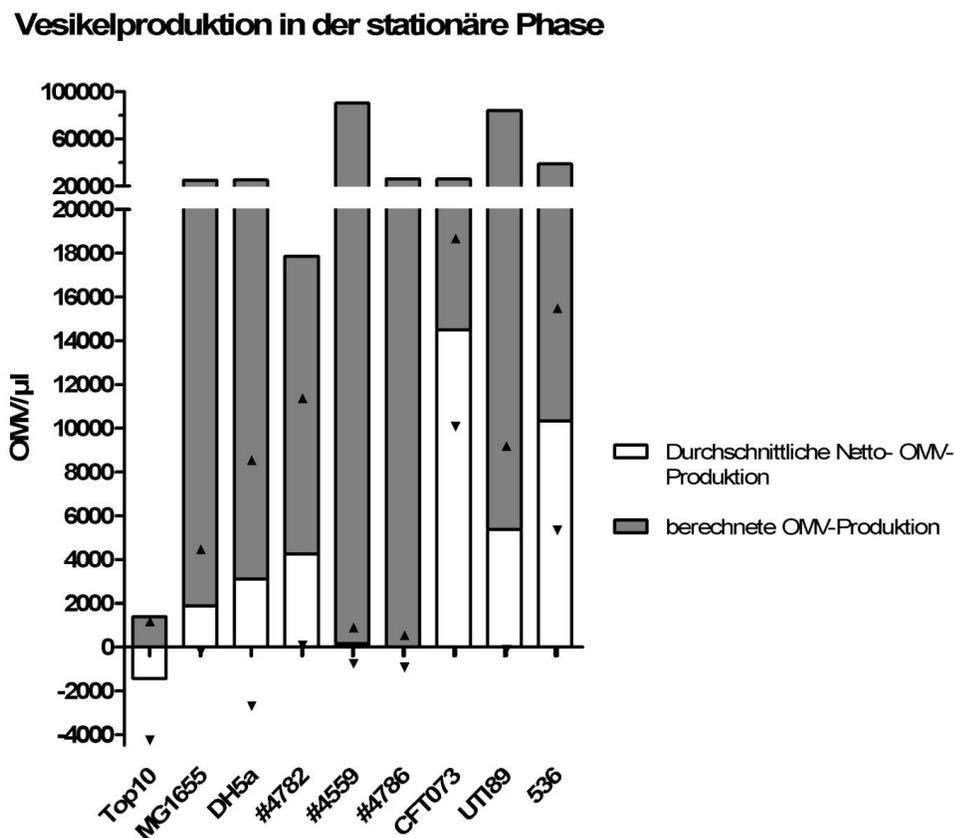


Abbildung 18: Gegenüberstellung der gemessenen Nettoproduktion (MW, weiß) unter der Annahme einer konstanten Bakterienanzahl im Beobachtungszeitraum mit dem erhobenen Minimum (▼) und Maximum (▲) und der theoretischen Vesikelproduktion (MW, grau) in einem 2 Stundenintervall in der stationären Phase bei Wachstum in LB-Medium

D Ergebnisse

Die Ergebnisse sind in Abbildung 18 aufgetragen und zeigen, dass die berechnete, theoretische Vesikelneuproduktion basierend auf den gemessenen Produktionsraten in der Phase des exponentiellen Wachstums bei allen Stämmen deutlich über der real gemessenen Nettoproduktion in der stationären Phase liegt. Besonders deutlich wird der Unterschied beim Laborstamm Top10. Bei stabiler Vesikelproduktion im Beobachtungszeitraum würde zwischen Stunde 10 und 12 eine Vesikelkonzentrationszunahme von 1385 OMV/μl erwartet. Im Versuchsansatz wurde jedoch beim K12-*E. coli* eine durchschnittliche Vesikelkonzentrationsreduktion von -1427 OMV/μl verzeichnet. Wie bereits oben ausgeführt, konnte bei der Mehrzahl der untersuchten Stämme neben einer Vesikelakkumulation auch das Phänomen einer Vesikelkonzentrationsabnahme im Zeitverlauf beobachtet werden. In Abbildung 18 spiegelt sich diese Konzentrationsabnahme in den negativen Minimal-Nettoproduktionen wider.

Zusammenfassend lässt sich somit festhalten, dass sich die Vesikelproduktionsrate im Wachstumskurvenverlauf ändert. Die Messwerte zeigen eine verringerte Vesikelproduktion in der stationären Phase gegenüber der Phase des exponentiellen Wachstums. Folglich wird eine Anpassung der Vesikelproduktionsrate durch die Bakterien im Wachstumskurvenverlauf vermutet.

5.3 OMV-Nettoproduktion unter Stressbedingungen

Im folgenden Abschnitt soll die OMV-Nettoproduktion der *E. coli*-Stämme unter Stressbedingungen untersucht werden. Die Daten für die Bedingungen saurer pH-Wert und Eisenmangel wurden analog zu den Daten unter stressfreien Wachstumsbedingungen als Quotienten aufbereitet. Auch hier zeigt ein Quotient >1 eine Zunahme und ein Wert <1 eine Abnahme der gemessenen Vesikel im Zeitverlauf an.

5.3.1 Saurer pH-Wert

Zunächst soll auf die Auswirkung eines sauren Milieus auf die Vesikelkonzentration in der stationären Phase eingegangen werden. Abbildung 19 fasst die Ergebnisse dabei grafisch zusammen.

Waren unter stressfreien Wachstumsbedingungen die Mittelwerte der Quotienten noch überwiegend größer 1, so trifft dies im angesäuerten Medium nur auf drei Stämme zu. Nur für den intestinal Pathogenen #4782 und die beiden extraintestinal pathogenen *E. coli*-Stämme 536 und CFT073 wurden durchschnittliche Quotienten >1 errechnet. Damit heben sich diese drei

D Ergebnisse

Stämme von den restlichen untersuchten Stämmen dadurch ab, dass sie sowohl unter stressarmen Wachstumsbedingungen als auch unter dem Stressor saurer pH-Wert in der stationären Phase Vesikel akkumulieren.

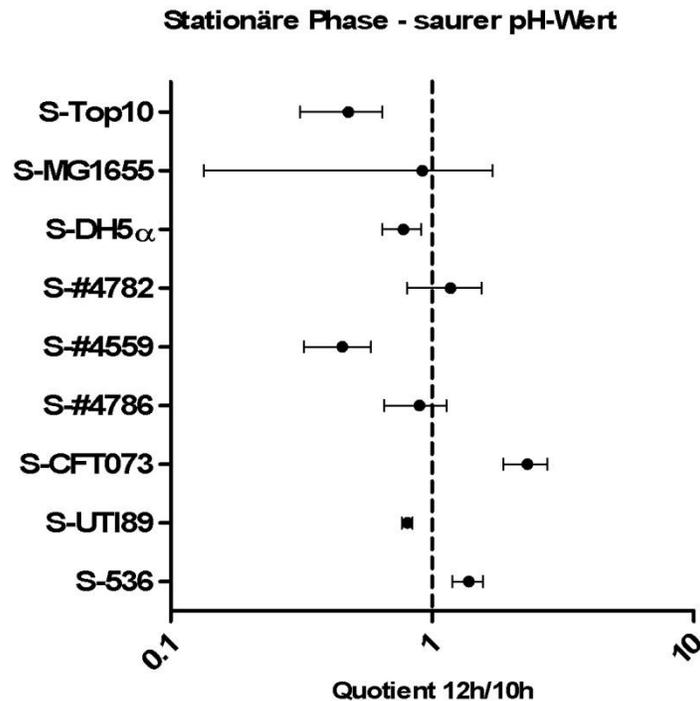


Abbildung 19: Darstellung der Vesikelkonzentration als Quotient aus dem Messwert nach 12 Stunden und nach 10 Stunden (MW +/- SEM, n = 3-5) in saurem Milieu

Jedoch lässt sich aus den berechneten Mittelwerten nur eine Tendenz ablesen. Bei Analyse der Daten fällt auf, dass die errechneten Quotienten des intestinal pathogenen Stammes #4782 von rund 0,28 bis 2,31 variieren. Damit streuen die Messergebnisse von einer Vesikelreduktion auf weniger als ein Drittel der Ausgangskonzentration bis hin zu mehr als einer Verdopplung der Vesikelkonzentration im Beobachtungszeitraum. Folglich ist keine sichere Aussage über das Verhalten des Stammes im Einzelfall möglich. Eine ähnlich große Varianz der Ergebnisse ist auch bei anderen Stämmen wie dem MG1655 und dem #4786 zu verzeichnen.

Lediglich die, an das saure Milieu der Harnwege angepassten, Stämme CFT073 und 536 weisen sich durch eine Vesikelakkumulation in allen Wiederholungen aus. Der dritte Vertreter der UPEC, UT189, fällt durch einen errechneten mittleren Quotienten von <1 auf. Bei diesem Stamm werden, trotz vergleichbarer Anpassung an niedrige pH-Werte, in allen Messungen sinkende Vesikelkonzentrationen im Verlauf des Beobachtungszeitraumes verzeichnet. Ähnlich

D Ergebnisse

verhält es sich bei dem intestinal pathogenen Stamm #4559 und dem Laborstamm Top10. Auch hier ist die Vesikeldichte nach 12 Stunden niedriger als nach 10 Stunden Wachstum und lässt die Frage nach dem Verbleib der Vesikel offen.

5.3.2 Eisenmangel-Bedingung

Unter Eisenmangelbedingungen sind die einzelnen Messwerte der meisten Stämme deutlich inhomogen und schwanken zwischen einer Akkumulation und einer Abnahme der Vesikellkonzentration in der stationären Phase. Bei sechs von insgesamt neun Stämmen wurde sowohl eine Akkumulation als auch eine Abnahme der Vesikel im Beobachtungszeitraum festgestellt. Ihre Quotienten schwanken um 1, wie die Standardfehlerbalken in Abbildung 20 visualisieren.

Welche Faktoren Einfluss auf ein Verhalten in die eine oder andere Richtung nehmen, ist auch hier unklar. Es ist lediglich zu bemerken, dass ein Mangel an essenziellem Eisen die wenigsten der untersuchten Stämme so beeinflusst, dass sie in der stationären Phase ein einheitliches Verhalten an den Tag legen.

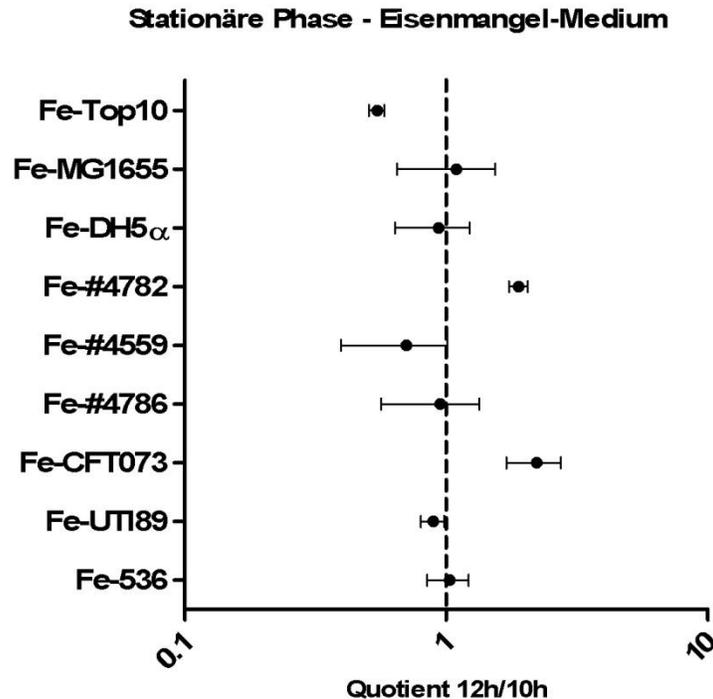


Abbildung 20: Darstellung der Vesikellkonzentration als Quotient aus dem Messwert nach 12 Stunden und nach 10 Stunden (MW +/- SEM, n = 3-5) unter Eisenmangelbedingungen

D Ergebnisse

Nur drei der neun untersuchten Stämme verhalten sich einheitlich unter Eisenmangelbedingungen. Die Stämme #4782 und CFT073 zeigten eine Zunahme der Vesikelkonzentration im Beobachtungszeitraum sowohl im Durchschnitt als auch bei allen Einzelmessungen. Im Gegensatz dazu hatte der Laborstamm Top 10, auch unter Eisenmangelbedingungen nach 12 Stunden Wachstum durchgehend weniger Vesikel im Überstand als nach 10 Stunden.

5.4 Auswirkung der Stressbedingungen auf die Vesikelkonzentration in einer stationären Kultur

In der Phase des exponentiellen Wachstums war es möglich die Auswirkungen von externen Stressoren wie Eisenmangel oder niedrigem pH-Wert auf die Vesikelproduktion zu untersuchen. Dies ermöglichte das experimentelle Setting in der stationären Phase nicht, weshalb die Nettoproduktion gewählt und als Quotient aus der Vesikelkonzentration nach 12 und 10 Stunden aufgearbeitet wurde.

Abbildung 21 gibt eine Übersicht über das Verhalten der Stämme unter den getesteten drei Bedingungen. Hier fällt auf, dass die Quotienten der Stressbedingungen immer niedriger sind, als die unter idealen Wachstumsbedingungen. Eine Analyse der Daten zeigte, dass der mittlere Quotient der Stressbedingungen aller Stämme um mindestens 40% unter dem in reichem Nährmedium liegt. Was bedeutet, dass unter den Stressbedingungen im Wachstumskurvenverlauf die absolute Vesikelkonzentration geringer ist als beim Wachstum in reichem Nährmedium.

In der Phase des exponentiellen Wachstums konnte teilweise eine Vesikelproduktionssteigerung durch externe Stressoren wie Eisenmangel und niedrigem pH-Wert beobachtet werden. Die vorgestellten Ergebnisse zeigen, dass diese Produktionssteigerung bei keinem der Stämme bis in die stationäre Phase bestehen bleibt.

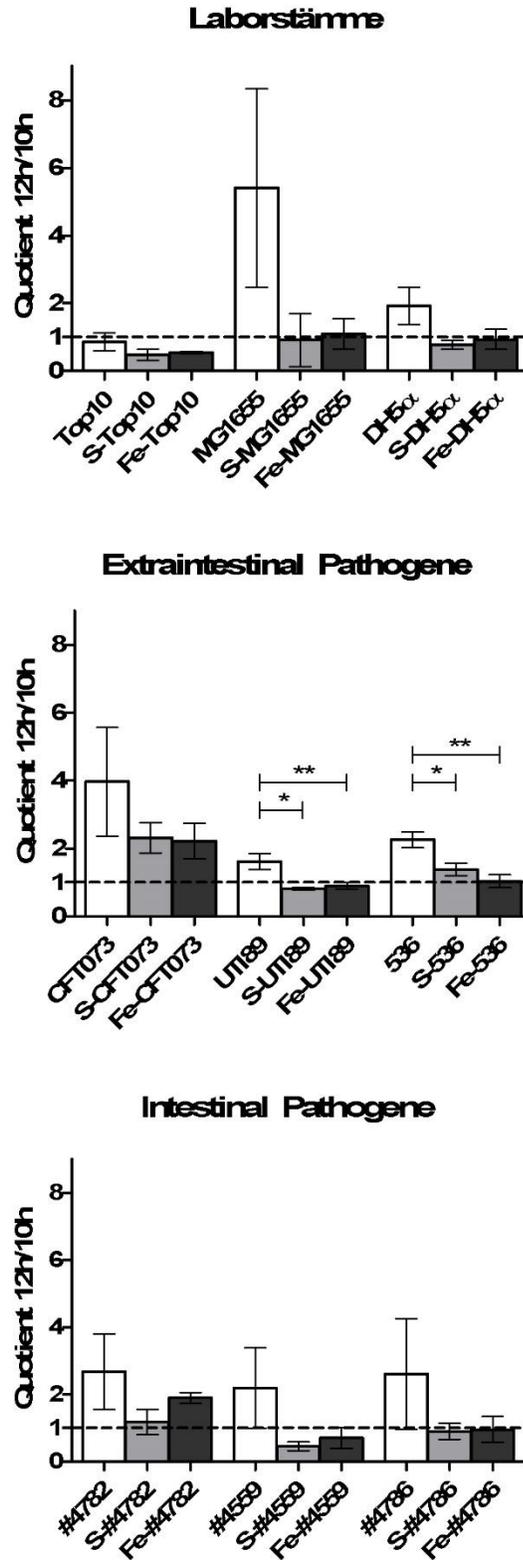


Abbildung 21: Gegenüberstellung der Mittelwerte der Quotienten der Vesikelkonzentration in der stationären Phase für alle untersuchten Bedingungen (weiß: reiches Nährmedium, hellgrau: saurer pH-Wert, dunkelgrau: Eisenmangel) und der Annahme einer konstanten Bakterienanzahl (* = $p \leq 0,05$, ** = $p \leq 0,01$, nicht signifikante Vergleiche sind nicht eingetragen)

6. Wiederaufnahme von Vesikel

In den vorangegangenen Abschnitten wurde wiederholt das Auftreten einer abnehmenden Vesikelkonzentration im Zeitverlauf angesprochen. Nun wurde die Hypothese einer Wiederaufnahme der Vesikel in die bakterielle Hülle untersucht.

Hierfür wurde eine stationäre Wildtypkultur des uropathogenen 536 mit isolierten OMV des Stammes 536 Oca versetzt. Diese Vesikel besitzen auf ihrer Oberfläche Strep-markierte Proteine, die der ansonsten isogenen Kontrolle fehlen. Bei einer Wiederaufnahme oder Adhäsion von Vesikel an Bakterien sollten diese Strep-markierten Produkte mit der Zeit zunehmend im gewaschenen Bakterienpellet zu finden sein. Der Verbleib der Strep-markierten, nativen Proteine kann dabei hoch sensitiv im Western Blot detektiert werden.

Im Versuch wurden unter stressarmen Wachstumsbedingungen (nährstoffreiches LB-Medium, 37°C, 400 rpm im Schikanenkolben) aufgereinigte Oca-markierte Vesikel zu der stationären 536 WT-Kultur gegeben und für 2 Stunden alle 30 Minuten eine Probe entnommen. Die Probe wurde zentrifugiert und so die Bakterien von dem vesikelhaltigen Überstand getrennt. Um eine Verfälschung der Ergebnisse durch nur adhärenzte Strep-positive Oca-Vesikel zu vermeiden, wurde das Pellet mehrfach kalt gewaschen. Damit sollten nur fest adhärenzte und reabsorbierte Strep-markierte Vesikel im Pellet verbleiben. Anschließend wurden die Proben im Western Blot aufbereitet. Ein beispielhafter Western Blot ist in Abbildung 22 zu sehen.

Im Blot sind die Bakterienpellets und die Überstände der Kultur zu verschiedenen Zeitpunkten nebeneinander aufgetragen. Der Pfeil an der rechten Seite kennzeichnet die erwartete Position Strep-markierter Proteine im Blot. Deutlich sichtbar sind die Signale der Positivkontrolle und der Überstände. Hier erscheinen die Banden bedingt durch die hohen eingesetzten Vesikelkonzentrationen als gleichmäßig gesättigt.

Anders ist es mit den Proben der Bakterienpellets. Eine Probe der 536 WT-Kultur dient als Negativkontrolle. Ihr Signal kontrolliert die potenziellen, unspezifischen Bindungen im Blot, wobei sich auf Höhe der gesuchten Strep-Markierung kein Signal detektieren lässt.

D Ergebnisse

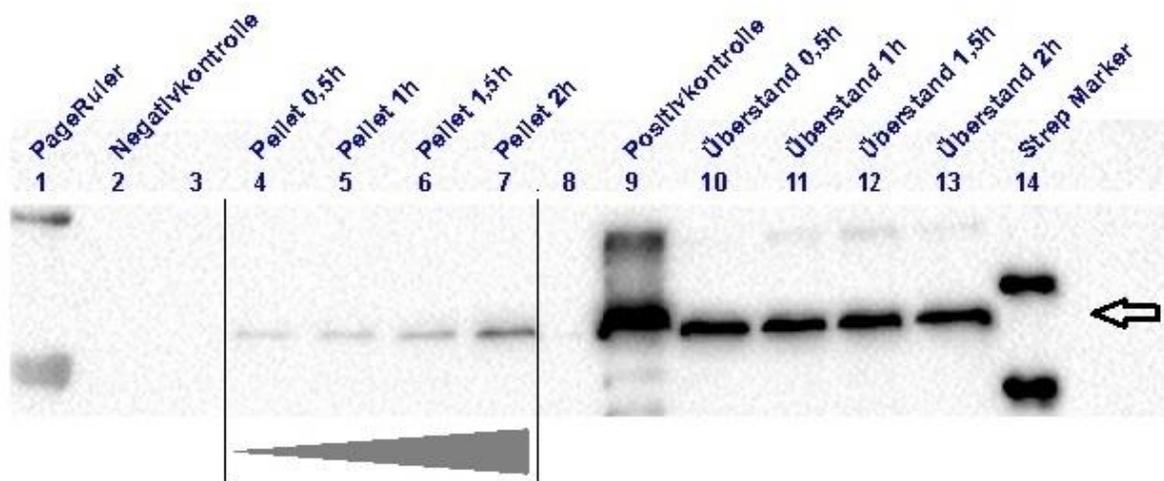


Abbildung 22: Ausschnitt eines Western Blots einer Koinkubation einer stationären 536 WT-Kultur mit Strep-markierten 563 Oca Vesikel im Zeitverlauf von 2 Stunden, Signal aufgezeichnet mit ChemiDoc (Biorad, München), Pfeil markiert Signalbande der Strep-Proteine, grauer Keil kennzeichnet die ansteigende Signalintensität für Strep-markierte Proteine im Pellet über die Zeit

Da das erwartete Signal im Bakterienpellet sehr gering ist, wurde das Pellet nach den Waschschritten nur im halben Ausgangsvolumen rückgelöst. Bei dem so konzentrierten Pellet ist hier schon nach 0,5 Stunden ein schwaches Signal erkennbar. Also gab es bereits nach einer halben Stunde Ko-Inkubation von aufgereinigten Vesikeln mit der Bakterienkultur einen Übertrag der Antigene von den OMV an die Bakterien. Im Beobachtungszeitraum nimmt die Signalstärke der Pellets weiter zu. Die Anzahl der fest angelagerten oder wieder in die Bakterienmembran aufgenommenen Vesikel steigt also kontinuierlich an. Damit konnte die Möglichkeit einer Wiederaufnahme der Vesikel aus dem Kulturüberstand in die Bakterien gezeigt werden.

7. Makrophageninfektionsversuch

Die vorangegangenen Experimente beschäftigten sich mit der Vesikelproduktion im Rahmen der Anpassungsvorgänge einer Bakterienkultur unter bestimmten Wachstumsbedingungen, sowie den Auswirkungen von verschiedenen Wachstumsphasen auf die Vesikelkonzentration im Kulturüberstand.

Im nächsten Schritt soll die Bakterienkultur verlassen werden und die Interaktionen von Vesikel mit Zellen des Immunsystems untersucht werden. Dafür wurden Vesikel des uropathogenen *E. coli*-Stamms 536 isoliert und im Zellkultur-Infektionsversuch eingesetzt. Dabei wurde untersucht, ob die Anwesenheit zusätzlicher OMV einen Überlebensvorteil für die Bakterien mit sich bringt. Bei einem festgelegten Verhältnis von 536 Bakterien zu Makrophagen wurden in der Versuchsgruppe isolierte Vesikel und als Negativkontrolle in der zweiten Gruppe das gleiche Volumen 0,1% (w/v) BSA-Lösung zugegeben. Damit wurde sichergestellt, dass die beobachtete Reaktion nicht durch das Einbringen fremder Proteine, sondern durch die Vesikel ausgelöst wird.

Die isolierten OMV wurden so eingesetzt, dass eine Vesikelkonzentration von rund 8.750 Vesikel pro μl Gesamtvolumen erreicht wurde. Bei eingesetzten 1×10^6 Bakterien in der Infektionsdosis und einer durchschnittlichen Produktion von $5,15 \times 10^{-3}$ OMV/KbE \times h (siehe D Ergebnisse 4.2 Vesikelproduktion in reichem Nährmedium) ist die Menge der neu gebildeten Vesikel über die relativ kurze Versuchszeit hinweg im Vergleich vernachlässigbar klein. Entsprechend kann die Vesikelkonzentration im Versuchsansatz näherungsweise als konstant hoch angenommen werden.

Um die Auswirkungen der zusätzlichen OMV auf das bakterielle Überleben zu messen, wurde nach Ablauf der Inkubationszeit von 3 Stunden die Anzahl der koloniebildenden Einheiten bestimmt, die alle teilungsfähigen Bakterien im Versuchsansatz repräsentieren. Um die Anzahl der intrazellulären koloniebildenden Einheiten zu erheben, wurde Gentamicin zur Eliminierung der extrazellulären Bakterien eingesetzt. Entsprechende Einzelheiten des Versuchsaufbaus wurde bereits im Methodenteil (siehe C Methoden 7. Zellkultur-Versuche) erläutert und sollen an dieser Stelle nicht erneut aufgeführt werden. Im Endergebnis erlaubt der Versuchsaufbau die Bestimmung der intrazellulären koloniebildenden Einheiten, die, subtrahiert von der Gesamtanzahl im Versuchsansatz, die Gegenüberstellung der Anzahl koloniebildender Einheiten im intrazellulären und extrazellulären Raum ermöglicht.

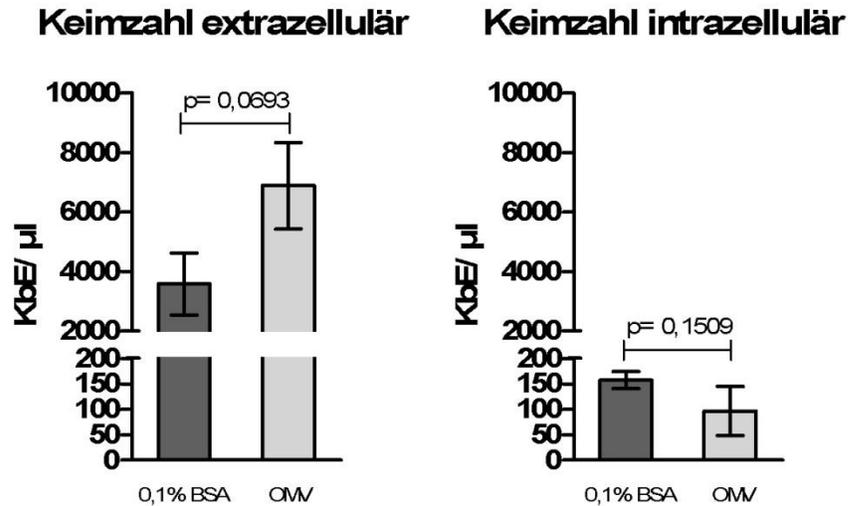


Abbildung 23: Koloniebildende Einheiten (MW +/- SEM, n = 3) pro µl Versuchsansatz im Makrophageninfektionsversuch

In der Abbildung 23 sind die beiden Ergebnisse gegenübergestellt und erlauben den Vergleich beider Versuchsgruppen. Im Fall der extrazellulär lokalisierten Bakterien wurden im Mittel bei der Negativkontrolle 3.576 KbE/µl gezählt. Diese Anzahl ließ sich durch die Zugabe isolierter Vesikel auf 6.882 KbE/µl steigern, was einem doppelt so hohen Überleben der Bakterien im Infektionsversuch entspricht.

Ein höheres Überleben im Infektionsversuch entspricht einer reduzierten Anzahl von Bakterien, die von den Makrophagen aufgenommen und ggf. getötet wurden. Folglich sollten sich in ihrem Zytoplasma auch weniger Bakterien finden. Es werden dementsprechend in der OMV-Gruppe weniger intrazelluläre, koloniebildende Einheiten erwartet. Diese Annahme konnte im durchgeführten Versuch bestätigt werden, denn in der Vesikelgruppe wurden mit intrazellulären 97 KbE/µl deutlich weniger als in der Kontrollgruppe mit 157 KbE/µl gezählt. Dabei ist zu erwähnen, dass ein Ausreißer in der Vesikel-Versuchsgruppe die Statistik negativ beeinflusst. Doch auch trotz dem Ausreißer sind noch deutliche, jedoch nicht signifikante Unterschiede zwischen den Datensätzen der beiden Versuchsgruppen zu erkennen.

8. Fluoreszenzmikroskopie

Im Makrophageninfektionsversuch weist vieles daraufhin, dass zugegebene Vesikel einen Überlebensvorteil für die Bakterien bedeuten. Es wurde die Hypothese aufgestellt, dass die Vesikel durch die Makrophagen aufgenommen werden und dadurch einen relativen Phagozytoseschutz für die Bakterien bewirken. Nach dieser These müssten die Vesikel tatsächlich in den Phagozyten zu finden sein. Um dies zu überprüfen, wurde ein weiterer Makrophagenversuch mit dem uropathogene Stamm 536 durchgeführt. Eingesetzt wurden hierbei auch Vesikel von 536-Bakterien, allerdings von einem Stamm, der ein TorA dTomato Plasmid enthält.

Die von der Arbeitsgruppe entwickelte, verbesserte Sequenz eines TorA-Derivates kodiert ein kleines Protein, das ins Periplasma sezerniert wird und als falscher Ligand des Tol-Pal-Systems fungiert. Durch die vorhandenen TorA-Derivate konnte eine gesteigerte Vesikelproduktion beobachtet werden. Der zweite Teil des Plasmids kodiert für eine neuartige, auf bakterielle Expression optimierte Sequenz für dTomato, einem rot fluoreszenzierenden Protein, das aus dem Chromophor der Scheibenanemone (lat. *Discosoma sp.*) entwickelt wurde (Shaner et al., 2004). Der hier verwendete Stamm produziert also mehr Vesikel, die außerdem nach Anregung des Farbstoffs rötliches Licht emittieren.

Wie beim vorangegangenen Versuch wurden die Makrophagen mit Bakterien infiziert und Vesikel oder BSA als Kontrollgruppe zugegeben. Nach 3 Stunden Inkubationszeit wurden die Zellen fixiert und anschließend nach Protokoll gefärbt. Nach Abschluss der Färbungen wurden die Proben mikroskopiert. Die Aufnahmen der beiden Versuchsgruppen sind in Abbildung 24 gegenübergestellt. Die Makrophagen haben eine variable Gestalt und die grüne Aktinfärbung lässt, vor allem in der Gruppe der Vesikel, durch dornenartige Ausziehungen des Aktingerüsts die Pseudopodienbildung erkennen. Diese Pseudopodien repräsentieren den aktivierten Zustand der Makrophagen und ihre Phagozytoseaktivität. Dabei zeigt der direkte Vergleich der beiden Versuchsgruppen, dass die mit OMV konfrontierten Zellen nicht mehr in eine Richtung polarisieren, sondern generell aktiviert sind. Dies könnte vermuten lassen, dass durch die vielfältige Interaktion mit den Vesikel eine zielgerichtete Phagozytose von Bakterien schlechter gelingt als in der Vergleichsgruppe.

D Ergebnisse

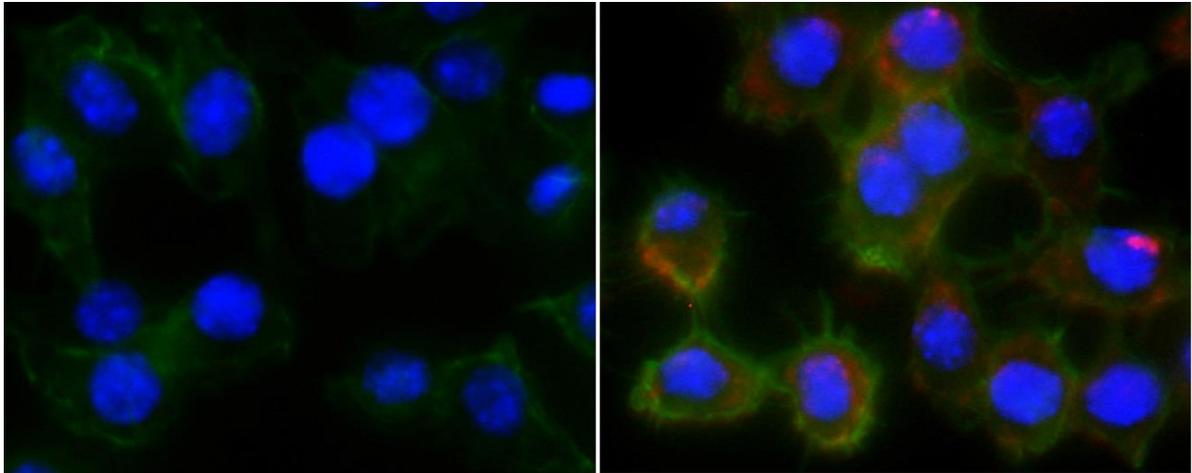


Abbildung 24: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme infizierter J774-Makrophagen (links: ohne Vesikel; rechts: mit dTomato-Vesikel)

Deutlich sichtbar sind auch rote Einschlüsse im Inneren der Makrophagen. Diese roten Granula sind in der mit 0,1 % (w/v) BSA versetzten Negativkontrolle nicht zu finden. Folglich handelt es sich bei den rötlichen Einschlüssen im Inneren der Makrophagen um aufgenommene dTomato-haltige Vesikel.

9. Zytokinsekretion aus der infizierten Harnblase der Maus

Im letzten Versuch wurden bereits Vesikel im *in-vitro* Versuch mit murinen Leukozyten konfrontiert. Welche Auswirkungen das Einbringen zusätzlicher Vesikel auf das murine Abwehrsystem hat, wurde im Maus-Organmodell untersucht.

Im Versuch wurden 536 WT-Bakterien in die explantierten Harnblasen weiblicher Mäuse instilliert und für die Versuchsgruppe zusätzlich aufgereinigte Vesikel zugegeben. Auch hier wurde eine ausreichend hohe Vesikelkonzentration eingesetzt, damit die Vesikelneuproduktion im Vergleich dazu vernachlässigbar gering erscheint. Es wurde hierfür mindestens das Dreifache der Vesikelkonzentration gewählt, die eine 536 WT-Kultur nach 2-stündigen Wachstum in der exponentiellen Phase produziert. In beiden Fällen wurde ein Volumen von 50 μ l pro Blase eingesetzt, wobei in der Kontrollgruppe das OMV-Volumen durch PBS ersetzt wurde.

Nach Ablauf der Infektionszeit wurden die Harnblasen der Tiere auf 4°C gekühlt in einem Organmörser homogenisiert und die Organhomogenisate bei -80°C schockgefroren. Die Zytokine aus den Harnblasenhomogenisaten wurden für alle Gruppen auf einmal bestimmt.

Die Auswirkungen zusätzlich eingebrachter Vesikel auf die Harnblase zeigt Abbildung 25. In der Versuchsgruppe sind interessanterweise alle gemessenen Zytokine niedriger als in der Kontrollgruppe. Mit Ausnahme von IFN γ konnte dabei ein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen festgestellt werden. Eine hohe Vesikelkonzentration im Harnblaseninfektionsversuch scheint demnach die Zytokinausschüttung zu hemmen.

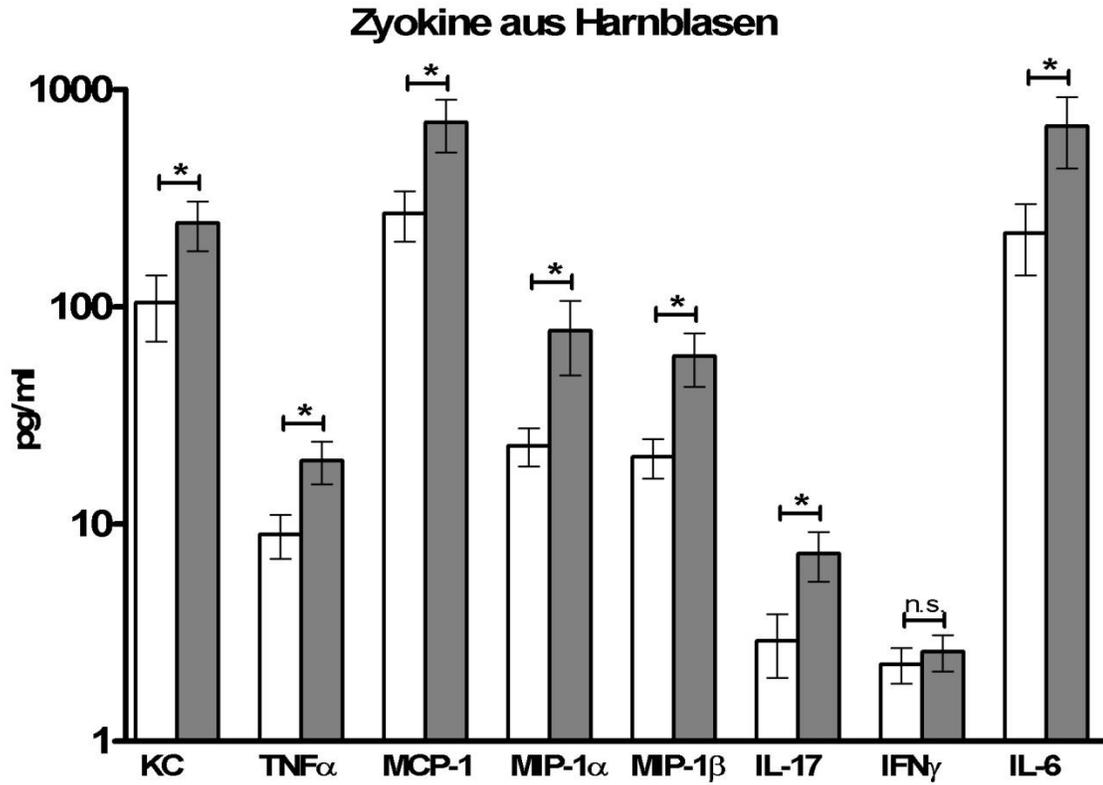


Abbildung 25: Übersicht der gemessenen Zytokine (MW +/- SEM) aus den explantierten Harnblasen der Versuchstiere (weiß: Bakterien und OMV, n = 23; grau: nur Bakterien, n = 22); n.s. = p > 0,05, * = p ≤ 0,05

E Diskussion

Aktuell wird im klinischen Alltag die Behandlung von Infektionskrankheiten durch die steigende Anzahl an Antibiotikaresistenzen zunehmend limitiert. Um neue Ansatzpunkte für die Prävention und Therapie von Infektionskrankheiten zu finden, wurde ihre Pathogenese in den letzten Jahren intensiv erforscht. Eine der in der Forschung am häufigsten eingesetzten Bakterienspezies ist dabei *Escherichia coli* mit seinen verschiedenen Pathotypen.

Als gramnegatives Bakterium bilden auch *E. coli*-Bakterien Membranbläschen aus der äußeren Bakterienhülle, sogenannte Außenmembranvesikel (engl.: *outer membrane vesicles*; OMV). Mit ihnen applizieren die Bakterien hochkonzentriert Virulenzfaktoren, weshalb die Vesikel auch als bakterielle Bomben bezeichnet werden können (Amano, Takeuchi und Furuta, 2010). Nach derzeitigem Kenntnisstand besitzen die OMV jedoch auch darüber hinaus vielfältige weitere Funktionen, beispielsweise in Kommunikation, Transport und Abwehr.

In dieser Arbeit wurde versucht, die Auswirkungen von Vesikel während der Infektion zu beleuchten, wobei der Schwerpunkt auf der Untersuchung der Vesikelbildung im Wachstumskurvenverlauf lag. Durch Nutzung einer neuen Quantifizierungsmethode war es dabei erstmalig möglich die Vesikelproduktion zu quantifizieren.

1. Diskussion der Methode

In der Arbeitsgruppe wurde eine kostengünstige und schnelle Methode zur Quantifizierung von OMV mittels Durchflusszytometrie entwickelt, die es ermöglicht ohne zusätzlichen Waschschrift die Vesikelkonzentration zu messen. Die Methode basiert auf dem Einsatz eines Farbstoffes, der ausschließlich in Phospholipiddoppelmembranen eingelagert, als Fluoreszenzfarbstoff fungiert. Das von ihm emittierte Fluoreszenzlicht kann im Detektor des Durchflusszytometers erkannt und das Signal entsprechend weiterverarbeitet werden. Mit dieser Methode ist es möglich, die nur einige Nanometer großen Vesikel in einem optischen System als Ereignisse zu registrieren. Zudem kann auf Grundlage der Intensität der Fluoreszenz ein Größenprofil der gemessenen Partikel erstellt werden (Wieser et al., 2014).

Wie bei den meisten Methoden gibt es auch hier einige potenzielle Fehlerquellen. So ist es beispielsweise denkbar, dass mehrere zusammengelagerte Vesikel als nur ein (größeres) Ereignis registriert werden. Obwohl die Verfälschungen als gering eingeschätzt werden können, würde die Vesikelanzahl damit zu niedrig gemessenen. Ähnliches würde passieren, wenn die Ereignisanzahl 10.000 pro Sekunde überschreitet. Ab dieser Konzentration sind die Partikel im verwendeten Durchflusszytometer Canto II (BD, Heidelberg), nach Datenblatt des Herstellers, nicht mehr einzeln detektierbar. Um dieses Fehlerpotential auszuräumen, wurde für die Messung höherer Vesikelkonzentrationen immer eine angepasste Verdünnungsstufe eingesetzt. Dies stellt sicher, dass die einzelnen OMV die Messkammer als individuell detektierte Ereignisse passieren.

Mit entsprechender Vorbereitung erlaubt diese Methode demnach eine ausreichend genaue Bestimmung der Vesikelanzahl direkt aus dem Kulturmedium. Somit stellt die Nutzung der Durchflusszytometrie eine zeitsparende Quantifizierungsmethode für Vesikel dar. Die Alternativen bestehen beispielsweise in der Nutzung von Rasterkraft- und Elektronenmikroskopie. Durch beide Verfahren lassen sich Vesikel direkt darstellen, ihre Größe beurteilen und eine Zählung wäre mit einem entsprechend hohen technischen und zeitlichen Aufwand im Rasterkraft- und Elektronenmikroskop theoretisch denkbar (Work, Knox und Vesk, 1966; Kolling und Matthews, 1999; Schwechheimer, Sullivan und Kuehn, 2013). Praktisch weist dies jedoch ein hohes Fehlerpotential auf, da die Fixierungseffizienz für diese bildgebenden Verfahren unklar ist und daher möglicherweise auch nur ein Bruchteil der OMV detektiert werden könnte, wodurch die Messungen massiv verfälscht würden. Des Weiteren ist eine ausreichende Stichprobengröße (Anzahl erfasster OMV je Probe) nur mit großem Aufwand realisierbar.

E Diskussion

Das weitaus gängigere und weniger aufwendige Vorgehen versucht die Bestimmung der Vesikelmenge über einzelne Komponenten. Für diese Methode werden beispielsweise der Anteil von Lipiden oder von Hüllproteinen OMP-F, -C und -A im zellfreien Kulturüberstand bestimmt (Horstman und Kuehn, 2002; McBroom, Johnson, Vemulapalli und Kuehn, 2006; Schild, Nelson, Bishop und Camilli, 2009; Jun et al., 2013). Jedoch ist bekannt, dass ausgewählte Bedingungen und Mutationen ein verändertes Protein-Lipid-Verhältnis herbeiführen, weshalb bei der Beurteilung beide Komponentenmessungen berücksichtigt werden sollten (Kulp und Kuehn, 2010). Der Nachteil dieses Verfahrens liegt zudem in der potenziellen Verfälschung der Ergebnisse durch nicht-vesikelassoziierte, bakterielle Bestandteile wie sezernierte Toxine oder Flagellenbruchstücke (Schwechheimer und Kuehn, 2013). Hinzu kommt, dass ein Stamm unterschiedliche Vesikelpopulationen produzieren kann, die sich in Größe und Zusammensetzung unterscheiden (Horstman und Kuehn, 2000; Berleman und Auer, 2013). Damit ist diese Methode maximal als semiquantitativ anzusehen und liefert keine validen Daten für die Vesikelanzahl oder deren Produktionsraten.

2. Diskussion der Ergebnisse

In der Literatur herrscht die Meinung vor, dass es sich bei der Vesikelbildung um einen weitgehend ubiquitären Prozess gramnegativer Bakterien handelt (Kuehn und Kesty, 2005; Macdonald und Kuehn, 2012). Die Entwicklung der Methode zur Vesikelquantifizierung mithilfe der Durchflusszytometrie erlaubt nun erstmals den Vergleich von Vesikelkonzentrationen (Anzahl/ Volumen) und Produktionsraten verschiedener Stämme.

In dieser Arbeit wurden neun *E. coli*-Stämme hinsichtlich ihrer Vesikelbildung untersucht, dabei wurden die Daten verschiedener Wachstumsphasen und Bedingungen verglichen.

2.1 *Wachstumskurven*

Vorher war es notwendig das Wachstumsverhalten der ausgewählten Stämme genauer zu beleuchten. Hierbei fiel auf, dass es trotz gleicher Kultivierungsbedingungen Unterschiede im Wachstumsverhalten der Stämme gibt (siehe Abbildung 7). So wurde beobachtet, dass sich die pathogenen Stämme nach dem Animpfen schneller an die neuen Bedingungen anpassten als die K12-Stämme und dadurch früher in die Phase des exponentiellen Wachstums übergingen. Ihre Fähigkeit in der stationären Phase höhere optische Dichten zu erzielen legt nahe, dass sie das angebotene Nährstoffangebot besser ausnutzen und den Lebensraum dichter besiedeln können als ihre apathogenen Verwandten.

In der Gruppe der Laborstämme hebt sich der Stamm MG1655 von den anderen beiden untersuchten Vertretern ab. Im Vergleich fällt auf, dass die Anpassungsphase vom MG1655 kürzer ist und er in der stationären Phase zu höheren optischen Dichten heranwächst. Diese Beobachtung könnte dadurch erklärbar sein, dass der Stamm MG1655 weniger durch Laborpassagen attenuiert ist und als Wildtypstamm verwendet werden kann (Durfee, Nelson und Baldwin, 2008). Die beiden anderen Laborstämme, Top10 und DH5 α , wurden durch genetische Modifikationen aus dem MG1655 entwickelt und haben dadurch scheinbar die Anpassungsfähigkeit des Wildtyps an die hier gewählten Bedingungen teilweise verloren.

2.2 *Vesikelkonzentration*

Ausgehend von den Wachstumskurven wurden die Probenentnahmezeitpunkte festgelegt. Dabei sollte sowohl in der Phase des exponentiellen Wachstums als auch in der stationären Phase die Vesikelkonzentration im Flüssigmedium der wachsenden Bakterienkultur bestimmt werden.

E Diskussion

Die Literatur beschreibt Vesikel als stabile Komponenten, die sich im Kulturmedium zeitabhängig anreichern (Horstman und Kuehn, 2000; McBroom und Kuehn, 2007). Aufgrund dieser Annahme könnte man davon ausgehen, dass die Vesikelkonzentration in der stationären Phase höher sein muss als die der Wachstumsphase. Die Durchflusszytometer-basierte Vesikelquantifizierung der Kulturüberstände zeigte jedoch, dass diese Aussage nicht pauschal zutrifft. Die erhobenen Daten (siehe Abbildung 9 bis Abbildung 11) weisen eine große Varianz auf, die unter anderem durch natürliche Schwankungen der Mikroorganismenkultur zu erklären sind. Trotzdem ist die Datenlage eindeutig. Es konnte gezeigt werden, dass die Vesikelkonzentration vieler Stämme nach initialem Anstieg in der Wachstumsphase im späteren Wachstumskurvenverlauf wieder abnimmt. Bereits gebildete Vesikel „verschwinden“ demnach im Zeitverlauf wieder aus dem Kulturüberstand.

Eine mögliche Hypothese für die Abnahme der Vesikelkonzentration im Wachstumsverlauf ist die dichteabhängig erhöhte Kollisions- und Fusionswahrscheinlichkeit von Vesikel und Bakterium bzw. auch Vesikel untereinander. Solche Fusionsereignisse wurden bereits durch andere Arbeitsgruppen beschrieben (Kadurugamuwa und Beveridge, 1999), wobei aktuell noch unklar ist, in welchem Ausmaß solche Verschmelzungen stattfinden und ob es sich um einen relevanten Faktor handelt. Dabei verdeutlicht das Beispiel der intestinal pathogenen Stämme, dass die zunehmende Dichte innerhalb der Bakterienkultur nicht der alleinige Grund für dieses Ergebnis sein kann. Alle drei untersuchten intestinal pathogenen Stämme besitzen einen nahezu identischen Wachstumskurvenverlauf. Dabei wurde für den Stamm #4782 eine im Zeitverlauf ansteigende Vesikelkonzentration beobachtet. Dieser Stamm produziert also bei zunehmender Dichte im Wachstumskurvenverlauf weiterhin Vesikel, die sich im Medium anreichern. Unter gleichen Bedingungen nimmt die Vesikelkonzentration bei den beiden anderen intestinal pathogenen Stämmen jedoch ab. Sie scheinen ihre Vesikelproduktion nach der Phase des exponentiellen Wachstums stark zu drosseln und Vesikel scheinbar aus dem Kulturüberstand wieder aufzunehmen.

Aufgrund der beschriebenen Beobachtungen lässt sich die Hypothese aufstellen, dass Bakterien die Vesikelkonzentration ihrer Umgebung nicht nur durch die Anpassung der Produktion, sondern auch durch Wiederaufnahme beeinflussen können. Welche Faktoren dazu führen, dass Bakterien die Vesikelkonzentration in die eine oder andere Richtung verändern, lässt sich aus dem durchgeführten Experiment nicht grundsätzlich ableiten. Insbesondere, da die Mehrzahl der untersuchten Stämme zwar eine Tendenz aufweist, aber in den Versuchen sowohl zu einer Vesikelakkumulation als auch zu einer Resorption im Wachstumskurvenverlauf fähig waren.

Interessante Ergebnisse lieferte auch der Vergleich der Vesikelkonzentration der einzelnen Stämme untereinander. Da bereits eine andere Arbeitsgruppe eine bis zu 10-fach höhere Vesikelkonzentration beim enterotoxischen *E. coli*-Stamm ETEC2 (ATCC 43886) im Vergleich zum Laborstamm HB101 beschrieben hatte, wurde eine hochregulierte Vesikelproduktion bei pathogenen Stämmen postuliert (Horstman und Kuehn, 2000). Dabei basieren diese Ergebnisse auf der Bestimmung von OMV-Komponenten, wobei die Fehlerpotentiale dieser Methodik bereits im vorangegangenen Abschnitt (E Ergebnisse, 1. Diskussion der Methode) ausgeführt wurden. Die in dieser Arbeit mit Durchflusszytometer erhobenen Daten konnten die Beobachtung der hypervesikulierenden pathogenen Stämme pauschal jedenfalls nicht bestätigen. Unter stressfreien Wachstumsbedingungen lag die mittlere gemessene Vesikelkonzentration des Laborstammes DH5 α zu beiden untersuchten Zeitpunkten über dem Durchschnitt der gewählten sechs prototypischen pathogenen Vertreter. Bei den beiden anderen untersuchten Laborstämmen hingegen wurde zu beiden Zeitpunkten eine im Vergleich zu den pathogenen Stämmen erniedrigte Vesikelkonzentration beobachtet. Durch seine hohen Vesikelkonzentrationen hebt sich der Laborstamm DH5 α damit deutlich von den anderen beiden Vertretern ab.

2.3 Vesikelproduktion

Hauptziel dieser Arbeit war jedoch nicht die Bestimmung von Vesikelkonzentrationen aus dem Kulturüberstand, sondern die Ermittlung von Vesikelproduktionsraten verschiedener Stämme unter ausgewählten Bedingungen, sowie in verschiedenen Phasen des bakteriellen Wachstums (siehe Abbildung 12 bis Abbildung 15). Auch hier lag ein besonderes Augenmerk auf dem Vergleich der Vesikelproduktionsraten zwischen den einzelnen Gruppen: den apathogenen Laborstämmen, den intestinalen pathogenen und den extraintestinal pathogenen *E. coli*-Stämmen.

Da vorher keine geeigneten Methoden vorlagen, war es auch schwierig die Größenordnung der Vesikelproduktionsraten abzuschätzen. Als Bezugseinheit wurde eine bakterielle Stunde (KbE x h) eingeführt und die höchste in der Wachstumsphase unter stressfreien Bedingungen gemessene Vesikelproduktion lag bei $20,1 \times 10^{-3}$ OMV/KbE x h für den intestinal pathogenen Stamm #4559. Für natürlich gebildete OMV war bereits bekannt, dass sie nur in einer geringen Konzentration gebildet werden (Baker, Chen, Rosenthal, Putnam und DeLisa, 2014). Trotzdem überrascht das Ergebnis, der ermittelten Vesikelproduktionsrate eines einzelnen *E. coli*-

Bakteriums. Die Produktionsrate ist erstaunlich gering. Vor allem wenn man bedenkt, welche vielfältigen Aufgaben den Außenmembranvesikeln zugesprochen werden.

2.3.1 Phase des exponentiellen Wachstums

Die erste Wachstumsphase, die untersucht wurde, war die Phase des exponentiellen Wachstums, welche in der Literatur als die Phase mit der höchsten Produktionsrate beschrieben wurde (McBroom und Kuehn, 2007). Es wurde die Vesikelproduktionsrate im Wachstum unter drei verschiedenen Bedingungen getestet.

Dabei fielen bereits unter stressarmen Wachstumsbedingungen in LB-Medium deutliche Unterschiede in der Vesikelproduktionsrate auf (siehe Abbildung 12). Es konnten signifikante Unterschiede in der Vesikelproduktion innerhalb der Gruppe der intestinal pathogenen und der extraintestinal pathogenen *E. coli* verzeichnet werden. Hier hoben sich der Stamm #4559 und der uropathogene UT189 durch eine signifikant erhöhte Vesikelproduktion innerhalb der Gruppe von den beiden anderen Vertretern ab. Lediglich bei den Laborstämmen konnten keine signifikanten Unterschiede festgehalten werden, auch wenn die mittlere Vesikelproduktionsrate deutlich variiert. Jedoch streuten die einzelnen Messwerte trotz standardisierter Anzuchtbedingungen beträchtlich. Insgesamt deuten die erhobenen Ergebnisse daraufhin, dass jeder *E. coli*-Stamm seine individuelle Vesikelproduktionsrate besitzt.

Interessant erschien auch der Vergleich der Vesikelproduktionsrate zwischen verschiedenen Bedingungen. In dieser Arbeit wurden zwei Stressoren, saurer pH-Wert und Eisenmangel, getestet. Dabei ließen sich durch die einwirkenden Stressoren keine gleichförmige Vesikelproduktionsanpassung innerhalb der getesteten drei *E. coli*-Untergruppen feststellen.

Die Messwerte der Laborstämme (siehe Abbildung 13) variierten stark, weshalb sich nur im Fall des Stammes Top10 eine signifikante ($p < 0,05$) Vesikelproduktionssteigerung unter Einwirkung des Stressors saurer pH-Wert ergab. Jedoch zeigt der Vergleich der Mittelwerte eine einheitliche Tendenz der Vesikelproduktionsanpassung der einzelnen Stämme unter den getesteten Bedingungen. So reagiert der Laborstamm Top10 nicht nur auf den sauren pH-Wert mit einer erhöhten Vesikelbildung, sondern auch auf die Eisenmangelbedingung. Es scheint als würde die Vesikelbildungsrate unter stressfreien Wachstumsbedingungen auf einem niedrigen Ausgangsniveau gehalten und erst unter Einfluss von Stressoren hochreguliert. Auch eine Suppression der Vesikelbildung beim Wachstum in LB-Medium zu Gunsten der Zellteilung wäre denkbar. Trotz enger genetischer Verwandtschaft wurde beim MG1655 ein gegenteiliges Verhalten beobachtet, da die Vesikelbildung unter beiden getesteten Stressbedingungen supprimiert wurde. Der dritte untersuchte Laborstamm hingegen hielt seine vergleichbar hohe

E Diskussion

Vesikelbildungsrate unter allen getesteten Bedingungen stabil. Wobei sich nicht klären lässt, ob die Vesikelbildung des Stammes DH5 α bereits unter stressfreien Wachstumsbedingungen so hochreguliert ist, dass durch die Stressoren keine weitere Steigerung erreicht werden kann, oder ob die gewählten Bedingungen lediglich nicht die Vesikelproduktion ausreichend stimulieren konnten.

In Zusammenschau der erhobenen Daten lässt sich festhalten, dass jeder der drei Laborstämme ein anderes Verhalten unter Einfluss der Stressoren zeigte. Obwohl diese Beobachtung in einer Gruppe eng verwandter Stämme zunächst eher ungewöhnlich erscheint, wurde ein ähnlich divergentes Verhalten von Stämmen einer anderen Bakterienspezies mit hoher genetischer Übereinstimmung während des Wachstums in Mangelmedium bereits beschrieben (Kulp und Kuehn, 2010).

Neben den Laborstämmen wurden auch pathogene *E. coli*-Gruppen untersucht. Zum einen handelte es sich um die intestinal pathogenen *E. coli*, deren angestammtes Infektionsgebiet der Darm ist und die, an das saure Milieu der Harnwege angepassten, extraintestinal pathogenen *E. coli*. Ausgehend von der Vermutung, dass Vesikel während der Wirtsinfektion eine bedeutende Rolle spielen (vgl. Li, Clarke und Beveridge, 1998; Kaparakis-Liaskos und Ferrero, 2015), wurde angenommen, dass die Vesikulation durch Wirtsmilieu-typische Bedingungen angeregt wird (Ellis und Kuehn, 2010).

Im Fall der untersuchten extraintestinal pathogenen *E. coli*-Stämme konnten zwar keine signifikanten Unterschiede erhoben werden, trotzdem lassen die Mittelwerte Rückschlüsse auf eine mögliche, tendenzielle Beeinflussung der Vesikelbildung durch den Stressor zu. Es zeigte sich, dass während CFT073 seine Vesikelproduktionsrate unter den getesteten Stressbedingungen stabil hält, beim Stamm 536 eine Steigerung verzeichnet werden konnte. Hingegen fiel beim UTI89 die Vesikelproduktion im sauren Milieu tendenziell niedriger aus als in reichem Medium. Folglich ist festzuhalten, dass ein saurer pH-Wert allein nicht ausreicht, um die Vesikulation der ExPEC-Stämme einheitlich zu beeinflussen.

Für das Überleben der ExPEC in den ableitenden Harnwegen wird neben der Anpassung an einen sauren pH-Wert aber auch eine Anpassung an Eisenmangelbedingungen benötigt (Kaper, Nataro und Mobley, 2004). Um sich in der Wirtsumgebung ausreichend essentielles Eisen zu sichern, bedienen sich pathogene *E. coli* unter anderem spezieller Eisenrezeptoren in der äußeren Bakterienmembran (Garcia, Brumbaugh und Mobley, 2011, Kamada, Chen, Inohara und Núñez, 2013). Zudem wurden auch OMV als Werkzeug zur Beschaffung von wichtigen Nährstoffen wie Eisen beschrieben (Kulp und Kuehn, 2010). Eine höhere Vesikelproduktionsrate könnte folglich die Überlebenschancen unter Eisenmangelbedingungen erhöhen. Vergleicht

man die Mittelwerte der Vesikelproduktionsrate unter Eisenmangel und in reichem LB-Medium, so zeigen alle untersuchten ExPEC-Stämme eine Tendenz zur Steigerung der Vesikelkonzentration unter Eisenmangel. Im Fall des Stamms 536 konnte sogar ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Bedingungen gezeigt werden.

Auch beim intestinal pathogenen *E. coli* #4786 wurde ein signifikanter Anstieg der Vesikelproduktionsrate unter Eisenmangelbedingung verzeichnet (siehe Abbildung 14). Bei den beiden anderen Vertretern ließ sich analog zu der Gruppe der ExPEC nur eine Tendenz zur verstärkten Vesikulation feststellen. Es ist jedoch hervorzuheben, dass alle untersuchten pathogenen *E. coli* im Mittel eine höhere Vesikelproduktionsrate beim Wachstum unter Eisenmangelbedingung im Vergleich zu reichem Medium aufwiesen. Diese Beobachtung bekräftigt die Hypothese, dass OMV eine wichtige Rolle bei der Beschaffung von essenziellem Eisen spielen könnten und eine Hypervesikulation Überlebensvorteile für die Bakterien beim Wachstum unter Eisenmangelbedingungen bedingen könnte.

Das Verhalten der Vesikelproduktionsrate der intestinal pathogenen *E. coli*-Stämme wurde auch in saurem Milieu untersucht. Da diese darmpathogenen Stämme keine besondere Anpassung an ein saures Milieu aufweisen, wurde auch keine spezifische Beeinflussung durch diesen Stressor erwartet. Im Ergebnis lassen sich auch hier keine signifikanten Unterschiede zur Vesikelproduktionsrate in reichem Medium feststellen.

Es lässt sich zusammenfassen, dass keiner der untersuchten Stressoren eine einheitliche, signifikante Vesikelproduktionssteigerung auslösen konnte, obwohl sie an die Bedingungen während einer Wirtsinfektion angelehnt sind. Zudem hatten verschiedene Arbeitsgruppen bereits eine gesteigerte Vesikelmenge unter Wirts-typischen Bedingungen beschrieben (vgl. Baker, Chen, Rosenthal, Putnam und DeLisa, 2014). Jedoch ist das Wirtsmilieu gekennzeichnet durch eine Vielzahl an verschiedenen Einflüssen, die auf die Bakterien einwirken. Damit lässt sich das Ergebnis der, in dieser Arbeit isoliert getesteten Stressoren, nicht vollständig auf die realen Bedingungen während einer Infektion übertragen und bieten nur einen Einblick in einen kleinen Ausschnitt möglicher Regulationsphänotypen der Erreger.

Trotzdem war eine gesteigerte Vesikelproduktion unter den getesteten Stressbedingungen anzunehmen, da eine erhöhte Vesikulation zudem auch als unabhängige Antwort der Bakterien auf Stressoren publiziert wurde (McBroom und Kuehn, 2007). Zusätzlich wurde auch ein Zusammenhang zwischen einer gesteigerten Vesikelbildung und einem aktivierten σ^E Stressweg (Ellis und Kuehn, 2010; Macdonald und Kuehn, 2013) hergestellt. Doch die Ergebnisse dieser Arbeit verdeutlichen, dass die Einflussnahme auf die Vesikelproduktion nicht durch alle Stressoren in gleichem Maß stattfindet.

2.3.2 Stationäre Phase

Neben der Untersuchung der Vesikelproduktionsrate in der Phase des exponentiellen Wachstums sollte auch die der stationären Phase bestimmt werden. Aus methodischen Gründen war es nicht möglich die Vesikelproduktionsrate unter diesen Bedingungen direkt zu bestimmen. Ein zweiter Waschschrift zu Beginn des Beobachtungszeitraums in der stationären Phase veränderte den Wachstumskurvenverlauf wie es Abbildung 16 veranschaulicht. Es wird deutlich, dass nach Austausch des Mediums zu Beginn der stationären Phase die Bakterienkultur erneut in ein exponentielles Wachstum übergeht. Möglicherweise ausgelöst durch die erneute Zufuhr von zuvor verbrauchten Nährstoffen. Außerdem sammeln sich während des normalen Wachstumskurvenverlaufs zunehmend Stoffwechselendprodukte an, welche während des Austauschs des Mediums mit entfernt wurden. Zusätzlich nutzen Bakterien *Quorum-Sensing*, um die Zelldichte zu regulieren (Waters und Bassler, 2005; Popat, Cornforth, McNally und Brown, 2015). Mit dem Waschschrift werden auch die möglicherweise vorhandenen Signalmoleküle entfernt und die Bakterienkultur verliert vorübergehend die Orientierung die Zelldichte betreffend, während zeitgleich das unverbrauchte Medium mit der hohen Dichte an Nährstoffen die Zellteilung stimuliert. Durch das erneute exponentielle Wachstum wurden zudem höhere optische Dichten am Ende des Beobachtungszeitraums erreicht. Folglich ist damit die Entwicklung der Bakterienkultur nach einem zweiten Waschschrift keinesfalls als repräsentativ für die stationäre Phase anzusehen, da hier definitionsgemäß die Bakterienanzahl weitgehend konstant bleibt. Als alternatives Vorgehen wäre ein Waschschrift mit vesikelfreiem Medium einer stationären Bakterienkultur des gleichen Stammes denkbar gewesen, um die Zusammensetzung des Kulturmediums annähernd konstant zu halten. Dafür würden große Mengen vesikelfreies, steril filtriertes Medium aus der stationären Phase des jeweiligen gleichen Bakterienstammes für alle drei Bedingungen benötigt. Da aufgrund der geringen Größe der Vesikel eine Entfernung aus dem Medium nur mittels Ultrazentrifugation möglich ist, wäre dieses Vorgehen mit einem unverhältnismäßig großen technischen Aufwand verbunden gewesen, weshalb ein alternativer Ansatz gefunden werden musste. Da zur Berechnung der Produktion ein Ausgangswert benötigt wurde, sollte die Bestimmung der Vesikelproduktion in der stationären Phase durch die Messung der Vesikelkonzentration zu Beginn und am Ende des Beobachtungszeitraums stattfinden. Die Differenz der beiden bestimmten Vesikelkonzentrationen entspricht dann der Nettoproduktion. Dabei wurden die Ergebnisse als Quotienten aus der bestimmten Vesikelkonzentration nach 12 Stunden Wachstum durch den 10-Stunden-Wert aufgearbeitet. Die Ergebnisse der Nettoproduktion im 2-Stunden-Intervall der stationären Phase sind in der Abbildung 17 bis Abbildung 21 dargestellt. Hier zeigt sich, dass die meisten Stämme beim Wachstum unter stressarmen Bedingungen einen Quotienten >1 haben,

was einer Vesikelakkumulation im Zeitverlauf entspricht. Eine Vesikelzunahme im Zeitverlauf wurde bereits in der Literatur vorbeschrieben (Horstman und Kuehn, 2002). Unter Einwirkung von externen Stressoren, wie Eisenmangel oder niedrigem pH-Wert, fielen die Quotienten im Schnitt niedriger aus. Es kam demnach nicht zu einem ähnlich hohen Anstieg der Vesikelkonzentration, wie im Wachstum in reichem LB-Medium. Damit ist anzunehmen, dass das Einwirken der Stressoren zu einer reduzierten Vesikelproduktion in der stationären Phase führt. Somit kann zusammengefasst werden, dass die einwirkenden Stressbedingungen in der exponentiellen Phase teils zu einer gesteigerten Vesikelproduktionsrate führten, während die gleichen Faktoren in der stationären Phase eher einen gegenteiligen Effekt im Sinne einer Abnahme der Vesikelanzahl zur Folge haben.

Zudem zeigt Abbildung 18, dass es auch unter einem stressarmen Wachstum in LB-Nährmedium zu einer Anpassung der Vesikelproduktion im Verlauf der Wachstumskurve kommt. Die hier aufgetragene theoretische Neuproduktion im Beobachtungszeitraum berechnet die durchschnittliche Vesikelproduktion unter der Annahme, dass die Produktionsraten der stationären Phase und der Phase des exponentiellen Wachstums identisch sind. Dabei visualisiert die Grafik, dass die theoretische Neuproduktion in der stationären Phase bei allen untersuchten Stämmen deutlich höher ist als die real gemessene Nettoproduktion. Damit wird die Aussage anderer Arbeitsgruppen bestätigt, dass die Phase des exponentiellen Wachstums mit der höchsten Vesikelproduktion einhergeht (McBroom und Kuehn, 2007).

Interessant ist auch die Tatsache, dass es bei der Analyse der Nettoproduktion im Beobachtungszeitraum der stationären Phase auch Quotienten <1 gab. Ein Quotient <1 bedeutet, dass die Vesikelkonzentration zu Beginn des Beobachtungszeitraums höher ist, als am Ende. Eine Abnahme der Vesikelkonzentration zwischen exponentieller Wachstumsphase und stationärer Phase wurde bereits oben erwähnt. Doch die beobachtete Reduktion der Vesikelkonzentration innerhalb eines kurzen Zeitabschnitts lässt eine schnelle Regulationsmöglichkeit vermuten. Allgemein konnte bislang eine gezielte Regulation der Vesikelproduktion im Laufe der bakteriellen Wachstumskurve nicht nachgewiesen werden. Die Ergebnisse dieser Arbeit legen eine Regulation nahe, jedoch lassen sich keine Rückschlüsse, über die im Einzelfall zugrunde liegenden spezifischen Mechanismen ableiten.

Zudem konnte bis jetzt nicht abschließend geklärt werden, ob es sich bei der beobachteten Reduktion der Vesikelkonzentration tatsächlich um eine Abnahme der Vesikelanzahl handelt oder ob dieser Effekt durch eine Limitation der Methode zu erklären ist. Ein möglicher Erklärungsansatz wäre das gleichzeitige Auftreten einer stark reduzierten Neuproduktion und Zusammenlagerungs- und Fusionsereignisse der Vesikel. Eine solche Verschmelzung mehrerer

E Diskussion

Vesikel untereinander würde in einer Reduktion der messbaren Partikel im Durchflusszytometer resultieren. Da bei der Quantifizierung mittels Durchflusszytometer auch ein Größenprofil erstellt wird (Wieser et al., 2014), würde eine massive Fusionierung von Vesikeln auffallen. Eine solche Größenzunahme der Vesikel im Verlauf der Wachstumskurve konnte jedoch nicht beobachtet werden. Folglich ist anzunehmen, dass dieser Mechanismus nicht als hauptverantwortlich für die beobachtete Abnahme im Zeitverlauf ist.

Eine weitere mögliche Erklärung für die abnehmende Konzentration im Überstand ist auch eine Adhäsion von Vesikel an Bakterien oder eine Materialanheftung ans Probengefäß. Schließlich ist auch eine Wiederaufnahme der Vesikel in die bakterielle Hülle denkbar und wurde bereits in der Literatur vorbeschrieben (Kadurugamuwa und Beveridge, 1999; Ellis und Kuehn, 2010; Berleman und Auer, 2013). Überwiegen die OMV-reduzierenden Prozesse im Vergleich zur Neuproduktionsrate kommt es zwangsläufig zu einer Reduktion der Vesikelanzahl im Zeitverlauf.

2.4 Wiederaufnahme

Vesikel können nicht nur untereinander, sondern auch mit Wirtszellen und Bakterien verschmelzen (Kadurugamuwa und Beveridge, 1999; Ellis und Kuehn, 2010; Berleman und Auer, 2013). Die Möglichkeit der Vesikelreduktion durch Fusion mit dem Ursprungsbakterium wurde in einem Experiment in dieser Arbeit untersucht und exemplarisch für den extraintestinal pathogenen *E. coli*-Stamm 536 nachgewiesen. Durch den Einsatz Strep-Tag-markierter Vesikel konnte der Verbleib der Vesikel in der Bakterienkultur im Zeitverlauf nachverfolgt werden. Es zeigte sich eine Aufnahme bereits nach 30-minütiger Koinkubation, die im weiteren Zeitverlauf anstieg. Im beispielhaften Western Blot in Abbildung 22 ist die Wiederaufnahme von Vesikel durch die Bakterien dargestellt. Es findet demnach bereits nach einem vergleichsweise kurzen Zeitabschnitt eine Aufnahme der Vesikel in die äußere, bakterielle Hülle statt. Es ist also anzunehmen, dass innerhalb einer Bakterienkultur ein Membranenfluss stattfindet, indem Vesikel reabsorbiert und gebildet werden. Dabei wurde beschrieben, dass mit den OMV unter anderem auch DNA, Proteine oder Toxine transportiert werden. Entsprechend des Transportgutes kann dabei die Aufnahme eines Vesikels entweder einen Vorteil für den Empfänger mit sich bringen oder es stellt eine Attacke dar (Olsen und Amano, 2015). Denn während Vesikel zum einen genutzt werden, um sich in einer Mischkultur konkurrierender Bakterien zu entledigen (Kulkarini 2014), kann zum anderen auch beispielsweise durch den Transport von DNA ein eventuell vorliegendes Wachstumsdefizit ausgeglichen werden (Berleman 2013). Zudem können auch Vesikel-assoziierte Betalaktamasen einwirkende Antibiotika neutralisieren und somit das Überleben Betalaktamase-negativer Stämme ermöglichen (Schaar 2011 und 2013). Effekte einer Fusion zwischen Vesikel und Bakterien wurden durch verschiedene Arbeitsgruppen vorbeschrieben, jedoch konnte die (Wieder-) Aufnahme von Vesikel bisher nicht quantifiziert werden. Auch im Reabsorptionsversuch dieser Arbeit ist der Anteil der aufgenommenen Vesikel nur semiquantitativ darstellbar.

Zusätzlich birgt der methodische Ansatz die Gefahr, dass eine feste Bindung der Vesikel an der Bakterienoberfläche als Fusion fehlgedeutet werden kann. Auch wenn dies angesichts der gründlichen Waschschrte keine wesentlichen Verfälschungen mit sich bringen sollte, lässt sich dies nicht mit letzter Sicherheit ausschließen.

Im Experiment wurde zudem eine vergleichsweise hohe Vesikelkonzentration eingesetzt. Wenn man davon ausgeht, dass es sich bei der Reabsorption um dichteabhängige Fusionsereignisse handelt, dann würde die Wiederaufnahme im Versuchsansatz überschätzt und das genaue Ausmaß innerhalb einer natürlichen Bakterienkultur wäre nicht sicher ableitbar.

Jedoch liefert das Beispiel der intestinal pathogenen *E. coli*-Stämme Hinweise, dass dichteabhängige Fusionsereignisse nicht allein verantwortlich sind für die Reduktion der Vesikelkonzentration. Die in dieser Arbeit untersuchten intestinal pathogenen Stämme besitzen im Wachstumskurvenverlauf nahezu identische optische Dichten, weisen aber ein gegenteiliges Verhalten der Vesikelkonzentration im Zeitverlauf (siehe E Diskussion, 2.2 Vesikelkonzentration) auf. Theoretisch denkbar wäre hierbei eine überproportional gesteigerte Vesikelreabsorption in Verbindung mit einer reduzierten Neuproduktion. Wahrscheinlicher erscheint die Überlegung, dass die Produktionsrate einen größeren Einfluss auf die Vesikelkonzentration hat als die Wiederaufnahme, da die Produktion besser steuerbar ist. Insbesondere da die Vesikelreabsorption nur nach dem Zufallsprinzip stattfinden kann, weil Vesikel nicht zu einer aktiven oder zielgerichteten Bewegung fähig sind.

2.5 Zellkulturversuch

Die weiterführenden Versuche sollten die Wirkung von OMV auf das Immunsystem untersuchen. Im Zellkulturversuch wurden dazu murine Makrophagen der Zelllinie J774 mit Bakterien infiziert und die Auswirkungen zusätzlich eingebrachter Vesikel beobachtet. Dabei wurde im Versuchsansatz eine vergleichsweise hohe Anzahl an Vesikel verwendet, wodurch gewährleistet werden sollte, dass die Anzahl der neu gebildeten Vesikel im Vergleich vernachlässigbar klein ist. Anschließend wurde untersucht, ob eine hohe Vesikelkonzentration mit einem Schutz vor Phagozytose durch die Makrophagen einhergeht.

Makrophagen gehören zu den Phagozyten und sind ein bedeutender Teil des angeborenen Immunsystems. Aktivierte Makrophagen eliminieren Erreger durch Phagozytose, präsentieren ihre Antigene den spezifischen Immunzellen und sorgen durch Abgabe proinflammatorischer Botenstoffe für die Stimulierung der Immunreaktion.

Um dem Immunsystem zu entgehen, haben Bakterien verschiedene Mechanismen entwickelt. So bedienen sie sich beispielsweise einer Kapsel, die sie vor der Oponierung durch Komplement schützen soll oder sezernieren Virulenzfaktoren, welche die Signalwege der Phagozyten stören und damit die koordinierte Phagozytose/Abtötung verhindern. Auch die, zuweilen als bakterielle Bomben bezeichneten, Vesikel transportieren Virulenzfaktoren und wurden auch als zusätzliches, eigenständiges Sekretionssystem beschrieben (Wai et al., 2003). Im Unterschied zu den anderen Sekretionssystemen gramnegativer Bakterien, erlaubt es dabei der Vesikel-basierte Transfer Effektorproteine ohne direkten Kontakt zur Zielzelle zu transportieren und sie hochkonzentriert, punktuell suffizient wirksam einzusetzen. Durch diese

Eigenschaften ermöglicht es das Sekretionssystem via Vesikel die Phagozytoseabläufe zu beeinflussen, bevor die Phagozytose des Bakteriums eingeleitet wird.

In diesem Experiment konnte ein Überlebensvorteil für die Bakterien in der Versuchsgruppe mit höherer OMV-Konzentration nachgewiesen werden (Abbildung 23). Demnach wurden die Bakterien durch die zugegebenen Vesikel bis zu einem gewissen Grad vor der Phagozytose durch Makrophagen geschützt. Dabei ist es denkbar, dass die Vesikel-assoziierten Effektorproteine die Phagozytosefähigkeit der Makrophagen verringerten. Eine weitere Möglichkeit wäre die Auslastung der Phagozytosekapazität durch die OMV, denn die Vesikel ähneln der Außenhülle des Ursprungsbakteriums. Zwar sind einige Membranproteine entweder angereichert oder nicht vorhanden (Ellis und Kuehn, 2010), aber sie zeigen die spezifische Lipidasymmetrie und beinhalten vergleichbar viel LPS wie die äußere Bakterienmembran (Schooling und Beveridge, 2006). Es ist anzunehmen, dass es für einen Makrophagen schwer ist zu unterscheiden, ob es sich um ein Vesikel oder ein Bakterium handelt. Somit ist es vorstellbar, dass die kleineren Vesikel die Rezeptoren der Makrophagen besetzen und damit die Phagozytosekapazität auslasten bzw. den Phagozyten ablenken, sodass die aktiv schwimmenden Erreger weniger effizient aufgenommen werden können.

2.6 *Fluoreszenzmikroskopie*

Mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie sollte untersucht werden, inwieweit Makrophagen durch Vesikel aktiviert werden und wie sie mit ihnen wechselwirken. Auch hier wurden J774-Makrophagen mit Bakterien des uropathogenen Stamms 536 infiziert. In der Versuchsgruppe wurden zusätzliche aufgereinigte Vesikel eines Plasmid-tragenden 536-Stammes eingesetzt, welcher einen rot-fluoreszierenden Farbstoff produziert.

Im Ergebnis wurde in der Versuchsgruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe eine stärkere Pseudopodienbildung der Makrophagen, beobachtet (siehe Abbildung 24). Folglich führten die zusätzlich eingebrachten Vesikel zu einer ausgeprägten Aktivierung der Makrophagen. Zudem ermöglichte es der Einsatz der rot-fluoreszierenden Vesikel, ihren Verbleib im Versuchsansatz nachzuvollziehen. Im Makrophageninneren der Versuchsgruppe kamen rötliche granuläre Strukturen zur Darstellung, die in der Kontrollgruppe fehlten. Das legt den Rückschluss nahe, dass es sich dabei um phagozytierte Vesikel in Granula der Makrophagen handelt, wodurch sich auch die ausgeprägte Pseudopodienbildung erklären lässt.

Bereits im letzten Abschnitt wurde ausgeführt, dass zusätzliche Vesikel vermutlich durch einen Ablenkungs-/Absättigungseffekt zu einer verringerten Phagozytose von Bakterien führen. Jetzt

liefern die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen einen weiteren visuellen Hinweis für diese These, da Vesikel tatsächlich, in offensichtlich erheblichen Mengen, phagozytiert werden, wie die intrazellulären, roten Fluoreszenzsignale erkennen lassen.

2.7 Zytokine

Bereits andere Arbeitsgruppen beschrieben die Aktivierung von Immunzellen durch Vesikel. Zusätzlich gibt es Berichte, dass sie in der Lage seien, die Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine zu fördern und damit eine Entzündungsreaktion zu initiieren (Alaniz, Deatherage, Lara und Cookson, 2007; Ellis und Kuehn, 2010; Jun et al., 2013; Kaparakis-Liaskos und Ferrero, 2015).

Zytokine sind eine Gruppe kleiner Peptide und Proteine, die regulierend ins Immunsystem eingreifen und als Kommunikationssystem fungieren. Verschiedene Immunzellen schütten bedarfsabhängig Zytokine aus, die an einen spezifischen Rezeptor binden müssen, um ihre Wirkung zu entfalten. Nach dem *in-vitro* Versuch mit Makrophagen, wurden im nächsten Schritt die Wirkung zusätzlich eingebrachter Vesikel im Infektionsversuch der murinen Harnblase untersucht. Im Anschluss an die Infektion wurden die Spiegel von acht Zytokinen aus den homogenisierten Blasen bestimmt und zwischen den beiden Versuchsgruppen verglichen.

Sechs der untersuchten Zytokine besitzen eine chemotaktische Wirkung auf neutrophile Granulozyten, T-Zellen und dendritische Zellen. Zu diesen Chemokinen gehören KC, MCP-1, IL-17, MP-1 α , MP-1 β und TNF- α . All diese unter anderem chemotaktisch aktiven Stoffe wurden in der Versuchsgruppe durch die Anwesenheit zusätzlicher Vesikel zum gemessenen Zeitpunkt signifikant verringert ausgeschüttet oder gebildet. Die zwei übrigen Zytokine, INF γ und IL-6, verfügen über einen proinflammatorischen Effekt, auch hier wurden in der Vesikelgruppe weniger Zytokine ausgeschüttet. Im Fall des IL-6 war der Unterschied zur Kontrollgruppe auch signifikant. Damit ergibt sich interessanterweise für den murinen Harnblaseninfektionsversuch mit dem uropathogenen *E. coli*-Stamm 536 eine antichemotaktische und antiinflammatorische Wirkung zusätzlich eingebrachter Vesikel.

Diese Beobachtung überrascht im ersten Moment, da bakterielle Bestandteile wie LPS eine entzündliche Immunreaktion stimulieren sollten (Billips et al., 2007; Schubert, 2010; Macdonald und Kuehn, 2012). Die ausgelöste Entzündungsreaktion führt unter anderem dazu, dass Abwehrzellen wie neutrophile Granulozyten rekrutiert werden, um die vorhandene Bakterienanzahl zu dezimieren. Um dem zu entgehen, haben sich die uropathogenen Bakterien angepasst und versuchen ihrerseits durch suppressive Faktoren die Abwehrvorgänge des

E Diskussion

Wirtsorganismus auszubremsen und damit ihr Überleben zu sichern (Lee, Choi, Kim und Gho, 2008; Lloyd, Smith, Eaton und Mobley, 2009, Wieser, Guggenberger, Pritsch, Heesemann und Schubert, 2011). So beschrieben bereits verschiedene Arbeitsgruppen, dass UPEC die Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine wie beispielsweise IL-6 signifikant unterdrücken können, wie es auch in dieser Arbeit beobachtet wurde. Wobei der genaue Mechanismus der Modulation der Immunantwort noch nicht eindeutig geklärt ist, so wird unter anderem vermutet, dass uropathogene *E. coli*-Stämme im Gegensatz zu ihren apathogenen Verwandten in der Lage sind ein nur abgeschwächt oder sogar nicht-immunstimulierendes LPS zu exprimieren. Außerdem sezernieren extraintestinal pathogenen *E. coli* auch Toxine wie Hämolysin A (hlyA) und zytotoxisch-nekrotisierender Faktor 1 (CNF1), um die phagozytische Aktivität und Chemotaxis zu unterdrücken (Kaparakis-Liaskos und Ferrero, 2015; Olson und Hunstad, 2016). Dabei werden hlyA und CNF1 auch über *outer membrane vesicles* transportiert (Balsalobre et al., 2006; Davis, Carvalho, Rasmussen und O'Brien, 2006), wodurch sich auch der ausgeprägte antiinflammatorische und antichemotaktische Effekt in der Versuchsgruppe mit zugegebenen, aufgereinigten Vesikeln des uropathogenen Stamms 536 erklären könnte.

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass Vesikel den Bakterien nicht nur einen gewissen Phagozytoseschutz bieten, sondern auch ein Instrument sind, um das Zytokinprofil zu beeinflussen. Damit werden Vesikel genutzt, um regulierend auf zwei Komponenten des angeborenen Immunsystems einzuwirken und sind damit ein wertvolles Werkzeug während der Kolonialisierung und Infektion von Wirtsgeweben. Entsprechend ihrer Rolle stellen Vesikel damit gleichzeitig aber auch einen potenziellen Angriffspunkt für neue Therapieoptionen dar.

F Zusammenfassung

Die Bakterienspezies *Escherichia coli* ist ein bedeutender Vertreter der Enterobakterien. Neben den apathogenen Darmkommensalen gibt es auch pathogene *E. coli*-Stämme. Diese besitzen Virulenzfaktoren, welche eine effektive Infektion des Wirtes ermöglichen. Man unterscheidet bei *E. coli* verschiedene Pathotypen, die unterschiedliche Erkrankungen im Menschen verursachen können. In der Therapie dieser Infektionen stellt jedoch die steigende Anzahl an Antibiotikaresistenzen ein zunehmendes Problem dar. In der Pharmakologie wird durchgehend an der Entwicklung neuer Antibiotika geforscht, gleichzeitig sucht die Wissenschaft nach alternativen Therapieoptionen. Hierfür ist es erforderlich die Pathogenese von Infektionskrankheiten im Detail zu verstehen, um mögliche Angriffspunkte für die Behandlung oder Prävention zu isolieren. Ein Forschungsgegenstand stellen dabei die Außenmembranvesikel (*outer membrane vesicles*; OMV) dar, die von gramnegativen Bakterien wie *E. coli* gebildet werden. Diese kleinen Membranbläschen wurden in den letzten Jahren intensiv befolgt, um ihre Bedeutung für die Bakterien zu klären. Diese einige Nanometer großen Vesikel scheinen eine Vielzahl verschiedener Funktionen zu erfüllen. Bis heute ist jedoch wenig zum Mechanismus der OMV Produktion oder einer möglichen Regulierung bekannt.

In dieser Arbeit wurde unter Anwendung der kürzlich etablierten Methode der Vesikelquantifizierung mittels Durchflusszytometer die OMV-Produktion repräsentativer *E. coli*-Stämme untersucht. Die Nutzung dieser neuen Methode ermöglichte es erstmals, die Vesikelproduktion verschiedener Stämme abhängig von den Wachstumsbedingungen zu vergleichen. Dabei fokussiert sich diese Arbeit auf die Vesikelproduktion in der Phase des exponentiellen Wachstums und der stationären Phase.

Grundsätzlich wurde festgestellt, dass sich die Vesikelproduktion der einzelnen *E. coli*-Stämme teilweise signifikant unterscheidet und diese an die einwirkenden Umgebungsbedingungen angepasst wird. Somit variiert die Vesikelkonzentration des Kulturüberstandes im Wachstumskurvenverlauf ebenfalls deutlich. Es konnte keine einheitliche Reaktion aller Stämme auf Stressoren wie Eisenmangel oder saurer pH-Wert festgestellt werden. Jedoch reagierten die meisten untersuchten Stämme auf einwirkende Stressoren in der Wachstumsphase mit einer gesteigerten Produktion im Vergleich zu reichem Vollmedium. Interessanterweise führten in der stationären Phase die gleichen Stressoren zum Abfall der Vesikelkonzentration. Beide Ergebnisse sprechen für eine Regulation der Vesikelproduktion abhängig von den Lebensumständen der Erreger.

F Zusammenfassung

Neben der Vesikelproduktion wurden in dieser Arbeit auch ihre Wirkungen *in-vitro* und *in-vivo* untersucht. Hier zeigte die Anwesenheit zusätzlicher Vesikel einen Überlebensvorteil für Bakterien durch einen Phagozytoseschutz und die Dämpfung der proinflammatorischen Zytokinantwort.

Diese Arbeit beleuchtet einige Aspekte der Produktion und Funktion von Außenmembranvesikel gramnegativer Bakterien. Jedoch werden noch zahlreiche weitere Untersuchungen notwendig sein, um die Bedeutung und Funktion der Vesikel ausreichend zu verstehen und das erworbene Wissen dann in die klinische Praxis zu transferieren.

G Glossar

μ	mikro (10 ⁻⁶)
AK	Antikörper
APS	Ammoniumpersulfat
Aqua destillata	destilliertes Wasser
BSA	bovines Serum Albumin
CCD	engl. <i>charge coupled device</i> , Ladungsgekoppeltes Bauelement
CNF1	engl. <i>cytotoxic necrotizing factor 1</i> , zytotoxisch-nekrotisierende Faktor 1
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
<i>E. coli</i>	Abkürzung für <i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiaminetetraessigsäure
EPEC	enteropathogene <i>E. coli</i> -Stämme
et al.	lat. <i>et alii/et aliae/et alia</i> , bedeutet: „und andere“
EHEC	enterohämorrhagische <i>E. coli</i> -Stämme
ExPEC	extraintestinal pathogene <i>E. coli</i> -Stämme
FACS	engl. <i>fluorescence activated cell sorting</i> , Durchflusszytometrie
Genta	Gentamicin
h	Stunde
HCl	Chlorwasserstoff, Salzsäure
hlyA	engl. <i>Hemolysin A</i> , Hämolysin A
HRP	engl. <i>horse reddish peroxidase</i> , Meerrettichperoxidase
HUS	hämolytisch-urämisches Syndrom
HUSEC	engl. <i>haemolytic-uremic syndrome-associated E. coli</i> , <i>E. coli</i> assoziiert mit hämolytisch-urämischem Syndrom
HWI	Harnwegsinfekt
IFN γ	Interferon gamma
IL-17	Interleukin 17
IL-6	Interleukin 6
IPEC	intestinalpathogene <i>E. coli</i> -Stämme

G Glossar

KbE	koloniebildende Einheiten (engl.: <i>colonie forming units</i> , kurz: CFU)
KbE × h	bakterielle Stunde, eingeführte Maßeinheit der bakteriellen Lebenszeit
KC	Keratinocyten Lockstoff = N51, entspricht humanen IL8
KCl	Kaliumchlorid
l	Liter
LB/ LB-Medium	Luria-Bertani-Medium, Bakteriennährmedium
LPS	Lipopolysaccharid
m	milli (10^{-3})
MCP-1	Monozyten chemotaktisches Protein 1 = CCL2
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MH	Müller-Hinton, Bakteriennährmedium
min	Minute
MOI	engl. <i>multiplicity of infection</i> , Multiplizität der Infektion
MP-1 α	Makrophagen-Inflammationsprotein alpha = CCL3
MP-1 β	Makrophagen-Inflammationsprotein beta = CCL4
MW	Mittelwert
n	nano (10^{-9})
n	Anzahl der Wiederholungen
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
OD ₆₀₀	optische Dichte bei 600 nm
OMP	engl. <i>outer membrane protein</i> , Protein der äußeren Bakterienmembran
OMV	engl. <i>outer membrane vesicles</i>
PBS	engl. <i>phosphate buffered saline</i> , Phosphat gepufferte Salzlösung
PFA	Paraformaldehyd
pH	lat. <i>potentia Hydrogenii</i> , pH-Wert
rpm	engl. <i>rotation per minute</i> , Umdrehungen pro Minute
SDS	engl. <i>sodium dodecyl sulfate</i> , Natriumdodecylsulfat
SD	engl. <i>standard deviation</i> , Standardabweichung
SEM	engl. <i>standard error of the mean</i> , Standardfehler des Mittelwerts
SOC	Bakteriennährmedium
SPF	engl. <i>specific pathogen free</i> , spezifisch Pathogen- frei

G Glossar

spp.	Spezies (pl.)
TEMED	Tetramethyldiamin
TNF α	Tumornekrosefaktor alpha
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
Tween(n)	Polyoxyethylen(n) -sorbitan-monolaureat
U	engl. <i>units</i> , Einheiten
ÜN	über Nacht
UPEC	uropathogene <i>E. coli</i> -Stämme
UZ	Ultrazentrifuge
V	Volt
v/v	Volumen Komponente / Volumen Lösungsmittel
w/v	engl. <i>weight</i> (Gewicht) Komponente / Volumen Lösungsmittel
WT	Wildtyp

H Literatur

1. Ackermann, N., M. Tiller, G. Anding, A. Roggenkamp, J. Heesemann (2008). "Contribution of trimeric autotransporter C-terminal domains of oligomeric coiled-coil adhesin (Oca) family members YadA, UspA1, EibA, and Hia to translocation of the YadA passenger domain and virulence of *Yersinia enterocolitica*." *J Bacteriol* 190(14): 5031-5043.
2. Alaniz, R. C., B. L. Deatherage, J. C. Lara, B. T. Cookson (2007). "Membrane vesicles are immunogenic facsimiles of *Salmonella typhimurium* that potently activate dendritic cells, prime B and T cell responses, and stimulate protective immunity in vivo." *The Journal of Immunology* 179: 7692-7701.
3. Allocati, N., M. Masulli, M. F. Alexeyev, C. Di Ilio (2013). "Escherichia coli in Europe: an overview." *Int J Environ Res Public Health* 10(12): 6235-6254.
4. Amano, A., H. Takeuchi, N. Furuta (2010). "Outer membrane vesicles function as offensive weapons in host-parasite interactions." *Microbes and Infection* 12(11): p. 791-798.
5. Bachmann, B. J. (1972). "Pedigrees of some mutant strains of *Escherichia coli* K-12." *Bacteriological Reviews* 36(4): 525-557.
6. Baker, J. L., L. Chen, J. A. Rosenthal, D. Putnam, M. P. DeLisa (2014). "Microbial biosynthesis of designer outer membrane vesicles." *Curr Opin Biotechnol* 29: 76-84.
7. Balsalobre, C., J. M. Silvan, S. Berglund, Y. Mizunoe, B. E. Uhlin, S. N. Wai (2006). "Release of the type I secreted alpha-haemolysin via outer membrane vesicles from *Escherichia coli*." *Mol Microbiol* 59(1): 99-112.
8. Berger, H., J. Hacker, A. Juarez, C. Hughes, W. Goebel (1982). "Cloning of the chromosomal determinants encoding hemolysin production and mannose-resistant hemagglutination in *Escherichia coli*." *J Bacteriol* 152(3): 1241-1247.
9. Berleman, J., M. Auer (2013). "The role of bacterial outer membrane vesicles for intra- and interspecies delivery." *Environ Microbiol* 15(2): 347-354.
10. Bernadac, A., M. Gavioli, J. C. Lazzaroni, S. Raina, R. Llobes (1998). "Escherichia coli tol-pal mutants form outer membrane vesicles." *J Bacteriol* 180(18): 4872-4878.
11. Beveridge, T. J. (1999). "Structures of Gram-Negative Cell Walls and Their Derived Membrane Vesicles." *Journal of Bacteriology* 181(16): 4725-4733.
12. Biller, S. J., F. Schubotz, S. E. Roggensack, A. W. Thompson, R. E. Summons, S. W. Chisholm (2014). "Bacterial vesicles in marine ecosystems." *Science* 343(6167): 183-186.
13. Billips, B. K., S. G. Forrestal, M. T. Rycyk, J. R. Johnson, D. J. Klumpp, A. J. Schaeffer (2007). "Modulation of host innate immune response in the bladder by uropathogenic *Escherichia coli*." *Infect Immun* 75(11): 5353-5360.
14. Bishop, D. G., E. Work (1965). "An extracellular glycolipid produced by *Escherichia coli* grown under lysine-limiting conditions." *Biochem J* 96(2): 567-576.
15. Blattner, F. R., G. Plunkett, 3rd, C. A. Bloch, N. T. Perna, V. Burland, M. Riley, J. Collado-Vides, J. D. Glasner, C. K. Rode, G. F. Mayhew, J. Gregor, N. W. Davis, H. A. Kirkpatrick, M. A. Goeden, D. J. Rose, B. Mau, Y. Shao (1997). "The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12." *Science* 277(5331): 1453-1462.

16. Chen, S. L., C. S. Hung, J. Xu, C. S. Reigstad, V. Magrini, A. Sabo, D. Blasiar, T. Bieri, R. R. Meyer, P. Ozersky, J. R. Armstrong, R. S. Fulton, J. P. Latreille, J. Spieth, T. M. Hooton, E. R. Mardis, S. J. Hultgren, J. I. Gordon (2006). "Identification of genes subject to positive selection in uropathogenic strains of *Escherichia coli*: a comparative genomics approach." *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(15): 5977-5982.
17. Choi, K. S., S. H. Kim, E. D. Kim, S. H. Lee, S. J. Han, S. Yoon, K. T. Chang, K. Y. Seo (2014). "Protection from hemolytic uremic syndrome by eyedrop vaccination with modified enterohemorrhagic *E. coli* outer membrane vesicles." *PLoS One* 9(7): e100229.
18. Crossman, L. C., R. R. Chaudhuri, S. A. Beatson, T. J. Wells, M. Desvaux, A. F. Cunningham, N. K. Petty, V. Mahon, C. Brinkley, J. L. Hobman, S. J. Savarino, S. M. Turner, M. J. Pallen, C. W. Penn, J. Parkhill, A. K. Turner, T. J. Johnson, N. R. Thomson, S. G. Smith, I. R. Henderson (2010). "A commensal gone bad: complete genome sequence of the prototypical enterotoxigenic *Escherichia coli* strain H10407." *J Bacteriol* 192(21): 5822-5831.
19. Davis, J. M., H. M. Carvalho, S. B. Rasmussen, A. D. O'Brien (2006). "Cytotoxic Necrotizing Factor Type 1 Delivered by Outer Membrane Vesicles of Uropathogenic *Escherichia coli* Attenuates Polymorphonuclear Leukocyte Antimicrobial Activity and Chemotaxis." *Infection and Immunity* 74(8): p. 4401-4408.
20. Durfee, T., R. Nelson, S. Baldwin (2008). "The Complete Genome Sequence of *Escherichia coli* DH10B: Insights into the Biology of a Laboratory Workhorse." *Journal of Bacteriology* 190(7): 2597-2606.
21. Ellis, T. N., M. J. Kuehn (2010). "Virulence and immunomodulatory roles of bacterial outer membrane vesicles." *Microbiol Mol Biol Rev* 74(1): 81-94.
22. Evans, D. F., G. Pye, R. Bramley, A. G. Clark, T. J. Dyson, J. D. Hardcastle (1988). "Measurement of gastrointestinal pH profiles in normal ambulant human subjects." *Gut* 29(8): 1035-1041.
23. Garcia, E. C., A. R. Brumbaugh, H. L. Mobley (2011). "Redundancy and specificity of *Escherichia coli* iron acquisition systems during urinary tract infection." *Infect Immun* 79(3): 1225-1235.
24. Grant, S. G., J. Jessee, F. R. Bloom, D. Hanahan (1990). "Differential plasmid rescue from transgenic mouse DNAs into *Escherichia coli* methylation-restriction." *PNAS* 87(12): 4645-4649.
25. Hoekstra, D., J. W. van der Laan, L. de Leij, B. Witholt (1976). "Release of outer membrane fragments from normally growing *Escherichia coli*." *Biochim Biophys Acta* 455(3): 889-899.
26. Horstman, A. L., M. J. Kuehn (2000). "Enterotoxigenic *Escherichia coli* secretes active heat-labile enterotoxin via outer membrane vesicles." *J Biol Chem* 275(17): 12489-12496.
27. Horstman, A. L., M. J. Kuehn (2002). "Bacterial Surface Association of Heat-labile Enterotoxin through Lipopolysaccharide after Secretion via the General Secretory Pathway." *Journal of Biological Chemistry* 277(36): 32538-32545.
28. Ilchmann, Schroeder, Aepfelbacher (2002). "Aufgespürt - Trickreiche Färbung trennt Insider von Outsider." *Immunologie aktuell* 2(5): 210-213.
29. Johnson, J. R., T. A. Russo (2002). "Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*: "The other bad *E. coli*"." *J Lab Clin Med* 139(3): 155-162.

30. Jun, S. H., J. H. Lee, B. R. Kim, S. I. Kim, T. I. Park, J. C. Lee, Y. C. Lee (2013). "Acinetobacter baumannii outer membrane vesicles elicit a potent innate immune response via membrane proteins." *PLoS One* 8(8): e71751.
31. Kadurugamuwa, J. L., T. J. Beveridge (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." *J Bacteriol* 177(14): 3998-4008.
32. Kadurugamuwa, J. L., T. J. Beveridge (1996). "Bacteriolytic effect of membrane vesicles from *Pseudomonas aeruginosa* on other bacteria including pathogens: conceptually new antibiotics." *J Bacteriol* 178(10): 2767-2774.
33. Kadurugamuwa, J. L., T. J. Beveridge (1998). "Delivery of the nonmembrane-permeative antibiotic gentamicin into mammalian cells using *Shigella flexneri* membrane vesicles." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 42(6): 1476–1483.
34. Kadurugamuwa, J. L., T. J. Beveridge (1999). "Membrane vesicles derived from *Pseudomonas aeruginosa* and *Shigella flexneri* can be integrated into the surfaces of other Gram-negative bacteria." *Microbiology* 145: p. 2051-2060.
35. Kamada, N., Y. G. Chen, N. Inohara, G. Núñez (2013). "Control of pathogens and pathobionts by the gut microbiota." *Nature Immunology* 14(7): 685-690.
36. Kaparakis-Liaskos, M., R. L. Ferrero (2015). "Immune modulation by bacterial outer membrane vesicles." *Nat Rev Immunol* 15(6): 375-387.
37. Kaper, J. B., J. P. Nataro, H. L. Mobley (2004). "Pathogenic *Escherichia coli*." *Nat Rev Microbiol* 2(2): 123-140.
38. Kolling, G. L., K. R. Matthews (1999). "Export of virulence genes and Shiga toxin by membrane vesicles of *Escherichia coli* O157:H7." *Appl Environ Microbiol* 65(5): 1843-1848.
39. Kuehn, M. J., N. C. Kesty (2005). "Bacterial outer membrane vesicles and the host-pathogen interaction." *Genes Dev* 19(22): 2645-2655.
40. Kulp, A., M. J. Kuehn (2010). "Biological functions and biogenesis of secreted bacterial outer membrane vesicles." *Annu Rev Microbiol* 64: 163-184.
41. Lee, E. Y., D. S. Choi, K. P. Kim, Y. S. Gho (2008). "Proteomics in gram-negative bacterial outer membrane vesicles." *Mass Spectrom Rev* 27(6): 535-555.
42. Lloubes, R., E. Cascales, A. Walburger, E. Bouveret, C. Lazdunski, A. Bernadac, L. Journet (2001). "The Tol-Pal proteins of the *Escherichia coli* cell envelope: an energized system required for outer membrane integrity?" *Res Microbiol* 152(6): 523-529.
43. Lloyd, A. L., S. I. Smith, K. A. Eaton, H. L. Mobley (2009). "Uropathogenic *Escherichia coli* Suppresses the Host Inflammatory Response via Pathogenicity Island Genes *sisA* and *sisB*." *Infection and Immunity* 77(12): 5322–5333.
44. Macdonald, I. A., M. J. Kuehn (2012). "Offense and defense: microbial membrane vesicles play both ways." *Research in Microbiology* 163(9-10): 607–618.
45. Macdonald, I. A., M. J. Kuehn (2013). "Stress-induced outer membrane vesicle production by *Pseudomonas aeruginosa*." *J Bacteriol* 195(13): 2971-2981.
46. Mashburn, L. M., M. Whiteley (2005). "Membrane vesicles traffic signals and facilitate group activities in a prokaryote." *Nature* 437(7057): 422-425.

47. McBroom, A. J., A. P. Johnson, S. Vemulapalli, M. J. Kuehn (2006). "Outer Membrane Vesicle Production by *Escherichia coli* Is Independent of Membrane Instability." *Journal of Bacteriology* 188(15): p. 5385-5392.
48. McBroom, A. J., M. J. Kuehn (2007). "Release of outer membrane vesicles by Gram-negative bacteria is a novel envelope stress response." *Molecular Microbiology* 63(2): p. 545-558.
49. Mellmann, A., M. Bielaszewska, R. Kock, A. W. Friedrich, A. Fruth, B. Middendorf, D. Harmsen, M. A. Schmidt, H. Karch (2008). "Analysis of collection of hemolytic uremic syndrome-associated enterohemorrhagic *Escherichia coli*." *Emerg Infect Dis* 14(8): 1287-1290.
50. Mulvey, M. A., J. D. Schilling, S. J. Hultgren (2001). "Establishment of a persistent *Escherichia coli* reservoir during the acute phase of a bladder infection." *Infect Immun* 69(7): 4572-4579.
51. Murthy, V. N., C. F. Stevens (1998). "Synaptic vesicles retain their identity through the endocytic cycle." *Nature* 392(2): 497-501.
52. Olsen, I., A. Amano (2015). "Outer membrane vesicles - offensive weapons or good Samaritans?" *J Oral Microbiol* 7: 27468.
53. Olson, P. D., D. A. Hunstad (2016). "Subversion of Host Innate Immunity by Uropathogenic *Escherichia coli*." *Pathogens* 5(1).
54. Petersen, H., W. Nieves, K. Russell-Lodrigue, C. J. Roy, L. A. Morici (2014). "Evaluation of a *Burkholderia pseudomallei* Outer Membrane Vesicle Vaccine in Nonhuman Primates." *Procedia Vaccinol* 8(38-42).
55. Pitout, J. D. (2010). "The latest threat in the war on antimicrobial resistance." *Lancet Infect Dis* 10(9): 578-579.
56. Popat, R., D. M. Cornforth, L. McNally, S. P. Brown (2015). "Collective sensing and collective responses in quorum-sensing bacteria." *J R Soc Interface* 12(103).
57. Pritsch, M., N. Ben-Khaled, M. Chaloupka, S. Kobold, N. Berens-Riha, A. Peter, G. Liegl, S. Schubert, M. Hoelscher, T. Löscher, A. Wieser (2016). Comparison of Intranasal Outer Membrane Vesicles with Cholera Toxin and Injected MF59C.1 as Adjuvants for Malaria Transmission Blocking Antigens AnAPN1 and Pfs48/45. *Journal of Immunology Research*, Hindawi Publishing Corporation 2016: 11.
58. Ralph, P., I. Nakoinz (1975). "Phagocytosis and cytolysis by a macrophage tumour and its cloned cell line." *Nature* 257(5525): 393-394.
59. Robert-Koch-Institut (2011). Bericht: Abschließende Darstellung und Bewertung der epidemiologischen Erkenntnisse im EHEC O104:H4 Ausbruch, Deutschland 2011. Berlin.
60. Schaar, V., T. Nordström, M. Mörgelin, K. Riesbeck (2011). "Moraxella catarrhalis outer membrane vesicles carry β -lactamase and promote survival of *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae* by inactivating amoxicillin." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 55(8): 3845-3853.
61. Schild, S., E. J. Nelson, A. L. Bishop, A. Camilli (2009). "Characterization of *Vibrio cholerae* Outer Membrane Vesicles as a Candidate Vaccine for Cholera." *Infection and Immunity* 77(1): 472-484.
62. Schmidt, T. G., A. Skerra (2007). "The Strep-tag system for one-step purification and high-affinity detection or capturing of proteins." *Nat Protoc* 2(6): 1528-1535.

63. Schooling, S. R., T. J. Beveridge (2006). "Membrane vesicles: an overlooked component of the matrices of biofilms." *J Bacteriol* 188(16): 5945-5957.
64. Schubert, S. (2010). "[Urinary tract immunology]." *Urologe A* 49(5): 606-611.
65. Schubert, S., A. Wieser (2013). Method For The Preparation Of A Strain- Adapted Vaccine. World Intellectual Property Organization. L.-M.-U. München. Germany. WO2013/150142A1.
66. Schwechheimer, C., M. J. Kuehn (2013). "Synthetic Effect Between Envelope Stress and the Lack of Outer Membrane Vesicle Production in *Escherichia coli*." *Journal of Bacteriology* 195(18).
67. Schwechheimer, C., C. J. Sullivan, M. J. Kuehn (2013). "Envelope control of outer membrane vesicle production in Gram-negative bacteria." *Biochemistry* 52(18): 3031-3040.
68. Shaner, N. C., R. E. Campllell, P. A. Steinbach, B. N. G. Giepmans, A. E. Palmer, R. Y. Tsien (2004). "Improved monomeric red, orange and yellow flourescent proteins derived from *Discosoma* sp. red flourescent protein." *Nature biotechnology* 22(12): 1567-1572.
69. Towbin, H., Staehelin, G. J. (1979). "Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications." *Proc. Natl. Acad. Sci.* 76(9): 4350-4354.
70. van de Waterbeemd, B., G. Zomer, J. van den Ijssel, L. van Keulen, M. H. Eppink, P. van der Ley, L. A. van der Pol (2013). "Cysteine depletion causes oxidative stress and triggers outer membrane vesicle release by *Neisseria meningitidis*; implications for vaccine development." *PLoS One* 8(1): e54314.
71. Wai, S. N., B. Lindmark, T. Soderblom, A. Takade, M. Westermark, J. Oscarsson, J. Jass, A. Richter-Dahlfors, Y. Mizunoe, B. E. Uhlin (2003). "Vesicle-mediated export and assembly of pore-forming oligomers of the enterobacterial ClyA cytotoxin." *Cell* 115(1): 25-35.
72. Waters, C. M., B. L. Bassler (2005). "Quorum sensing: cell-to-cell communication in bacteria." *Annu Rev Cell Dev Biol* 21: 319-346.
73. Welch, R. A., V. Burland, G. Plunkett, 3rd, P. Redford, P. Roesch, D. Rasko, E. L. Buckles, S. R. Liou, A. Boutin, J. Hackett, D. Stroud, G. F. Mayhew, D. J. Rose, S. Zhou, D. C. Schwartz, N. T. Perna, H. L. Mobley, M. S. Donnenberg, F. R. Blattner (2002). "Extensive mosaic structure revealed by the complete genome sequence of uropathogenic *Escherichia coli*." *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(26): 17020-17024.
74. Wensink, J., B. Witholt (1981). "Outer-Membrane Vesicles Released by Normally Growing *Escherichia coli* Contain Very Little Lipoprotein." *Eur. J. Biochem.* 116: 331 - 335.
75. Wieser, A., C. Guggenberger, M. Pritsch, J. Heesemann, S. Schubert (2011). "A novel ex vivo set-up for dynamic long-term characterization of processes on mucosal interfaces by confocal imaging and simultaneous cytokine measurements." *Cell Microbiol* 13(5): 742-751.
76. Wieser, A., E. Storz, G. Liegl, A. Peter, M. Pritsch, J. Shock, S. N. Wai, S. Schubert (2014). "Efficient quantification and characterization of bacterial outermembrane derived nano-particles with flow cytometric analysis." *International Journal of Medical Microbiology* 304: 1032–1037.

H Literatur

77. Work, E., K. W. Knox, M. Vesik (1966). "The chemistry and electron microscopy of an extracellular lipopolysaccharide from *Escherichia coli*." *Ann N Y Acad Sci* 133(2): 438-449.
78. Zhou, L., R. Srisatjaluk, D. E. Justus, R. J. Doyle (1998). "On the origin of membrane vesicles in gram-negative bacteria." *FEMS Microbiol Lett* 163(2): 223-228.

I Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematischer Aufbau von OMV (Kaparakis-Liaskos und Ferrero, 2015)	5
Abbildung 2: Schematische Darstellung des Wandaufbaus gramnegativer Bakterien und drei Hypothesen zur Vesikelbildung (Lee, Choi, Kim und Gho, 2008)	11
Abbildung 3: Schema des Arbeitsprogramms zur Untersuchung der Vesikelproduktion von <i>E. coli</i>	14
Abbildung 4: Schematischer Wachstumskurvenverlauf mit Inokulation (Pfeil), Anlaufphase (1), Phase des exponentiellen Wachstums (2), stationärer Phase (3) und Absterbephase (4)	25
Abbildung 5: Schema einer bakteriellen Wachstumskurve	45
Abbildung 6: Darstellung der optischen Dichte der Bakterienkultur (MW+/- SEM) im Zeitraum 0-12 Stunden in reichem Nährmedium (LB-Medium) für alle untersuchten <i>E. coli</i> -Stämme	47
Abbildung 7: Stammspezifische Gegenüberstellung der optischen Dichte (MW+/- SD, n = 3) der Bakterienkultur mit den Bedingungen: reiches Nährmedium, angesäuertes Medium und Eisenmangel-Medium im Zeitverlauf von 0-12 Stunden	48
Abbildung 8: Schematische Wachstumskurve zur Veranschaulichung der bakteriellen Lebenszeit (vertikal gestreift) mit exemplarischer Darstellung der Maßeinheit bakterielle Stunde (KbE x h, horizontal gestreift) in der exponentiellen Wachstumsphase (links) und der stationären Wachstumsphase (rechts).....	52
Abbildung 9: Vesikelkonzentration (MW +/- SEM, n = 3) von <i>E. coli</i> -Kulturen in reichem Nährmedium (LB-Medium) nach 4 Stunden Wachstum unter idealen Wachstumsbedingungen (* = $p \leq 0,05$, nicht signifikante Vergleiche nicht eingetragen)	56
Abbildung 10: Vesikelkonzentration (MW +/- SEM, n = 3) von <i>E. coli</i> -Kulturen in reichem Nährmedium (LB-Medium) nach 11 Stunden Wachstum unter idealen Bedingungen (* = $p \leq 0,05$, nicht signifikante Vergleiche nicht eingetragen).....	57
Abbildung 11: Dargestellt ist der Quotient (MW +/- SEM) aus der Vesikelkonzentration einer Bakterienkultur nach 11 Stunden dividiert durch den Wert nach 4 Stunden	58
Abbildung 12: Vesikelproduktionsraten (MW +/- SEM, n = 4-10) aller untersuchter <i>E. coli</i> -Stämme in reichem Nährmedium (LB-Medium) in der Phase des exponentiellen Wachstums (* = $p \leq 0,05$, ** = $p \leq 0,01$).....	60
Abbildung 13: Übersicht der Vesikelproduktion (MW +/- SEM, n = 4-10) in der Phase des exponentiellen Wachstums für die Laborstämme für die Bedingung reiches Nährmedium (weiß), saurer pH-Wert (grau) und Eisenmangel (schwarz); * = $p \leq 0,05$, nicht signifikante Vergleiche wurden nicht eingetragen	62
Abbildung 14: Übersicht der Vesikelproduktion (MW +/- SEM, n = 4-8) in der Phase des exponentiellen Wachstums für die intestinal pathogenen <i>E. coli</i> für die Bedingung reiches Nährmedium (weiß), saurer pH-Wert (grau) und Eisenmangel (schwarz), * = $p \leq 0,05$, ** = $p \leq 0,01$, nicht signifikante Vergleiche wurden nicht eingetragen	63

Abbildung 15: Übersicht der Vesikelproduktion (MW +/- SEM, n = 3-6) in der Phase des exponentiellen Wachstums für die extraintestinal pathogenen *E. coli* für die Bedingung reiches Nährmedium (weiß), saurer pH-Wert (grau) und Eisenmangel (schwarz), ** = $p \leq 0,01$, nicht signifikante Vergleiche wurden nicht eingetragen 64

Abbildung 16: Darstellung des Wachstumsverlaufs anhand der optischen Dichte für den Laborstamm MG1655 im Vergleich ohne Waschschrift (Abkürzung: WS, schwarze Kurve), mit einem Waschschrift (grüne Kurve) und mit zwei Waschschriften (rote Kurve). Die verwendeten Beobachtungszeiträume in der Phase des exponentiellen Wachstums und der stationären Phase sind grau hinterlegt. 65

Abbildung 17: Darstellung der Vesikelkonzentration als Quotient aus dem Messwert nach 12 Stunden und nach 10 Stunden (MW +/- SEM, n = 3-5) in reichem Nährmedium (LB-Medium)..... 68

Abbildung 18: Gegenüberstellung der gemessenen Nettoproduktion (MW, weiß) unter der Annahme einer konstanten Bakterienanzahl im Beobachtungszeitraum mit dem erhobenen Minimum (▼) und Maximum (▲) und der theoretischen Vesikelproduktion (MW, grau) in einem 2 Stundenintervall in der stationären Phase bei Wachstum in LB-Medium 69

Abbildung 19: Darstellung der Vesikelkonzentration als Quotient aus dem Messwert nach 12 Stunden und nach 10 Stunden (MW +/- SEM, n = 3-5) in saurem Milieu..... 71

Abbildung 20: Darstellung der Vesikelkonzentration als Quotient aus dem Messwert nach 12 Stunden und nach 10 Stunden (MW +/- SEM, n = 3-5) unter Eisenmangelbedingungen .. 72

Abbildung 21: Gegenüberstellung der Mittelwerte der Quotienten der Vesikelkonzentration in der stationären Phase für alle untersuchten Bedingungen (weiß: reiches Nährmedium, hellgrau: saurer pH-Wert, dunkelgrau: Eisenmangel) und der Annahme einer konstanten Bakterienanzahl (* = $p \leq 0,05$, ** = $p \leq 0,01$, nicht signifikante Vergleiche sind nicht eingetragen) 74

Abbildung 22: Ausschnitt eines Western Blots einer Koinkubation einer stationären 536 WT-Kultur mit Strep-markierten 563 Oca Vesikel im Zeitverlauf von 2 Stunden, Signal aufgezeichnet mit ChemiDoc (Biorad, München), Pfeil markiert Signalbande der Strep-Proteine, grauer Keil kennzeichnet die ansteigende Signalintensität für Strep-markierte Proteine im Pellet über die Zeit 76

Abbildung 23: Koloniebildende Einheiten (MW +/- SEM, n = 3) pro μl Versuchsansatz im Makrophageninfektionsversuch 78

Abbildung 24: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme infizierter J774-Makrophagen (links: ohne Vesikel; rechts: mit dTomato-Vesikel) 80

Abbildung 25: Übersicht der gemessenen Zytokine (MW +/- SEM) aus den explantierten Harnblasen der Versuchstiere (weiß: Bakterien und OMV, n = 23; grau: nur Bakterien, n = 22); n.s. = $p > 0,05$, * = $p \leq 0,05$ 82

J Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Einteilung der pathogenen <i>E. coli</i> -Stämme in Gruppen und Pathotypen (Allocati, Masulli, Alexeyev und Di Ilio, 2013)	3
Tabelle 2: Übersicht exemplarischer Aufgaben von Vesikel eingeteilt nach der Wirkung (Olsen und Amano, 2015)	6
Tabelle 3: Vergleich der OD-Werte (MW; +/- SD in Klammern) in der stationären Phase (* = $p \leq 0,05$, ** = $p \leq 0,01$, *** = $p \leq 0,001$)	49
Tabelle 4: OD ₆₀₀ -KbE- Korrelationen für die untersuchten Stämme	51
Tabelle 5: Datenauszug für die stationäre Phase des Top10 in reichem Nährmedium	67

K Danksagung

Die Datenerhebung dieser Dissertation wurde im Rahmen des „Förderprogramms für Forschung und Lehre“ der medizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilian-Universität am Max von Pettenkofer-Institut durchgeführt. Ich bin sehr dankbar für die Aufnahme in das Förderprogramm und die exzellente Betreuung durch Prof. Dr. Sören Schubert und PD Dr. Andreas Wieser im Verlauf des gesamten Projektes.

Mein Dank gilt dabei vor allem PD Dr. Andreas Wieser, dessen Erfindungen und Vorarbeit dieses Projekt überhaupt erst möglich machten und der teils bis in die späten Abendstunden mit am Projekt mittüfelte und immer einen neuen Lösungsansatz fand. Seine positive Art und mitreißende Begeisterung halfen mir auch nach Rückschlägen nicht den Spaß an der Forschung zu verlieren. Mein Dank gilt auch seiner Frau, die sehr viel Geduld und Nachsicht walten ließ, wenn es im Labor doch einmal wieder länger dauerte.

Ein riesengroßes Dankeschön geht an Gabriele Liegl. Mit engelsgleicher Geduld hat sie mir die Grundlagen des Arbeitens im Labor beigebracht und mich jederzeit mit Rat und Tat unterstützt.

Außerdem möchte ich mich besonders bei Dr. Dominik Nörenberg für die Unterstützung mit den Zellkulturversuchen und der Fluoreszenzmikroskopie bedanken.

Auch die restlichen Mitarbeiter des Max von Pettenkofer-Instituts, vorallem die AG Schubert/ AG Wieser, trugen ihren Teil zum Gelingen dieser Arbeit bei, insbesondere sei folgenden Personen gedankt:

- Birgit Groß für die gute Koordinierung der Bestellungen und das offene Ohr für alle anfallenden Fragen
- Dr. Martin Arnold, Dr. Maxim Messerer und Dr. Christian Meyer für den fachlichen Austausch und die unterhaltsamen Kaffeepausen
- Dr. Christiane Hoffmann und Dr. Giuseppe Magistro für die hilfreichen Tipps gerade zu Beginn meines Projekts

Nicht zuletzt möchte ich meiner Familie danken, für die moralische Unterstützung und das Verständnis, das sie mir entgegenbrachten. Danke, dass ihr immer da wart, mir zugehört und dabei versucht habt, allem etwas Positives abzugewinnen.

Vielen lieben Dank auch an Thomas Windisch, der mein regelmäßiges Jammern über Schreibblockaden, technische Schwierigkeiten und Co. heroisch ertrug, mich immer wieder anspornte und auch den ein oder anderen Rechtschreibfehler fand.

K Danksagung

Ich möchte mich bei meinen Freunden bedanken, die teilweise aus eigener Erfahrung wissen, wie schwer es ist die weißen Seiten zu füllen und mit welchen Motivationsdefiziten man zu kämpfen hat.

Danke, dass ihr alle mich auf diesem Weg begleitet habt und an der ein oder anderen Stelle in Richtung Ziel geschubst habt!

L Eidesstattliche Versicherung

L Eidesstattliche Versicherung

Hiermit erkläre ich, Annabell Windisch (geb. Peter), eidesstattlich, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

„Charakterisierung der Produktion und Funktion von Außenmembranvesikel (*outer membrane vesicles; OMV*) pathogener *Escherichia coli*“

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

Annabell Windisch

Cham, den 27.01.2020