

Aus dem Institut für Translationale Inflammationsforschung &
Core Facility für Single Cell Multiomics
Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. Holger Garn

des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg

**Darstellung und funktionelle Analyse von
extrazellulären Vesikeln im Kontext epithelialer
Aktivierungsprozesse bei Asthma bronchiale**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Humanmedizin
dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Arlene Adler
aus München

Marburg, 2024

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg am:
18.11.2024

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Medizin

Dekanin: Prof. Dr. Denise Hilfiker-Kleiner

Referent: Prof. Dr. Holger Garn

1. Koreferent: Prof. Dr. Schmeck

Inhaltsverzeichnis

I.	Abkürzungsverzeichnis	VI
II.	Abbildungsverzeichnis	X
III.	Tabellenverzeichnis	XI
1	Einleitung	1
1.1	Asthma bronchiale	1
1.1.1	Überblick und Definition	1
1.1.2	Epidemiologie	1
1.1.3	Ätiologie und Risikofaktoren	2
1.1.4	Pathogenese	3
1.1.5	Die Rolle des Epithels	3
1.1.6	Einteilung von Asthma in Phänotypen und Endotypen	5
1.1.7	Aktuelle Therapiekonzepte	6
1.2	Extrazelluläre Vesikel (EVs)	7
1.2.1	Definition und Unterteilung in Untergruppen	7
1.2.2	Methoden zur Aufbereitung von EVs	8
1.2.3	Methoden zur Charakterisierung und Darstellung von EVs	9
1.2.4	Ansprüche an eine funktionelle EV-Analyse	11
1.3	<i>Air-liquid-interface</i> -Kulturen (ALI-Kulturen)	12
1.4	Hypothese und Fragestellung	13
2	Material und Methoden	15
2.1	Material	15
2.1.1	Informationen zu verwendeten EVs	15
2.1.2	Hilfs- und Verbrauchsmaterialien	16
2.1.3	Lösungen und Substanzen	17
2.1.4	Fluoreszenzfarbstoffe	19
2.1.5	Kits	19
2.1.6	Zusammensetzung von Puffern und Medien	20

2.1.7	Geräte	21
2.1.8	Software	22
2.1.9	Primer	22
2.2	Methoden	24
2.2.1	Zellbiologische Methoden	24
2.2.2	Aufbereitung von EVs	25
2.2.3	Fluoreszenzmarkierung von EVs	27
2.2.4	NanoFCM	29
2.2.5	Konfokalmikroskopie zur Detektion der Aufnahme von EVs in BEAS-2B Zellen	30
2.2.6	Stimulation von BEAS-2B Zellen durch EVs und LPS	32
2.2.7	Statistik	40
3	Ergebnisse	41
3.1	Effektive EV-Konzentrierung durch UF(A) und SEC	41
3.2	Vergleich verschiedener Fluoreszenzfarbstoffe zur EV-Markierung	41
3.2.1	Fluoreszenzmarkierung von EVs gesunder PBEZ des apikalen Kompartiments	41
3.2.2	Fluoreszenzmarkierung von EVs gesunder PBEZ des basalen Kompartiments	46
3.3	Nachweis der Bindung CFSE-markierter, apikaler EVs von PBEZ an BEAS-2B Zellen mittels Konfokalmikroskopie	49
3.4	Stimulation durch EVs und LPS führt zu einer Stressreaktion in BEAS-2B Zellen	50
3.4.1	Ergebnisse der Genexpressionsanalyse von BEAS-2B Zellen nach Stimulation durch EVs mittels RT-qPCR	51
3.4.2	Ergebnisse der Analyse der IL-8 Sekretion durch BEAS-2B Zellen nach Stimulation mit EVs	57
3.4.3	Ergebnisse der Analyse der NO-Freisetzung durch BEAS-2B Zellen nach Stimulation mit EVs	58
4	Diskussion	60

5	Zusammenfassung	72
6	Summary	74
7	Literaturverzeichnis	76
8	Anhang	i
8.1	Verzeichnis der akademischen Lehrer/-innen	ii
8.2	Danksagung	v

I. Abkürzungsverzeichnis

AJs	<i>Adherence Junctions</i>
ALI	<i>Air-liquid-interface</i>
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BEGM	<i>Bronchial epithelial cell growth medium</i>
BSA	Bovines Serumalbumin
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
cDNA	Komplementäre DNA, engl. <i>complementary DNA</i>
CFDA-SE	Carboxyfluorescein-Diacetat- Succinimidyl-Ester
CFSE	Carboxyfluorescein-Succinimidyl-Ester
CLDN	Claudin
COPD	Chronisch obstruktive Lungenerkrankung, engl. <i>chronic obstructive pulmonary disease</i>
DAMPs	<i>danger-associated-molecular-patterns</i>
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
DiO	3,3'-Dioctadecyloxacarbocyanine Perchlorat
DMSO	Dimethylsulfoxid
E-Cad	E-Cadherin
ELISA	Enzym-gekoppelter Immunadsorptionstest, engl. <i>enzyme- linked immunosorbent assay</i>
EMT	Epitheliale mesenchymale Transition
EMTU	<i>Epithelial-mesenchymal-trophic-unit</i>
Et al.	<i>Et alii</i>
EVs	Extrazelluläre Vesikel
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
GA	Gentamycin Amphotericin

GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GINA	<i>Global Initiative for Asthma</i>
HC	Hydrokortison
ICS	Inhalative Kortikosteroide
IgE	Immunglobulin E
IL	Interleukin
ISEV	Internationale Gesellschaft für Extrazelluläre Vesikel, engl. <i>international Society for Extracellular Vesicles</i>
LABA	Langwirksames β_2 -Sympathomimetikum, engl. <i>long acting β_2-agonist</i>
LAMA	Langwirksames Anticholinergikum, engl. <i>long acting muscarinic Antagonist</i>
LPS	Lipopolysaccharid
mAbs	Monoklonale Antikörper, engl. <i>monoclonal antibodies</i>
MISEV	Minimale Informationen für Untersuchungen extrazellulärer Vesikel, engl. <i>minimal informations for studies of extracellular vesicles</i>
MUC5AC	Muzin 5AC
NaCl	Natriumchlorid
NanoFCM	Nanoflow Zytometrie, engl. <i>nanoflow cytometry</i>
NaOH	Natriumhydroxid
NO	Stickstoffmonoxid, engl. <i>nitric oxide</i>
NOS2	Induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase, engl. <i>inducible nitric oxide synthase</i>
OCLN	Occludin
OD	Optische Dichte
PAMPs	<i>Pathogen-associated-molecular-patterns</i>

PBEZ	Primäre bronchiale Epithelzellen
PBS	Phosphat-gepufferte-Kochsalzlösung, engl. <i>phosphate buffered saline</i>
PE	Phycoerythrin
PFA	Paraformaldehyd
PGK1	Phosphoglycerat Kinase 1
PMT	Photovervielfachungsröhrchen, engl. <i>Photomultiplier tube</i>
PRRs	<i>Pattern-recognition-receptors</i>
PVP	Polyvinylpyrrolidon
PYCARD	PYD- und CARD-Domäne-enthaltendes-Gen
RD	<i>Reagent Diluent</i>
RNA	Ribonukleinsäure, engl. <i>ribonucleic acid</i>
RQ	Relative Quantifizierung
RT	Raumtemperatur
RT-qPCR	Echtzeit-quantitative-Polymerase-Ketten-Reaktion, engl. <i>realtime-quantitative-polymerase-chain-reaction</i>
SABA	Kurzwirksames β_2 -Sympathomimetikum, engl. <i>short acting β_2-agonist</i>
SEC	Größenausschlusschromatographie, engl. <i>size exclusion chromatography</i>
Streptavidin-HRP	Streptavidin-Horseradish-Peroxidase-Lösung
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung, engl. <i>tris buffered saline</i>
Th2	T-Helferzelle-2
TJs	<i>Tight Junctions</i>
TJP1	Tight-Junction-Protein 1
TSLP	Thymic Stromal Lymphopoietin
UF	Ultrafiltration

VE	Vollentsalzt
VIM	Vimentin
ZO1	Zonula Occludens 1

II. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Färbemechanismus von CFSE.....	10
Abbildung 2: Schematischer Aufbau einer ALI-Kultur mit basalem und apikalem Kompartiment.	13
Abbildung 3: Schematische Übersicht der verschiedenen Ansätze für die Stimulation von BEAS-2B Zellen.....	33
Abbildung 4: Verteilung der Partikelkonzentrationen über die gesammelten Fraktionen	41
Abbildung 5: Histogramme apikaler EVs von PBEZ nach Inkubation mit fluoreszenzgekoppelten mAbs, gemessen durch NanoFCM.	42
Abbildung 6: Histogramme apikaler EVs von PBEZ nach Inkubation mit PE-anti-CD63-mAbs, gemessen durch NanoFCM.....	43
Abbildung 7: Histogramme apikaler EVs von PBEZ nach Inkubation mit DiO und PE-anti-CD63-mAbs, gemessen durch NanoFCM.....	44
Abbildung 8: Histogramme einer Kontrolllösung nach Inkubation mit DiO und PE-anti-CD63-mAbs, gemessen durch NanoFCM.....	44
Abbildung 9: Histogramme apikaler EVs nach Inkubation mit CFSE und PE-anti-CD63-mAbs, gemessen durch NanoFCM.....	45
Abbildung 10: Histogramm einer Kontrolllösung nach Inkubation mit CFSE, gemessen durch NanoFCM.....	45
Abbildung 11: Fluoreszenzspektroskopische Messung der CFSE-Verteilung über die Fraktionen nach CFSE-Inkubation und SEC einer apikalen EV-Probe.	46
Abbildung 12: Histogramme basaler EVs nach Inkubation mit PE-anti-CD63-mAbs, gemessen durch NanoFCM.	47
Abbildung 13: Histogramme basaler EVs nach Inkubation mit DiO und PE-anti-CD63-mAbs, gemessen durch NanoFCM.	48
Abbildung 14: Histogramme Kontrolllösung nach Inkubation mit DiO und PE-anti-CD63-mAbs, gemessen durch NanoFCM.....	48
Abbildung 15: Histogramme basaler EVs nach Inkubation mit CFSE und PE-anti-CD63-mAbs, gemessen durch NanoFCM.....	49
Abbildung 16: Konfokalmikroskopische Aufnahmen (Z-Stack) von BEAS-2B Zellen nach Inkubation mit CFSE-markierten, apikalen EVs gesunder PBEZ.50	

Abbildung 17: Konfokalmikroskopische Aufnahme von BEAS-2B Zellen.....	50
Abbildung 18: Expressionslevel der Gene IL8 und NOS2 analysiert durch RT-qPCR.	52
Abbildung 19: Expressionslevel der Gene IL25 und TSLP analysiert durch RT-qPCR.	53
Abbildung 20: Expressionslevel der Gene MUC5AC und PYCARD analysiert durch RT-qPCR.....	54
Abbildung 21: Expressionslevel der Gene E-Cad und Vim analysiert durch RT-qPCR.	55
Abbildung 22: Expressionslevel der Gene CLDN1 und CLDN4 analysiert durch RT- qPCR.	56
Abbildung 23: Expressionslevel der Gene OCLN, ZO1 und TJP1 analysiert durch RT- qPCR.	57
Abbildung 24: IL8-Produktion durch BEAS-2B Zellen analysiert mittels IL8-ELISA....	58
Abbildung 25: Indirekte Quantifizierung der Freisetzung von NO durch stimulierte BEAS-2B Zellen durch absorptionsspektroskopische Messung von Nitrat und Nitrit nach Griess.	59

III. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Informationen zu Ursprungsmaterial für EV-Gewinnung.....	16
Tabelle 2: Hilfs- und Verbrauchsmaterialien.....	16
Tabelle 3: Lösungen und Substanzen	17
Tabelle 4: Fluoreszenzfarbstoffe	19
Tabelle 5: Kits.....	19
Tabelle 6: Geräte	21
Tabelle 7: Computerprogramme	22
Tabelle 8: Primer	22
Tabelle 9: Schematischer Plan der Fluoreszenzmarkierung von BEAS-2B Zellen und ihrer Inkubation mit CFSE-markierten EVs.	31
Tabelle 10: Zusammenstellung der verwendeten EV-Proben für die Stimulation von BEAS-2B Zellen mit zugehöriger Konzentration [EV x mL ⁻¹] durch NanoFCM ermittelt.....	34

1 Einleitung

1.1 Asthma bronchiale

1.1.1 Überblick und Definition

Asthma bronchiale beschreibt einen heterogenen Krankheitskomplex, der durch reversible Atemwegsobstruktion und chronische Inflammation der unteren Atemwege charakterisiert wird (Global Initiative for Asthma 2022). Mittlerweile versteht man unter Asthma bronchiale weniger die Bezeichnung einer singulären Krankheit als vielmehr einen Sammelbegriff für eine komplexe Gruppe an zugrundeliegenden Pathomechanismen, die zu reversiblen Exazerbationen führen und mit den Symptomen Atemnot, Husten, Giemen und Brustenge einhergehen (Holgate et al. 2015). Auslöser der Symptome sind eine durch Bronchokonstriktion und Schleimproduktion hervorgerufene Atemwegsobstruktion sowie eine durch inflammatorische Prozesse begünstigte Hyperreagibilität der Atemwege (Fahy 2015; Mims 2015). Exazerbationen können dabei in sehr variabler Intensität und Häufigkeit auftreten. Mögliche Auslöser sind Allergenkontakt, körperliche Anstrengung, kalte Luft oder die Einnahme bestimmter Medikamente (Holgate et al. 2015). In der klinischen Praxis werden entsprechend der wahrnehmbaren und messbaren Charakteristika verschiedene Phänotypen von Asthma unterschieden (Wenzel 2012). Diese Einteilung wird zunehmend durch die Definition von Endotypen ergänzt, die auf Basis unterschiedlicher molekularer Pathomechanismen vorgenommen wird (Koczulla et al. 2017). Ein akkurates Verständnis der Pathomechanismen ist von eminenter Bedeutung für die Entwicklung neuer, angepasster Therapieschemata, da es einige Patientengruppen gibt, darunter besonders auch Patienten mit schwerem Asthma, die nicht oder nur unzureichend auf aktuelle Therapiekonzepte ansprechen (Russell und Brightling 2017). Die Therapie stützt sich dabei bisher hauptsächlich auf Meidung auslösender Faktoren sowie Intervention durch antiinflammatorische und bronchodilatative Medikation (Papi et al. 2018). Ziel der Therapie sind Symptomkontrolle sowie Prävention und Häufigkeitsreduktion von Exazerbationen, um irreversible pathologische Veränderungen und einer persistierenden Limitation des Atemflusses vorzubeugen (Holgate et al. 2015).

1.1.2 Epidemiologie

Schätzungen zur Folge sind weltweit ungefähr 300 Millionen, bis 2025 wahrscheinlich sogar 400 Millionen Menschen von Asthma bronchiale direkt betroffen. Dabei basieren diese Schätzungen auf der veralteten Definition, die Asthma bronchiale als ein einheitliches Krankheitsbild begreift (Bousquet 2007). Asthma geht teilweise mit einer hohen Morbidität Betroffener und daraus resultierend mit einer beträchtlichen

Hospitalisierungs- und Mortalitätsrate einher. Asthma bronchiale stellt somit eine große ökonomische Belastung der globalen Gesundheitsversorgung dar (CDC 2013). Einhergehend mit der weltweiten Zunahme von Urbanisierung und Adoption eines „westlichen Lifestyles“ wird eine steigende Inzidenz von Asthma registriert (Bousquet 2007). In einigen Ländern des globalen Nordens zeichnet sich jedoch mittlerweile eine Plateauphase der Inzidenz ab (Stern et al. 2020). Parallel zu Asthma zeigen sich auch für Allergien und andere nicht-infektiöse, immunologisch vermittelte Krankheiten wie Diabetes mellitus Typ 1 und entzündliche Darmerkrankungen über die letzten Jahre steigende Prävalenzen (Holgate et al. 2015).

1.1.3 Ätiologie und Risikofaktoren

Die Frage nach der Ursache von Asthma bronchiale ist selten einfach zu beantworten, da sie meistens das Resultat eines komplexen Zusammenspiels zahlreicher endogener und exogener Faktoren ist. Als endogene Faktoren spielen zum Beispiel Geschlecht, Ethnie und genetische Prädisposition eine wichtige Rolle (CDC 2013). Akkumulierende Evidenz spricht zudem für eine hohe Relevanz pränataler und maternaler Umweltfaktoren (Holgate et al. 2015). Es ist Gegenstand der aktuellen Forschung, relevante Gene, ihre Expressionsmuster und Interaktion untereinander zu identifizieren, um ggf. individualisierte Therapieschemata entwickeln zu können (Moffatt et al. 2010; Willis-Owen et al. 2018). Weitere Risikofaktoren, die von der WHO gelistet werden, sind Lifestyle assoziierte Faktoren wie aktives oder auch passives Rauchen und Übergewicht, da sie Einfluss auf inflammatorische Prozesse der Atemwege nehmen (Strzelak et al. 2018; Miethe et al. 2020). Es gibt Evidenz dafür, dass Rauchexposition besonders *in utero* und im Säuglings- und Kindesalter ein erhöhtes Risiko für die Entwicklung von Asthma zur Folge hat (Harju et al. 2016). Auch psychosoziale Faktoren wie ein geringes Einkommen und ein niedriger Bildungsstand sind mit einem erhöhten Risiko für die Entstehung von Asthma assoziiert (CDC 2013). Darüber hinaus gehen ein hohes Maß an urbaner Luftverschmutzung und beruflicher Exposition gegenüber Noxen mit einem erhöhten Risiko für Asthma einher (Guarnieri und Balmes 2014). Dagegen erweist sich die Exposition mit einer großen Vielfalt an Mikroorganismen aus der Umwelt, wie das meist in ruralen Regionen der Fall ist, als protektiver Faktor (Jackson et al. 2014). Diese trägt zur Ausbildung vorteilhafter pulmonaler und gastrointestinaler Mikrobiome bei, deren Zusammensetzung einen entscheidenden Beitrag zur Ausbildung von Immuntoleranz im Kindesalter liefern. Somit haben Mikrobiome einen positiven Effekt auf die Entstehung von Asthma und atopischen Krankheiten. Da auch eine komorbide, atopische Erkrankung gegenüber exogenen Allergenen wie Pollen, Tierhaaren und Hausstaubmilben als wichtiger Risikofaktor für Asthma angesehen wird, ist die Ausbildung einer adäquaten Immuntoleranz von doppelter Relevanz (Stern et al. 2020).

Weiterhin werden virale Atemwegsinfekte besonders im frühen Kindesalter zu den wichtigsten Risikofaktoren gezählt (Jartti und Gern 2017). Die Liste an weiteren Risikofaktoren ist lang und aus ihrer Vielzahl wird deutlich, wie komplex die Frage nach der Ätiologie von Asthma bronchiale ist.

1.1.4 Pathogenese

Entsprechend der „Barrierehypothese“ wird für die Pathogenese von Asthma ein komplexes Zusammenspiel aus mikrobiotischer Dysbiose, Schädigung der Epithelbarriere und resultierender Immunantwort als entscheidend für die Entstehung der Erkrankung angesehen (Akdis 2021). Im Rahmen einer chronischen Inflammation der Atemwege kommt es zur Aktivierung von verschiedenen Immunzellen, ihrer Infiltration in subepitheliales Gewebe und Interaktion mit strukturgebenden Epithel- und Mesenchymzellen (Hammad und Lambrecht 2021). Dies führt zur Freisetzung proinflammatorischer Zytokine und zur Ausbildung eines entzündlichen Schleimhautödems, vermehrter Schleimproduktion und durch Sensibilisierung afferenter Nervenendigungen zu erhöhtem Bronchospasmus von Myozyten (Mims 2015). Zudem wird die epitheliale Barriere im Rahmen der Entzündung geschädigt und durch reduzierte Ausbildung von *Tight Junctions* (TJs) geschwächt (Erjefält 2010). Daraus resultiert eine erhöhte Anfälligkeit für virale Infektionen und aerogene Reizstoffe, was wiederum zur Aufrechterhaltung und Ausbreitung der Entzündung führt (Holgate et al. 2009). Bei langanhaltender Entzündung und unzureichender antiinflammatorischer Therapie kommt es zu Umbauprozessen, dem sogenannten *Remodeling* der Atemwege mit Hyperplasie von Becherzellen und glatten Muskelzellen sowie zur Verdickung der Basalmembran und vermehrter Angiogenese (Banno et al. 2020). Durch Aktivierung der *epithelial-mesenchymal-trophic-unit* (EMTU) und durch gesteigerte Produktion und Ablagerung von Kollagen im Gewebe kann sich im Laufe der Zeit zunehmend eine Fibrosierung der unteren Atemwege ausbilden. Dies hat eine irreversible Atemwegsobstruktion mit anhaltend reduzierter Lungenfunktion zur Folge (Holgate et al. 2009; Hirota und Martin 2013).

1.1.5 Die Rolle des Epithels

Das Epithel der unteren Atemwege setzt sich aus verschiedenen spezialisierten Zelltypen zusammen. Dazu gehören Flimmerzellen mit Zilien, schleimproduzierende Becherzellen, Basalzellen zur Regeneration und Erneuerung des Epithels, vereinzelte neuroendokrine Zellen und antigenpräsentierende M-Zellen (Alashkar Alhamwe et al. 2020).

Zu den Hauptaufgaben des Epithels der unteren Atemwege gehört die Bildung einer physikalischen Barriere zwischen Körper und Außenwelt. Alle Zellen werden durch ein

dichtes Netzwerk interzellulärer Proteinkomplexe miteinander verbunden. Dazu gehören TJs, *Adherence Junctions* (AJs) und Desmosomen (Mitchell und O'Byrne 2017). Durch die Ausbildung von TJs ergibt sich eine Polarität von Epithelzellen mit einem apikalen und einem basolateralen Kompartiment, die sich funktionell voneinander unterscheiden (Steelant 2020). Eine verminderte Expression von TJ-Genen und eine damit einhergehende erhöhte Durchlässigkeit der Barriere kann sowohl Ursache als auch Folge der Wirkung verschiedener Reize wie Allergene, Viren, Zigarettenrauch und proinflammatorischer Zytokine sein. Eine gestörte Barrierefunktion des Epithels ist ein typisches Merkmal asthmatischer Veränderungen (Loxham und Davies 2017; Gon und Hashimoto 2018).

Darüber hinaus hält das Epithel auch eine direkte Abwehrfunktion inne, indem Becherzellen Schleim produzieren. Inhalierte, ggf. pathogene Partikel werden durch den Schleim gebunden und davon abgehalten, in tiefere Bereiche der Atemwege vorzudringen. Durch Flimmerzellen und ihre koordinierten Zilienschläge wird der Schleim nach oral abtransportiert. Dieser Prozess wird als mukoziliäre *Clearance* bezeichnet (Hellings und Steelant 2020). Dabei spielen Menge und Zusammensetzung des Schleims eine wichtige Rolle während der Ausprägung pathologischer Prozesse (Thornton et al. 2008). So ändert sich beispielweise die Expression des Gens Muzin 5AC (MUC5AC) im Rahmen einiger Subtypen von asthmatischen Atemwegsentzündungen, welches für die Beschaffenheit von Atemwegsschleim von Bedeutung ist (Ridley und Thornton 2018; Tan et al. 2019).

Zudem übernimmt das Atemwegsepithel eine immunogene und immunregulatorische Funktion und steht sowohl mit dem angeborenen als auch mit dem erworbenen Immunsystem in engem Kontakt. Epithelzellen reagieren über spezialisierte Rezeptoren wie *pattern-recognition-receptors* (PRRs), *pathogen-associated-molecular-patterns* (PAMPs) und *danger-associated-molecular-patterns* (DAMPs) auf externe Trigger und können durch Ausschüttung von Zytokinen eine Immunantwort initiieren und regulieren (Yang et al. 2021). Zu den von Epithelzellen sezernierten Zytokinen gehören Interleukin 8 (IL8) sowie die Gruppe der Alarmine mit IL33, IL25 und Thymic Stromal Lymphopoietin (TSLP) (Bartemes und Kita 2012; Kuruvilla et al. 2019; Matsushima et al. 2022). Diese dienen der Attraktion von Immunzellen und der interzellulären Kommunikation von Epithelzellen (Potaczek et al. 2020; Matsushima et al. 2022). Neben Zytokinen geben Epithelzellen weitere Entzündungsmediatoren wie zum Beispiel Stickstoffmonoxid (NO) ab. Dieses kann in Abhängigkeit der Konzentration bronchodilatatorisch wirken (Ghosh und Erzurum 2011). In hohen Konzentrationen trägt es unter anderem durch Bildung toxischer Stickstoff-Nebenprodukte zur Ausbildung eines inflammatorischen Milieus bei (Guo et al. 2000). Daneben können betroffene

Zellen auch den programmierten Zelltod (Apoptose) einleiten. Als Unterform der Apoptose wird die Pyroptose definiert, während welcher multimolekulare Proteinkomplexe gebildet werden, die als Inflammasom bezeichnet werden und ebenfalls als Entzündungsmediatoren fungieren (Bertheloot et al. 2021). Eine veränderte Expression des PYD- und CARD-Domäne-enthaltenden-Gens (PYCARD) dient als Marker für die Bildung von Inflammasomen (Rathinam et al. 2012).

Chronische Entzündungs- und Reparaturprozesse führen unter dem Einfluss von Zytokinstimulation, Kontakt zu extrazellulärer Matrix und oxidativem Stress zu transkriptionellen Veränderungen epithelialer Zellen. Während dieses Prozesses der Epithelial-mesenchymalen Transition (EMT) können Epithelzellen einige ihrer typischen epithelialen Eigenschaften verlieren und Merkmale mesenchymaler Zellen annehmen (Ijaz et al. 2014). So wird zum Beispiel E-Cadherin (E-Cad), das Teil der AJs von Epithelzellen ist, im Rahmen der EMT vermindert transkribiert, während Vimentin (Vim) ein Marker mesenchymaler Zelltypen ist und vermehrt transkribiert wird (Meigs et al. 2002; Kuruvilla et al. 2019).

1.1.6 Einteilung von Asthma in Phänotypen und Endotypen

Zur besseren Übersicht des heterogenen Feldes der verschiedenen Asthma-Varianten werden verschiedene Phänotypen definiert. Es werden zum Beispiel allergisches Asthma mit Beginn im Kindesalter, eosinophiles Asthma mit Beginn im Erwachsenenalter und nicht-allergisches Asthma mit Beginn meist erst im Seniorenalter voneinander unterschieden. Weitere definierte Phänotypen sind neutrophiles, mit Übergewicht assoziiertes und belastungsabhängiges Asthma (Koczulla et al. 2017). Da diese Einteilung jedoch oft keine zuverlässige Prognose für Krankheitsverlauf und Therapieansprechen zulässt, werden ergänzend Endotypen auf der Basis beteiligter zellulärer und molekularbiologischer Pathomechanismen definiert (Global Initiative for Asthma 2022).

Der bisher wohl am besten definierte Endotyp ist mit einer Typ-2 Immunantwort assoziiert, die vor allem durch die Aktivität von T-Helferzellen vom Typ-2 (Th2) bestimmt wird. Th2-Zellen sind positiv für den Oberflächenmarker *Cluster of differentiation 4* (CD4) und fungieren als Triebkraft der Th2-Entzündungsreaktion. Indem sie die Zytokine IL4, IL5, IL9 und IL13 sezernieren, führen sie zur Akkumulation eosinophiler Granulozyten in den Atemwegen, zu gesteigerter Schleimproduktion und Produktion von Immunglobulin E (IgE) durch allergen-spezifische B-Lymphozyten (Hammad und Lambrecht 2021). Es besteht eine starke Assoziation mit weiteren atopischen Erkrankungen wie allergischer Dermatitis und Rhinosinusitis. Oft manifestiert sich dieser Endotyp, der auch als allergischer Typ bezeichnet wird, bereits im Kindesalter und ist meist mit einem guten

Ansprechen auf inhalative Kortikosteroide (ICS) assoziiert (Koczulla et al. 2017). Dieser Endotyp ist am ehesten mit dem Phänotyp des allergischen Asthmas vereinbar.

Nicht-allergisches bzw. auch Nicht-Typ 2-Asthma ist im Wesentlichen über die Abwesenheit von Th2-Zytokinen definiert. Es ist sehr wahrscheinlich, dass unter diesem Begriff verschiedene Endotypen zusammengefasst werden. Für eine Patienten-Subgruppe lässt sich zum Beispiel ein neutrophiler Entzündungstyp mit Th17-Zellen als Hauptakteuren feststellen (Potaczek et al. 2020). Jedoch lässt der aktuelle Forschungsstand bezüglich zugrunde liegender Pathomechanismen noch keine weitere Differenzierung zu. Nicht-Typ 2 Asthma tritt in der Regel erst im Erwachsenenalter auf und kommt gehäuft bei Frauen und Übergewichtigen vor (Tliba und Panettieri 2019). Insgesamt sprechen Betroffene des Nicht-Typ 2 Asthma oft schlechter auf ICS an (Hammad und Lambrecht 2021).

Weitere pathophysiologisch distinkte Endotypen, die von Lötvall et. al. (2011) vorgeschlagen wurden, sind das Aspirin-induzierte Asthma, die allergische bronchopulmonare Mykose und das anstrengungs-assoziiertes Asthma z.B. bei Ausdauersportlern.

1.1.7 Aktuelle Therapiekonzepte

Konservative Therapieansätze von Asthma stützen sich vornehmlich auf Patientenedukation, Sicherstellung der korrekten Anwendung von Inhalatoren, Reduktion von Risikofaktoren und Meidung von Triggern. Die pharmakologische Therapie von Asthma erfolgt stufenweise unter regelmäßiger Reevaluation der Symptomkontrolle, Einschätzung des Risikos für zukünftige Exazerbationen und Abstimmung mit dem Wunsch der Patienten (Global Initiative for Asthma 2022).

Entsprechend der *Global Initiative for Asthma* (GINA) Leitlinie von 2022 wird als Therapie der Wahl für Stufe 1 eine bedarfsorientierte Fixkombination von niedrig dosierten ICS und Formoterol, einem langwirksamen β_2 -Sympathomimetikum (LABA), empfohlen. Eine Monotherapie mit kurzwirksamen β_2 -Sympathomimetika (SABA) wird aufgrund vergleichbarer Symptomkontrolle bei allerdings erhöhtem zukünftigem Exazerbationsrisiko nicht mehr empfohlen. Zur Therapieeskalation bei unzureichender Symptomkontrolle wird eine Dosissteigerung der ICS-LABA-Kombination als Bedarfsmedikation auf Stufe 2 empfohlen. Stufe 3 besteht in einer dauerhaften Anwendung niedrig dosierter ICS-LABA-Medikation. Kommt es unter dauerhafter Therapie weiterhin zu Exazerbationen, kann bei Bedarf zusätzliches ICS-LABA oder optional auch ein kurzwirksames β_2 -Sympathomimetikum (SABA) als Symptomerlöser angewendet werden. Zur weiteren Eskalation der Therapie auf Stufe 4 wird eine mittlere Dosierung der dauerhaften ICS-LABA-Medikation angestrebt, mit ICS-LABA oder SABA

als Bedarfsmedikation. Sollte es auch unter Stufe 4 nicht zu einer ausreichenden Symptomkontrolle kommen, werden zusätzlich langwirksame Anticholinergika (LAMA) eingesetzt. Darüber hinaus kann in Abhängigkeit des vorliegenden Endotyps eine antikörperbasierte Immuntherapie erwogen werden. Dabei stehen aktuell anti-IgE-, anti-IL5-, anti-IL5R-, anti-IL4R- und anti-TSLP-Antikörper zur Verfügung. Während erstere eher für unkontrolliertes allergisches-Asthma geeignet sind, zeigen anti-TSLP-Antikörper auch für nicht-allergisches Asthma mit hohen Leveln an Eosinophilen und FeNO eine gute Wirksamkeit. Mit zunehmendem Verständnis der Pathomechanismen verschiedener Endotypen von Asthma können in Zukunft weitere Biologika entwickelt werden, sodass auch für ICS-Non-Responder eine passende Therapie gefunden werden kann (Papi et al. 2018; Global Initiative for Asthma 2022).

1.2 Extrazelluläre Vesikel (EVs)

1.2.1 Definition und Unterteilung in Untergruppen

EVs sind membranumgebene Partikel mit Durchmessern im Nanometerbereich, die in Abhängigkeit ihrer Ursprungszelle verschiedene Proteine und Nukleinsäuren enthalten und eine Vielzahl an Rezeptoren, Liganden, Zucker- und Lipidresten auf ihrer Membran exprimieren (Henderson und Azorsa 2012; Colombo et al. 2014). Sie kommen in Brustmilch, Blut, Serum, Urin, Speichel, Amnion- und Synovialflüssigkeit vor und werden von fast allen Zellen im gesunden sowie im kranken Zustand abgegeben (Qin und Xu 2014; Abels und Breakefield 2016).

Entsprechend ihrer Größe werden EVs oft in Exosomen (< 100 nm), Mikrovesikel (100-1000 nm) und apoptotische Vesikel (>1000 nm) unterschieden (Bazzan et al. 2021). Die Größenangaben können nur als grobe Orientierung dienen, da sie je nach verwendeter Quelle variieren und teilweise überlappen. Ein zusätzlicher Parameter zur Unterscheidung von Subgruppen ist die Art der Genese. Apoptotische Körperchen entstehen beim Abbau von Zellen während des programmierten Zelltodes (Akers et al. 2013). Exosomen sind endosomalen Ursprungs und entstehen durch intrazelluläre Formierung multivesikulärer Bläschen. Diese verschmelzen mit Zellmembranen, woraufhin enthaltene Exosomen in den Extrazellulärraum abgegeben werden (Théry et al. 2009). Dahingegen entstehen Mikrovesikel durch direktes Abschnüren der Vesikel von Zellmembranen (Minciacchi et al. 2015). Zur weiteren Charakterisierung von Subgruppen wurden verschiedene Oberflächenproteine wie zum Beispiel die Tetraspanine CD9, CD63 und CD81 vorgeschlagen (Andreu und Yáñez-Mó 2014). Jedoch konnten bisher keine spezifischen Marker nachgewiesen werden, um besonders Mikrovesikel und Exosomen eindeutig voneinander zu differenzieren (Yáñez-Mó et al.

2015). Um eine falsche Zuordnung zu vermeiden, wird daher dem „Minimale Informationen für Untersuchungen extrazellulärer Vesikel“ Leitfaden 2018 (MISEV 2018) entsprechend, in dieser Arbeit der Oberbegriff „Extrazelluläre Vesikel“ verwendet (Théry et al. 2018).

In Abhängigkeit ihres Ursprungs enthalten bzw. präsentieren EVs unterschiedliche Signale und Informationen. Forschungsergebnisse der letzten Jahre haben ergeben, dass EVs wichtige Mediatoren interzellulärer Kommunikation darstellen, die autokrin, parakrin und endokrin wirken können (Yáñez-Mó et al. 2015). Als solche ist ihre Rolle für die Regulation der Entstehung und Ausbreitung inflammatorischer Prozesse von großem Interesse. Die Funktion von EVs für Onkogenese und Metastasierung, neurodegenerative Erkrankungen sowie für chronische Erkrankungen des Herz-Kreislaufsystems und der Lunge sind Gegenstand aktueller Forschung (Mohan et al. 2020; Möller und Lobb 2020; Alashkar Alhamwe et al. 2021; Sahoo et al. 2021; Takeuchi 2021; Trappe et al. 2021; Yamamoto et al. 2022).

EVs binden an die Membran von Empfängerzellen oder werden über verschiedene Wege durch diese aufgenommen. Die häufigste Form der Aufnahme von EVs ist die Endozytose (Mulcahy et al. 2014). Dabei scheint die Aufnahme insbesondere abhängig von Energie und Zytoskelett abzulaufen (Lamaze et al. 1997; Fitzner et al. 2011). Auch assoziierte Proteine auf der EV-Membran spielen wohl eine wichtige Rolle für die Aufnahme und damit auch Funktionalität von EVs (Kreimer et al. 2015).

1.2.2 Methoden zur Aufbereitung von EVs

Bisher gibt es keine standardisierte Methode zur Konzentrierung von EVs aus biologischen Flüssigkeiten und Zellkulturüberständen. Die bis dato am häufigsten angewandte Methode ist die Ultrazentrifugation (UZ) (Stam et al. 2021). Eine zunehmend häufiger genutzte Alternative der EV-Konzentrierung stellt die Größenausschlusschromatographie (SEC) dar (Nordin et al. 2015). Hierbei wird eine Suspension auf eine Säule gegeben, die eine Matrix mit unterschiedlich großen Poren enthält (Stam et al. 2021). Durchgelaufene Flüssigkeit wird in Fraktionen gesammelt. Große Partikel einer Suspension passen nur in wenige Poren, laufen somit schnell durch die Säule und finden sich in frühen Fraktionen. Kleine Partikel dagegen „verirren“ sich in den Poren, laufen langsamer durch die Säule und werden in späteren Fraktionen gesammelt (Taylor und Shah 2015). Limitierend bei dieser Methode ist das kleine Probenvolumen von 500 µL, das maximal auf eine SEC-Säule gegeben werden sollte, um Schwankungen des hydrostatischen Drucks vorzubeugen. Meist wird deshalb vor und ggf. auch nach einer SEC zusätzlich eine Ultrafiltration (UF) zur Volumenreduktion durchgeführt (Guerreiro et al. 2018).

Da die Durchflussgeschwindigkeit und damit die Auftrennung von Partikeln vom hydrostatischen Druck in der Säule abhängt, ist es wichtig durch stetige Hinzugabe von Flüssigkeit einen konstanten Druck der Wassersäule zu erhalten. In vielen Fällen wird hierfür eine Phosphat-gepufferte-Kochsalzlösung (PBS) verwendet. Es gibt jedoch Untersuchungen, die zeigen, dass PBS durch in ihm enthaltenes Phosphat das Zeta-Potential von EVs verändert und somit zu einer Veränderung der Funktionalität von EVs führen könnte (Midekessa et al. 2020). Eine gute Alternative besteht laut Midekessa et al. (2020) in der Verwendung einer 0,9 %-Natriumchlorid-Lösung (NaCl-Lösung), die als isoosmotische Lösung mit einfach geladenen Ionen keinen oder nur einen sehr geringen Einfluss auf das Zeta-Potential von EVs nimmt.

1.2.3 Methoden zur Charakterisierung und Darstellung von EVs

EVs sind sehr kleine und heterogene Partikel. Daher ist ihre Erfassung methodisch sehr anspruchsvoll. Technologische Fortschritte der letzten Jahre ermöglichten verbesserte Methoden zur Analyse von EVs und weitere Optimierungen werden sicherlich folgen (Welsh et al. 2020).

Zur Quantifizierung und Determinierung von EVs und ihrer Eigenschaften stehen zahlreiche Methoden zur Verfügung. Zu den am häufigsten verwendeten gehören „*Nanoparticle tracking analysis*“, „*Dynamic light scattering*“, „*High-resolution flow cytometry*“, „*Elektron microscopy*“, „*Atomic force microscopy*“ und „*Confocal microscopy*“ (Rupert et al. 2017). Dabei hat jede Methode ihre Vor- und Nachteile und die Auswahl ist abhängig von den Parametern, die gemessen werden sollen (Gómez-Serrano et al. 2021). Für Experimente, die in dieser Arbeit beschrieben werden, wurden „*High-resolution flow cytometry*“ bzw. „Nanoflow Zytometrie“ (NanoFCM) und „*Confocal microscopy*“ bzw. Konfokalmikroskopie angewendet.

NanoFCM ist eine Methode mit hoher Durchsatzleistung, die zur Multi-Parameter-Analyse einzelner Partikel mit einer großen Spannweite von Durchmessern geeignet ist (Welsh et al. 2017). Schätzungen zufolge wird NanoFCM aktuell für 90 % EV-bezogener Forschungsprojekte verwendet (Valkonen et al. 2017). Mithilfe der NanoFCM können Partikelkonzentrationen, Durchmesser sowie ggf. Fluoreszenzintensität einzelner Partikel gemessen werden. Ein Nachteil dieser Methode ist die bisher ungenügende Standardisierung von prä-, peri- und postanalytischen Bedingungen, wodurch NanoFCM Ergebnisse oft kaum miteinander vergleichbar sind (Tertel et al. 2020). Dieser Problematik versuchten Welsh et al. entgegenzuwirken, indem sie einen Leitfaden zur Standardisierung von EV-Analysen durch NanoFCM entworfen haben (Welsh et al. 2020).

Ein Konfokalmikroskop verfügt über eine hohe Kontrastauflösung, die ausreicht, um Fluoreszenz-markierte EVs als farbige Punkte darzustellen. Jedoch ist es dabei nicht möglich morphologische Eigenschaften von EVs zu bestimmen oder zu unterscheiden, ob es sich bei einem fluoreszierenden Punkt tatsächlich um ein einzelnes EV, eine EV-Ansammlung oder ein Farbstoffaggregat handelt (Verweij et al. 2021). Im Gegensatz zu anderen Formen der hochauflösenden Mikroskopie erfordert die Konfokalmikroskopie keine aufwendigen Prozeduren der Probenvorbereitung wie Kryoimmobilisierung oder „slicing“ (Chuo et al. 2018). Die einzige Voraussetzung für eine erfolgreiche Konfokalmikroskopie ist eine angemessene Fluoreszenzfärbung aller darzustellenden Strukturen (Bayguinov et al. 2018). EVs können zum Beispiel indirekt durch spezifische fluoreszenzgekoppelte monoklonale Antikörper (mAbs) gegen Tetraspanine markiert werden. EVs können allerdings auch direkt durch Fluoreszenz markiert werden. Hierzu stehen zum Beispiel der aminophile Farbstoff 5-(6)-Carboxyfluorescein-Diacetat-Succinimidyl-Ester (CFDA-SE) oder der lipophile Farbstoff 3,3'-Diocetadecyloxycarbocyanine Perchlorat (DiO) zur Verfügung. DiO ist ein langkettiger Dialkylcarbocyanin-Farbstoff. Auf Grund seiner lipophilen Eigenschaften diffundiert DiO in Membranen und fluoresziert daraufhin stärker als in Lösung (Invitrogen 2008). CFDA-SE ist ein nicht-fluoreszierendes Molekül, das durch biologische Membranen hindurchdiffundieren kann. Werden seine Acetat-Gruppen intrazellulär durch Esterasen abgespaltet, wird das enthaltene Chromophor Fluorescein aktiviert. In seiner deacetylierten Form ist Carboxyfluorescein-Succinimidyl-Ester (CFSE) nur noch schlecht membrangängig und hoch aminophil (Abbildung 1). Während ungespaltenes CFDA-SE also wieder in den Extrazellulärraum treten kann, kommt es intrazellulär zum Anfluten von gespaltenem CFSE, welches kovalent an Aminogruppen bindet (Quah und Parish 2010). Zur Markierung von EVs wurde CFSE im Rahmen anderer Studien bereits verwendet. Dabei zeigte sich eine hohe Färbefeffizienz bei geringer Artefaktneigung (Morales-Kastresana et al. 2017).

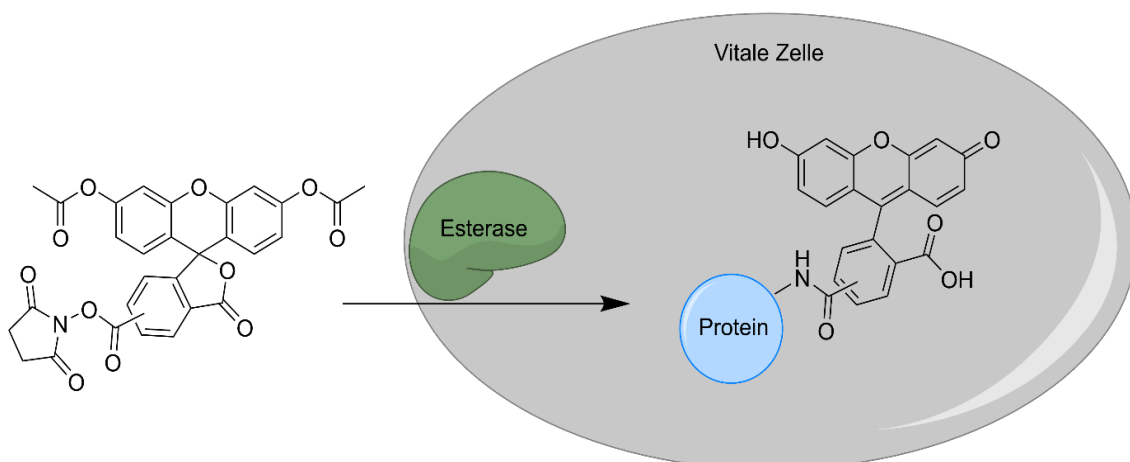


Abbildung 1: Färbemechanismus von CFSE. Erstellt mit ChemDraw Professional.

1.2.4 Ansprüche an eine funktionelle EV-Analyse

Das Forschungsfeld von EVs ist jung und somit sehr dynamisch. Einer Standardisierung angewandter Methoden kommt daher zur besseren Reproduzierbarkeit und Vergleichbarkeit von Ergebnissen eine große Bedeutung zu. Um hierfür einen Rahmen zu bieten, wurde 2014 die MISEV-Leitlinie von der internationalen Gesellschaft für Extrazelluläre Vesikel (ISEV) entwickelt und 2018 überarbeitet (Lötvall et al. 2014; Théry et al. 2018). In den MISEV Leitlinien von 2018 wird ein Rahmen für Untersuchungen und daraus ableitbare Interpretationen bezüglich Funktionen von EVs vorgegeben. Die Experimente, die in dieser Arbeit beschrieben werden, wurden weitgehend entsprechend den Vorgaben der MISEV Leitlinien durchgeführt und interpretiert. Es folgt ein kurzer inhaltlicher Überblick der MISEV-Leitlinie 2018 bezüglich funktioneller Untersuchungen von EVs.

Der übliche Ablauf einer funktionellen EV-Analyse besteht in drei Schritten. Zuerst erfolgt eine Separierung und Konzentrierung von EVs aus einer biologischen Probe, sodass eine EV-angereicherte Suspension und ein EV-freies/armes Restvolumen entstehen. Dann wird die EV-angereicherte Probe auf Empfängerzellen gegeben. Zuletzt erfolgt eine Analyse eines zuvor festgelegten „Readouts“ zur Erfassung der Reaktion der Empfängerzellen. Die Leitlinien empfehlen nach der Separierung und Konzentrierung von EVs zu überprüfen, ob die EV-Probe auch tatsächlich EVs und das nicht-EV-Volumen dagegen keine EVs enthält. Zudem sollte eine Form der Normalisierung eingeführt werden, die als Vergleichsparameter für EV-Proben weiterer Experimente dienen kann. Als mögliche Parameter können zum Beispiel die Partikelanzahl, die Menge eines bestimmten EV-assoziierten Biomoleküls (z.B. Protein, Nukleinsäure) oder die Menge an Ursprungsmaterial bestimmt werden. Für den nächsten Schritt der Inkubation von Empfängerzellen mit einer EV-Probe geben die Autoren der Leitlinie zu bedenken, dass die Ursprungszellen der EVs in räumlicher Trennung von den Empfängerzellen kultiviert werden sollten, um tatsächlich eine Aussage über EV-Funktionen ableiten zu können. Zudem betonen sie die Wichtigkeit einer sorgfältigen Auswahl an Kontrollen. Dabei sollte die Trägerflüssigkeit einer EV-Probe als Negativkontrolle verwendet werden. Zusätzliche sollte parallel zum EV-Volumen auch das zugehörige nicht-EV-Volumen und ein Teil des Ursprungsvolumen in separaten Ansätzen auf Empfängerzellen gegeben werden. So soll erfasst werden, inwieweit eine Reaktion von Empfängerzellen auf die Funktion von EVs, nicht EV-assoziierten löslichen Molekülen bzw. auf eine Kombination aus beiden zurückzuführen ist. Außerdem sollte für die Interpretation beachtet werden, dass eine vermeintliche EV-Funktion lediglich auf EV-assoziierte Moleküle zurückzuführen sein könnte.

1.3 *Air-liquid-interface*-Kulturen (ALI-Kulturen)

ALI-Kulturen sind ein *in vitro*-System zur Kultivierung von Epithelzellen, das 1988 entwickelt wurde (Whitcutt et al. 1988). Durch seinen speziellen Aufbau ergibt dieses System eine möglichst genaue Repräsentation der *in vivo*-Situation humaner Atemwegsepithelien. So können verschiedene physiologische und pathologische Zusammenhänge des Atemwegsepithels möglichst realitätstreu untersucht werden (Baldassi et al. 2021). Abbildung 2 zeigt einen schematischen Aufbau des Systems. Es besteht aus einem basalen und einem apikalen Kompartiment, welche durch eine mit Poren versetzte Membran unvollständig voneinander getrennt werden. Durch Anhaftung, Wachstum und Ausbildung von TJs zwischen Epithelzellen auf der porösen Membran wird eine vollständige Barriere zwischen apikalem und basalem Kompartiment gebildet (Chen und Schoen 2019). Bis die Zellen eine vollständige Zellschicht ausgebildet haben, werden sie durch ein Medium im apikalen sowie basalen Kompartiment ernährt. Danach erfolgt die Ernährung der Zellen aus dem basalen Kompartiment, während im apikalen Kompartiment Luft ist. Durch diese Art der *in vitro*-Kultur wird eine vollständige Differenzierung in Atemwegsepithel mit Flimmerepithel-, Becher- und Basalzellen gefördert (Ghio et al. 2013; Cozens et al. 2018). Daher sind ALI-Kulturen ein geeignetes Modell, um die *in vivo*-Situation eines komplexen Atemwegsepithels zu simulieren und pathologische Zusammenhänge chronisch-entzündlicher Lungenerkrankungen wie Asthma bronchiale, chronisch obstruktive Lungenerkrankung (COPD), zystische Fibrose oder Lungenkrebs zu untersuchen (Derichs et al. 2011; Hackett et al. 2011; Baldassi et al. 2021).

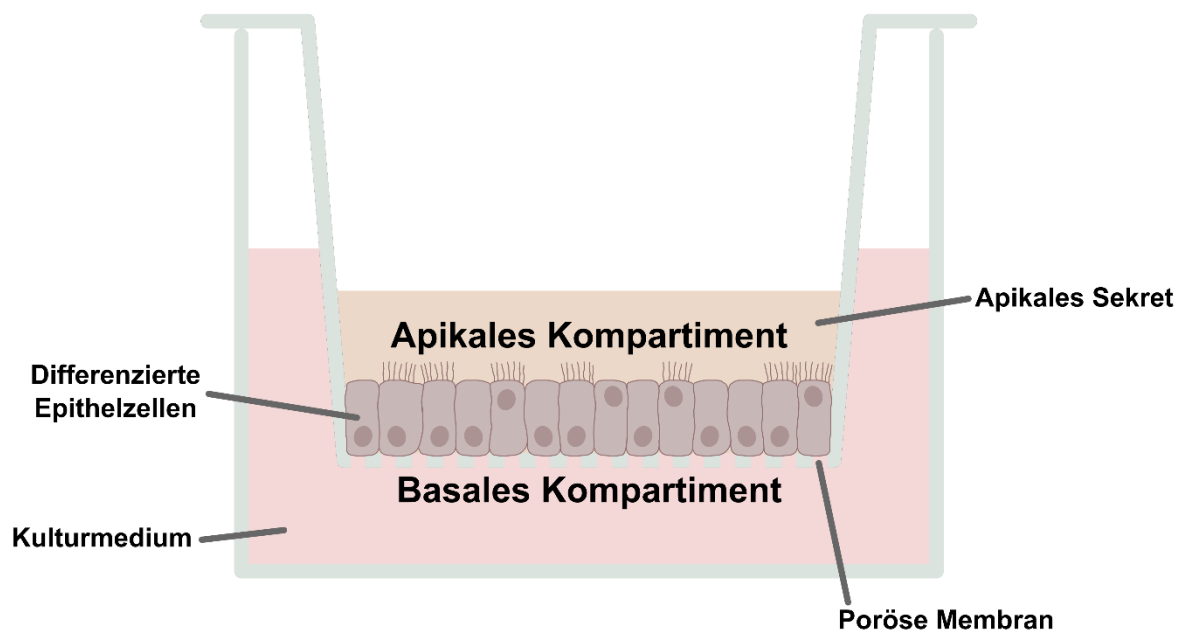


Abbildung 2: Schematischer Aufbau einer ALI-Kultur mit basalem und apikalem Kompartiment. Getrennt werden die Kompartimente durch eine poröse Membran, auf welcher ein differenziertes Atemwegsepithel liegt.

1.4 Hypothese und Fragestellung

Wie sich in den vergangenen Jahren herausgestellt hat, stellen EVs einen wichtigen Teil interzellulärer Kommunikation eines Organismus im gesunden sowie kranken Zustand dar. In dieser Arbeit wurde der Frage nachgegangen, ob EVs für die Entstehung und Ausbreitung chronischer Entzündungsreaktionen im Rahmen von Asthma bronchiale von funktioneller Bedeutung sind. Es wurde die Hypothese aufgestellt, dass EVs von asthmatisch veränderten primären bronchialen Epithelzellen (PBEZ), im Gegensatz zu EVs von gesunden PBEZ, Entzündungssignale übermitteln und so zu einer Stressreaktion in gesunden Epithelzellen führen. Zudem wurde hypothetisiert, dass EVs ihrer Funktion als Signalübermittler erst nach Bindung oder Aufnahme durch Empfängerzellen nachkommen können.

Zur Untersuchung der aufgestellten Hypothesen wurde Probenmaterial von PBEZ zunächst durch SEC und UF aufgereinigt, um konzentrierte und reine EV-Proben zu erhalten. Die Konzentrationen und Durchmesser enthaltener Partikel wurden mittels NanoFCM analysiert. Danach wurden verschiedene Methoden der Markierung von EVs durch Fluoreszenz untersucht, die beste identifiziert und zur Weiterverwendung bestimmt. Im nächsten Schritt wurde mithilfe der Konfokalmikroskopie nachverfolgt, ob Fluoreszenz-markierte EVs durch Empfängerzellen gebunden und aufgenommen

werden. Als Empfängerzellen wurde ein *in vitro*-Modell einer Zelllinie bronchialer Atemwegsepithelzellen (BEAS-2B) verwendet. Weiterhin wurden BEAS-2B Zellen gegenüber zuvor aufgereinigter EV-Proben exponiert, die von drei gesunden und drei asthmatischen Donoren stammten. Um Reaktionen von BEAS-2B Zellen auf eine solche Exposition zu messen, wurden die Methoden „Echtzeit-quantitative-Polymerase-Ketten-Reaktion“ (RT-qPCR), „Enzym-gekoppelter Immunadsorptionstest“ (ELISA) und indirekte NO-Quantifizierung nach Griess angewendet.

Ziel der Untersuchungen war es zu klären, ob EVs eine funktionelle Rolle in der Entstehung und Ausbreitung inflammatorischer Prozesse während Asthma einnehmen. Dies könnte in Zukunft zu einem besseren Verständnis von zugrundeliegenden Pathomechanismen und entscheidenden Akteuren von Asthma bronchiale beitragen.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Informationen zu verwendeten EVs

Alle EVs, die für in dieser Arbeit beschriebene Experimente verwendet wurden, stammten von PBEZ, die in ALI-Kulturen kultiviert wurden. Eine apikale Probe wurde durch Spülung des apikalen Kompartiments mit PBS erhalten. Für eine Probe des basalen Kompartiments wurde Zellkulturüberstand entnommen. Zusätzlich wurde das basale Kompartiment durch PBS gespült und mit dem zuvor entnommenen Zellkulturüberstand zusammengefügt. Nach Abnahme wurde das Probenmaterial zentrifugiert, um Zellreste zu entfernen und bis zur weiteren Verwendung bei -80° eingefroren. Die Bezeichnung EV-Probe wird im Weiteren erst dann verwendet, wenn eine Aufreinigung durch UF und SEC erfolgt ist.

Für Experimente zur Aufbereitung, Fluoreszenzmarkierung und Aufnahme von EVs durch BEAS-2B Zellen wurden Proben verwendet, die von der AG Schmeck und Dr. Birke Benedikter zur Verfügung gestellt wurden. Dabei wurden für Experimente zur Aufbereitung und Fluoreszenzmarkierung sowohl Proben apikalen als auch basalen Ursprungs verwendet. Zur Untersuchung der Aufnahme von fluoreszenzmarkierten EVs in BEAS-2B Zellen, wurden dagegen lediglich Proben apikalen Ursprungs verwendet.

Für Stimulationsexperimente von BEAS-2B Zellen durch EV-Proben, wurden Proben verwendet, die zuvor in der AG Garn durch Lukas Hintz gewonnen wurden. Hierzu wurden PBEZ von drei gesunden und drei asthmatischen Donoren in ALI-Kulturen kultiviert. Dabei wurden lediglich EVs des apikalen Kompartiments verwendet.

Über die verschiedenen Spenderzellpopulationen lag im Vorfeld keine weitere Charakterisierung außer „asthmatisch“ und „nicht-asthmatisch“ vor. Vereinfachend wurde davon ausgegangen, dass „nicht-asthmatisch“ mit „gesund“ gleichzusetzen war. EV-Proben wurden als „asthmatisch“ bzw. „gesund“ bezeichnet.

Eine Übersicht über die Ursprungsmaterialien verwendeter EVs wird in Tabelle 1 angegeben.

Table 1: Informationen zu Ursprungsmaterial für EV-Gewinnung

Informationen zu verwendeten Proben	Beschreibung unter Kapitel	Erhalten von
Zellkulturüberstand gesunder PBEZ, apikal	3.1, 3.2, 3.3	Dr. Birke Benedikter, AG Schmeck
Zellkulturüberstand gesunder PBEZ, basal	3.2.2	Dr. Birke Benedikter, AG Schmeck
Zellkulturüberstand asthmatischer PBEZ, von 3 Spendern, apikal	3.4	Lukas Hintz, AG Garn
Zellkulturüberstand gesunder PBEZ, von 3 Spendern, apikal	3.4	Lukas Hintz, AG Garn

2.1.2 Hilfs- und Verbrauchsmaterialien

Table 2: Hilfs- und Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Katalognummer	Hersteller
96- Well-Platten, weiß, transparenter Boden	3903	Corning Inc., Corning, NY, US
Abdeckfolie, EASYseal, transparent (79x135 mm)	676001	Greiner bio-one GmbH, Kremsmünster, AT
Amicon Ultrafilter (4 mL, 15 mL)	UF C801024, UF C901024	Merck KGaA, Darmstadt, DE
Cryo Pure Gefäß (1,6 mL)	72.380	Sarstedt AG & Co. KG, Nürnbrecht, DE
F96 Maxisorp nunc-immuno Platte	442404	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
Filterspitzen, PCR-performance-getestet (verschiedene Größen)	S1120-3750, S1123-1740, S1122-1730, 70.3050.200	Starlab NV/SA, Brüssel, BE; Sarstedt AG & Co. KG, Nürnbrecht, DE
µ-Slide 8 Well	80826	Ibidi GmbH, Gräfelfing, DE
Nalgene Cryo 1°C Freezing Container	5100-0001	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA

PCR-Reaktionsgefäße (0,2 mL)	781305	Th. Geyer GmbH & Co. KG, Renningen, DE
Pipettenspitzen (verschiedene Größen)	732002, 732008, S1111-6001	Brand GmbH + Co. KG, Wertheim, DE; Starlab NV/SA, Brüssel, BE
Reaktionsgefäße (verschiedene Größen)	72.691, 0030 125.150, S1111-6001	Sarstedt AG & Co. KG, Nürnberg, DE; Eppendorf SE, Hamburg, DE; Starlab NV/SA, Brüssel, BE
Röhrchen, konisch (15 mL, 50 mL)	188271, 227261	Greiner bio-one GmbH, Kremsmünster, AT
Stabpipetten (verschiedene Größen)	86.1253.001, 86.1254.001, 86.1685.001	Sarstedt AG & Co. KG, Nürnberg, DE
Sterilfilter Puradisc™ 25 mm (0,22 µm)	6780-2502	Tisch Scientific, North Bend, OH, US
SEC-Säule		Zur Verfügung gestellt von Dr. Christian Preusser, AG Pogge von Strandmann, Marburg, DE
TC-Platte Standard (48- Wells)	83.3923	Sarstedt AG & Co. KG, Nürnberg, DE
TC-Flasche T25, TC-Flasche T75	83.3910.002, 83.3911.002	Sarstedt AG & Co. KG, Nürnberg, DE

2.1.3 Lösungen und Substanzen

Table 3: Lösungen und Substanzen

Bezeichnung	Bestellnummer	Hersteller
BEGM™ Bronchial Epithelial Cell Growth Medium BulletKit™ (BEGM)	CC-3171 und CC-4175	Lonza Group AG, Verviers, BE
Beta-Mercaptoethanol	4227.3	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, DE

Bovines Serumalbumin (BSA)	AC-AF-0006	Anprotec, Bruckberg, DE
Dimethylsulfoxid (DMSO)	A994.1	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, DE
Ethanol 70 % (vergällt)	7070112	Otto Fischar GmbH + Co. KG, Saarbrücken, DE
Ethanol (99,8 %)	9065.4	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, DE
Isopropanolol/2-Propanol	20922.320	VWR International, Radnor, PA, US
Lipopolysaccharid (LPS) [1 µg x µL ⁻¹]	024M469V	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, US
NaCl kristallin	3957.1	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, DE
Natriumhydroxid (NaOH) kristallin	6771.1	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, DE
PBS Lösung (steril)	D8537	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, US
PBS Pulver	BE15-516F	Lonza Group AG, Verviers, BE
Formaldehyd Lösung 35 %	4980.1	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, DE
POD-Substratlösung BM Blue	11484281001	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, US
Polyvinylpyrrolidon (PVP)		Zur Verfügung gestellt von AG Schmeck, Marburg, DE
Schwefelsäure 96 % (H ₂ SO ₄)	4623.2	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, DE
Tris-gepufferte-Salzlösung (TBS)	T5912	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, US

Trypsin/EDTA 1X in PBS	AC-EZ-0009	Anprotec, Bruckberg, DE
Tween 20	9127.2	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, DE

2.1.4 Fluoreszenzfarbstoffe

Tabelle 4: Fluoreszenzfarbstoffe

Bezeichnung	Katalognummer	Hersteller
DiO	D275	Invitrogen AG, Carlsbad, CA, US
4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI)	422801	BioLegend, San Diego, CA, US
CFDA-SE	21888	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, US
Phalloidin-iFluor 555 Reagent (Phalloidin)	Ab176756	Abcam plc., Cambridge, UK

2.1.5 Kits

Tabelle 5: Kits

Bezeichnung	Katalognummer	Hersteller
Human IL-8/CXCL8 DuoSet ELISA	DY208-05	R&D Systems Inc., Minneapolis, MN, US
NO-Assay-Kit	254253-001	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, US
qScript [®] Flex cDNA Synthesis Kit	733-1181	Quantabio, Beverly, MA, US
QuantiNova SYBR Green PCR Kit	208056	Qiagen N.V., Venlo, NL
RNase-Free DNase Kit	166032239	Qiagen N.V., Venlo, NL
RNeasy [®] Mini Kit	74106	Qiagen N.V., Venlo, NL

2.1.6 Zusammensetzung von Puffern und Medien

2.1.6.1 Zellkultur

BEGM:

- BEGM: Alle Zusätze des Bullet Kits
- BEGM ohne Hydrokortison (HC): Alle Zusätze des Bullet Kits außer HC

Einfriermedium:

- 40,75 % (v/v) BEGM-Medium, 40,75 % (v/v) Zellkulturüberstand, 7,5 % (v/v) DMSO, 1 % (v/v) PVP

1 %-PVP:

- 1 g PVP in 10 mL PBS → 10 %-PVP
- 1 mL 10 %-PVP in 9 mL Einfriermedium ohne PVP

2.1.6.2 EV-Aufbereitung

0,9 %-NaCl-Lösung:

- 9 g NaCl in 991 g vollentsalztes Wasser (VE-Wasser), vermischt durch Rührfisch auf Magnetplatte, durch 0,22 µm-Sterilfilter gefiltert

NaOH-Lösung (0,5M):

- 4 g NaOH in 196 g VE-Wasser, vermischt durch Rührfisch auf Magnetplatte, durch 0,22 µm-Sterilfilter gefiltert

2.1.6.3 Fluoreszenzfärbung

DAPI:

- 0,9 µL DAPI in 899,1 µL PBS

4 %-PFA:

- 2,286 mL 35 % Paraformaldehyd in 20 mL VE-Wasser

Phalloidin:

- 0,9 µL Phalloidin und 9 mg BSA in 899,1 µL PBS

2.1.6.4 RT-qPCR

Primer-Mix:

- Lyophilisierter Primer in nukleasefreiem Wasser rekonstituiert (100 µM).
- 25 µL forward-Primer, 25 µL reverse-Primer (50 µL; 100 µM), 450 µL nukleasefreies Wasser (10 µM)

RLT-Puffer:

- 10 µL beta-Mercaptoethanol in 1 mL RLT-Puffer

2.1.6.5 DuoSet-ELISA-Kit

Blockpuffer:

- PBS, 1 % BSA

ELISA-Reagent Diluent (RD):

- TBS, 1 % BSA, 0,05 % Tween 20

ELISA-Waschpuffer:

- PBS, 0,1 % Tween 20

Fänger-Antikörper-Lösung:

- 83,3 µL Fänger-Antikörper in 10 mL PBS

Nachweis-Antikörper-Lösung:

- 166,7 µL Nachweis-Antikörper in 10 mL ELISA-RD

PBS:

- 95,5 g PBS-Pulver in 10 L VE-Wasser, durch 0,22 µm-Sterilfilter gefiltert

Stopp-Lösung (2M H₂SO₄):

- 11,1 µL 96 % H₂SO₄ in 88,9 µL VE-Wasser, durch 0,22 µm-Sterilfilter gefiltert

2.1.7 Geräte

Tabelle 6: Geräte

Modell	Seriennummer	Hersteller
CellDrop Zellzähler	S-05907	DeNovix Inc., Wilmington, DE, US
Laser scanning microscope	LSM 700	Carl Zeiss AG, Oberkochen, DE
Megafuge ST4R Plus	42638044	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, US
MJ Mini Personal Thermal Cycler	MM009090	Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA, US
NanoFCM	N30Demo	Nanofcm Inc., Nottingham, UK
Nanodrop 2000/2000c Spektralphotometer	ND-2000	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, US

Rotor Gene Q	R0513216	Qiagen N.V., Venlo, NL
Tecan Reader infinite 200 PRO	2101005893	Tecan Group AG, Männedorf, CH

2.1.8 Software

Tabelle 7: Computerprogramme

Bezeichnung	Version
GraphPad Prism	9.3.0
ImageJ	1.53
Microsoft Excel für Mac	15.26 (160910)
NanoFCM software	NF Profession V 1.08
Rotor Gene Q	2.1.0
Tecan i-control	2.0.10.0
Zen 2010 Software	6.0.

2.1.9 Primer

Tabelle 8: Primer

Primer	Sequenz
Claudin (CLDN) 1 fw	CGA TAT TTC TTC TTG CAG GTC TGG
CLDN1 rev	CAG CCA GTG AAG AGA GCC TGA
CLDN4 fw	CCA CTC GGA CAA CTT CCC AA
CLDN4 rev	ACT TCC GTC CCT CCC CAA TA
E-Cad fw	CTG ATG CTG ATG CCC CCA ATA
E-Cad rev	TGC ATC TTG CCA GGT CCT TT
Glycerinaldehyd-3-phosphat- Dehydrogenase (GAPDH) fw	ACA ACT TTG GTA TCG TGG AAG G
GAPDH rev	GCC ATC ACG CCA CAG TTT C
IL8 fw	CAG CTC TGT GTG AAG GTG CAG TT

IL8 rev	TTT CCT TGG GGT CCA GAC AGA
IL25 fw	TCA CTC CCT AAA AAG ACA GTG GAA
IL25 rev	GCC AAG AAT GCA ACC ACC TG
MUC5AC fw	ACC TGT GAC AGC AGG ATG TG
MUC5AC rev	ACT CGC AGT CTC CGT TGA AG
Induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase (NOS2) fw	AGA GCC AGA AGC GCT ATC AC
NOS2 rev	TTG AAG TGG TGC ACT CAG CA
Occludin (OCLN) fw	ACA GAC TAC ACA ACT GGC GG
OCLN rev	GCT CTT GTA TTC CTG TAG GCC A
Phosphoglycerat Kinase 1 (PGK1) fw	GTT GAC CGA ATC ACC GAC CT
PGK1 rev	AGC AGC CTT AAT CCT CTG GTT
PYCARD fw	TGG ATG CTC TGT ACG GGA AG
PYCARD rev	CCA GGC TGG TGT GAA ACT GAA
Tight-Junction-Protein 1 (TJP1) fw	CTG GTG AAA TCC CGG AAA AAT GA
TJP1 rev	TTG CTG CCA AAC TAT CTT GTG A
TSLP fw	TGA CTC TCG ACT TGT GTT CCC
TSLP rev	GCA ATG TGG CTG CTC ATA GG
Vim fw	CCT CCC TGA ACC TGA GGG AAA C
Vim rev	GCT GCA CTG AGT GTG TGC AAT
Zonula Occludens 1 (ZO1) fw	ATC AGC ACA GTG CCT AAA GCT A
ZO1 rev	TGT GGC CAC CAC AGT ATG AC

2.2 Methoden

2.2.1 Zellbiologische Methoden

2.2.1.1 *In vitro* Kultur bronchialer Epithelzellen

BEAS-2B Zellen sind eine humane, nicht karzinomatöse, bronchiale Epithelzelllinie. Sie wurden durch die Infektion mit einem Ad-12-SV40 Hybrid Virus transformiert (Reddel et al. 1988). BEAS-2B Zellen sind ein etabliertes Modell für *in vitro*-Studien des menschlichen Lungenepithels und assoziierter pathologischer Prozesse (Xatzipsalti und Papadopoulos 2007; Laulicht et al. 2015; Zhang et al. 2015). Die Kultur der Zellen erfolgte entsprechend der Empfehlung der *American Type Culture Collection* (ATCC) in BEGM. Es wurden alle Medienzusätze verwendet, inklusive des Gentamycin- und Amphotericin-Zusatzes (GA-1000-Zusatz).

Alle Arbeitsschritte der Zellkulturoutine erfolgten unter sterilen Bedingungen. Die Mengenangaben beziehen sich auf die Kultur in einer TC-Flasche T25. Bei Verwendung einer TC-Flasche T75 wurden die Mengenangaben entsprechend hochskaliert.

2.2.1.2 Auftauen und Aussäen gefrorener BEAS-2B Zellen

BEAS-2B Zellen wurden in Cryo Pure Gefäßen in Flüssigstickstoff gelagert. Zum Auftauen wurde ein Gefäß, welches die gefrorene Zellsuspension (ca. 1 mL a 1×10^6 Zellen) enthielt, für 2 min in ein 37°C warmes Wasserbad gehalten. Dabei wurde vermieden, das Gefäß oberhalb vom Isolierungsring in das Wasser zu halten, um die Gefahr einer Kontamination möglichst gering zu halten. Nachdem der Inhalt des Gefäßes aufgetaut war, wurde er zu 9 mL vorgewärmtem BEGM hinzugegeben. Dann erfolgte eine Zentrifugation bei 20°C, 200 x g, für 10 min. Der Überstand wurde entfernt und das Zellpellet in vorgewärmtem BEGM (2-3 mL) resuspendiert. Die Konzentration der Zellsuspension wurde mittels eines CellDrop-Zellzählers bestimmt und die Zellen mit 10 000 Zellen/cm² in die Zellkulturflasche ausgesät. Die Zellkultur wurde bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert.

2.2.1.3 Subkultivierungsroutine von BEAS-2B Zellen

Zellkulturüberstand wurde abgesaugt und der Zellrasen mit 5-7 mL vorgewärmtem PBS gespült. Im nächsten Schritt wurden die adhärennten Zellen durch Trypsin/EDTA (2,5 mL) vom Boden der Kulturflasche abgelöst. Nach 5-7 min Inkubation bei 37°C, 5 % CO₂ wurde die Reaktion des Enzyms durch Hinzugabe von 4,5 mL BEGM abgestoppt. Die Zellsuspension wurde in ein Reaktionsgefäß (15 mL) überführt. Der Boden der Kulturfalsche wurde mit 3 mL vorgewärmtem PBS gespült, um noch verbliebene Zellen in Suspension zu bringen. Die Spüllösung wurde zu der Zellsuspension hinzugegeben. Dann folgte eine Zentrifugation bei 20°C, 200 x g für 7 min. Der Überstand wurde abgesaugt, das Zellpellet in vorgewärmtem PBS resuspendiert und erneut bei 20°C,

200 x g für 7 min zentrifugiert. Nachdem der Überstand abgesaugt war, wurde das Zellpellet in BEGM (2-3 mL) resuspendiert. Nach Messung der Zellkonzentration erfolgte die Aussaat mit 3 000 Zellen/cm² in 8-10 mL BEGM. Die Zellen wurden bei 37°C, 5 % CO₂ bis zum Erreichen von 80-90 % Konfluenz inkubiert. BEAS-2B Zellen sollten nach Erreichen von 80-90 % Konfluenz subkultiviert werden, da sie sich ansonsten terminal zu Plattenepithel differenzieren. Das Kulturmedium wurde abhängig von der Zelldichte alle 2-3 Tage gewechselt.

2.2.1.4 Einfrieren von BEAS-2B Zellen

Die Einfrieroutine entsprach im Wesentlichen dem Protokoll der Subkultivierungsroutine. Jedoch wurde das Zellpellet nach zweimaliger Zentrifugation in Einfriermedium resuspendiert. Nach Bestimmung der Konzentration der Zellsuspension wurden 1 x 10⁶ Zellen in ein Cryo Pure Gefäße umgefüllt. Cryo Pure Gefäße wurden in einen mit Isopropanol gefüllten Nalgene Cryo 1°C Freezing Container über Nacht bei -80°C gelagert, um ein schonendes, verlangsamtes Einfrieren der Zellen zu ermöglichen. Am nächsten Tag wurden die Cryo Pure Gefäße in Flüssigstickstoff transferiert.

2.2.1.5 Konzentrationsbestimmung der Zellsuspension

Die Konzentrationsbestimmung erfolgte mittels eines CellDrop-Zellzählers. Vor jeder Messung wurde eine Kontrollzählung mit PBS ohne Zellen durchgeführt. Wenn diese 0 Zellen x mL⁻¹ ergab, wurde die Konzentration einer Zellsuspension bestimmt. Dazu wurden 10 µL der Zellsuspension von der Seite in die Zählkammer pipettiert. Über einen Live-View-Bildschirm konnte die Verteilung der Zellsuspension durch Kapillarkräfte in der Zählkammer verfolgt werden. Sobald sich die Zellen nicht mehr bewegten, wurden die Zellen gezählt. Die Konzentrationsangabe erfolgte in Zellen x mL⁻¹.

Über den Live-View-Bildschirm konnte durch eine blaue Umrandung der gezählten Signale nachverfolgt werden, ob alle gewünschten Signale gezählt wurden. Falls dies nicht der Fall war, konnten Größe, Durchmesser und Rundung in den Einstellungen angepasst werden, um alle gewünschten Signale in der Zählung zu inkludieren. Für sämtliche Konzentrationsbestimmungen wurden die gleichen, auf BEAS-2B Zellen abgestimmte Geräteeinstellungen verwendet.

2.2.2 Aufbereitung von EVs

2.2.2.1 UF (A)

Für die UF(A) wurden Amicon Ultrafilter mit einer Membran aus regenerierter Cellulose verwendet, die über eine Molekulargewichtsgrenze von 10 kDa und ein Fassungsvermögen von 15 mL verfügten.

Eine aufzureinigende Probe wurde in einen Ultrafilter übertragen und bei 4°C, 4000 x g zentrifugiert bis noch ungefähr 300 µL oberhalb der Filtermembran verblieben. Bei einem Startvolumen von 15 mL betrug die Dauer der Zentrifugation ungefähr 20 min. Die Dauer variierte in Abhängigkeit der Dichte einer Probe und wurde jeweils angepasst, um ungefähr vergleichbare Endvolumina zu erreichen.

Das verbliebene Volumen wurde in ein separates Reaktionsgefäß (1,5 mL) umgefüllt. Der Ultrafilter wurde mit 0,22 µm-gefilterter 0,9 %-NaCl-Lösung gespült, welche zum Probenmaterial hinzugegeben wurde. Die Durchführung einer UF(A) diente der Volumenreduktion einer Probe, da für eine effektive SEC ein Volumen von <0,5 mL nicht überschritten werden sollte.

2.2.2.2 SEC

Für die SEC wurde eine Säule verwendet, die eine Sepharosematrix enthält. Darüber war ein Kunststofffilter eingebracht, der als mechanischer Schutz diente und einer groben Verunreinigung der Säule vorbeugte.

Die Tropfgeschwindigkeit der Säule wurde bei jeder SEC notiert. Bei Verlangsamung der Tropfgeschwindigkeit einer Säule wurde sie durch eine neue Säule ausgetauscht, da dies als Zeichen für eine zunehmende Verstopfung der Poren zu werten ist. Eine verminderte Qualität der Auftrennung der Partikel wäre die Folge gewesen.

Alle verwendeten Lösungen wurden vor Gebrauch durch 0,22 µm-Sterilfilter gefiltert, um die Haltbarkeit der Säule zu verlängern und um Kontaminationen vorzubeugen. Ihre Zusammensetzung ist unter 2.1.6 aufgeführt.

Die Säule wurde bei 4°C, in aufrechter Position gelagert. Vor ihrer Verwendung wurde sie auf Raumtemperatur (RT) gebracht. Mit Hilfe eines Laborstativs, an welchem durch eine Doppelmuffe eine Universalklemme befestigt war, wurde die Säule auf einer Höhe von ungefähr 25 cm aufrecht eingespannt. Zuerst wurde die obere Kappe und dann die untere Kappe der Säule entfernt. Die Säule wurde mit 15-20 mL 0,9 %-NaCl-Lösung gespült, wobei nach und nach jeweils 0,8 mL der 0,9 %-NaCl-Lösung auf die Säule gegeben wurden. Das Volumen oberhalb des Kunststofffilters betrug während der gesamten Prozedur nicht mehr als 1 mL, um Schwankungen des Wassersäulendrucks zu vermeiden. Gleichzeitig war der Kunststofffilter möglichst permanent mit Flüssigkeit bedeckt. Dadurch wurde vermieden, dass Luft in die Säule gezogen wurde, was die Funktionalität der Säule eingeschränkt hätte. Die durchgelaufene Spülflüssigkeit wurde verworfen. Nachdem der Spülvorgang abgeschlossen war, wurde die entsprechende Probe auf die Säule gegeben. Hierzu ließ man die zuletzt hinzugegebene 0,9 %-NaCl-Lösung durchlaufen, bis die Säule aufhörte zu tropfen und keine Flüssigkeit mehr über dem Kunststofffilter stand. Dann wurde sofort die Probe auf die Säule gegeben und

durchgelaufene Flüssigkeit ab dem ersten Tropfen in Fraktionen gesammelt. Es wurden insgesamt 20 Fraktionen gesammelt, die jeweils ein Volumen von 0,5 mL enthielten. Sobald die Probe vollständig durch den Kunststofffilter in die Säule eingetreten war und die Säule aufhörte zu tropfen, wurde weiter 0,9 %-NaCl-Lösung auf die Säule pipettiert. Sobald alle Fraktionen gesammelt waren, wurde die Säule mit 15-20 mL NaCl-Lösung gespült. Um die Prozedur abzuschließen, wurden nacheinander 0,5 mL NaOH-Lösung, 30 mL 0,9 %-NaCl-Lösung und 20 mL 20 %-Ethanol auf die Säule gegeben. Die Säule wurde in 20 %-Ethanol und aufrechter Position gelagert.

2.2.2.3 UF (B)

Eine UF(B) bezeichnet eine UF, die nach einer SEC durchgeführt wurde und primär der weiteren Konzentrierung von EVs diente. Vor einer UF(B) wurden die EV-enthaltenden Fraktionen 7-12 (Fluoreszenzmarkierung von EVs) bzw. 8-12 (Stimulation von BEAS-2B Zellen durch EVs und LPS) zusammengefügt und dann ultrafiltriert. Es wurden Amicon Ultrafilter mit einem Fassungsvermögen von 4 mL verwendet. Die Abfolge der Arbeitsschritte entsprach der einer UF(A). Für sämtliche Proben wurde ein Endvolumen von ungefähr 50 µL nach UF(B) angestrebt. Bei einem Startvolumen von 2,5 mL betrug die Dauer der Zentrifugation ungefähr 20 min. Jedoch variierte die Dauer in Abhängigkeit der Dichte einer Probe.

2.2.3 Fluoreszenzmarkierung von EVs

Voraussetzung für die Fluoreszenzmarkierung einer EV-Probe war eine zuvor erfolgte Konzentrationsbestimmung der Partikel durch NanoFCM. Es wurden EVs verwendet, die von gesunden PBEZ gewonnen wurden. Es wurden sowohl EVs des apikalen als auch EVs des basalen Kompartiments gefärbt.

2.2.3.1 Fluoreszenzmarkierung durch fluoreszenzgekoppelte mAbs

Die Markierung von EVs durch Bindung fluoreszenzgekoppelter mAbs erfolgte durch Inkubation einer EV-Probe bei 4°C über Nacht mit Phycoerythrin-anti-CD9- (PE-anti-CD9), PE-anti-CD63- (PE-anti-CD63) bzw. Fluoresceinisothiocyanat-anti-CD81- (FITC-anti-CD81) mAbs, die in PBS gelöst waren. Danach wurde die Partikelkonzentration, der Anteil an fluoreszierenden Partikeln sowie ihr Durchmesser mittels NanoFCM bestimmt. Die Analyse der EVs erfolgte in der AG Pogge von Strandmann durch Dr. Christian Preusser.

2.2.3.2 Fluoreszenzmarkierung durch DiO

Zuerst wurde eine bei -80°C gelagerte EV-Probe auf Eis aufgetaut. In der Zwischenzeit wurde eine 3 mM DiO-Lösung in DMSO auf RT gebracht und gründlich gevortext. Im darauffolgenden Schritt wurde eine 15 µM DiO-Lösung von 100 µL in 0,22 µm-gefiltertem

PBS hergestellt, gevortext und bis zur Verwendung dunkel, auf Eis gelagert. Sobald die EV-Lösung aufgetaut war, wurde sie durch Pipettieren gründlich gemischt. Ein EV-Volumen, das 3×10^8 EVs enthielt (bei bekannter Konzentration), wurde in 0,22 μm -gefilterter 0,9 %-NaCl-Lösung so verdünnt, dass das Endvolumen 100 μL betrug. Dabei war es wichtig, dass zuerst die 0,9 %-NaCl-Lösung in das Reaktionsgefäß gegeben wurde und dann die EV-Probe, um das Anhaften von EVs an Wänden des Reaktionsgefäßes zu minimieren. Danach wurde die verdünnte EV-Lösung (100 μL) zu 100 μL kurz zuvor gevortexter 15 μM DiO-Lösung hinzugegeben. Es wurde darauf geachtet, dass die EV-DiO-Lösung im Folgenden nur noch sanft gevortext wurde, um die Integrität der EV-Membran nicht zu beeinträchtigen. Zuletzt erfolgte eine Inkubation der EV-DiO-Lösung bei 37°C, dunkel, für 15 min. Nach der Hälfte der Inkubationszeit wurde die Lösung erneut sanft gevortext. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde eine SEC durchgeführt, um ungebundenen Fluoreszenzfarbstoff abzutrennen (vgl. 2.2.2.2). Die EV enthaltenden Fraktionen 7-12 wurden zusammengefügt, ultrafiltriert und die Partikelkonzentration sowie der Anteil an fluoreszierenden Partikeln durch NanoFCM bestimmt. DiO-markierte EVs wurden bei -20°C gelagert.

Analog zur EV-Lösung wurde auch eine 0,22 μm -gefilterter 0,9 %-NaCl-Lösung (100 μL) ohne EVs als Kontrolllösung vorbereitet, die in allen Schritten parallel zur EV-Lösung bearbeitet wurde.

2.2.3.3 Fluoreszenzmarkierung durch CFSE

Eine bei -80°C gelagerte EV-Probe wurde auf Eis aufgetaut. Währenddessen wurde eine 5 mM Lösung von CFSE in DMSO auf RT gebracht. Daraus wurde eine 40 μM CFSE-Lösung von 100 μL in 0,22 μm -gefiltertem PBS hergestellt, gevortext und bis zur Verwendung dunkel, auf Eis gelagert. Vor ihrer Verwendung wurde die CFSE-Lösung erneut gevortext. Nachdem die EV-Lösung aufgetaut war, wurde sie vor ihrer Verwendung durch Pipettieren gründlich gemischt. Darauf folgend wurde eine EV-Lösung mit 3×10^8 EVs und einem Endvolumen von 15 μL hergestellt, indem 0,22 μm -gefilterter 0,9 %-NaCl-Lösung hinzugegeben wurde. Dabei wurde wie auch bei der Fluoreszenzmarkierung durch DiO zuerst die 0,9 %-NaCl-Lösung in ein Reaktionsgefäß gegeben und danach die EV-Probe (vgl. 2.2.3.2). Die verdünnte EV-Lösung wurde im folgenden Schritt zu 15 μL der 40 μM CFSE-Lösung hinzugegeben. Die 20 μM EV-CFSE-Lösung wurde sanft gevortext und bei RT, dunkel, für 1 h inkubiert. Nach 20 bzw. 40 min wurde die Probe erneut sanft gevortext. Nach Ablauf der Inkubationszeit erfolgte das weitere Vorgehen analog zur Beschreibung im vorhergehenden Kapitel zur Fluoreszenzmarkierung durch DiO (vgl. 2.2.3.2). Auch hier wurde parallel zur EV-Lösung eine 0,22 μm -gefilterte 0,9 %-NaCl-Lösung (15 μL) ohne EVs als Kontrolllösung bearbeitet.

2.2.3.4 Trennung von ungebundenen CFSE-Molekülen und EV-gebundenen CFSE-Molekülen

Es wurden 3×10^9 apikale EVs gesunder PBEZ auf 150 μL in 0,22 μm gefilterter 0,9 %-NaCl-Lösung verdünnt und mit 150 μL 40 μM CFSE-Lösung zusammengefügt, um EVs durch CFSE zu markieren. Die Abfolge der Arbeitsschritte entspricht den Beschreibungen aus 2.2.3.3. Nach Vorbereitung der EV-Probe folgte eine SEC (vgl. 2.2.2.2). Allerdings wurden für die hier aufgeführte Untersuchung insgesamt 25 Fraktionen gesammelt.

Nach Abschluss der SEC wurden 100 μL jeder Fraktion (0,5 mL) in Duplikaten auf eine weiße 96-Mikrotiterplatte mit transparentem Boden übertragen. Als Leerwert diente eine Mischung aus 0,9 %-NaCl-Lösung (50 %) und PBS (50 %). Die Fluoreszenzintensität wurde durch einen Tecan Reader infinite 200 PRO mit einer Exzitationswellenlänge von 488 nm, einer Emissionswellenlänge von 518 nm und bei einer Signalverstärkung von 124 ermittelt. Die Auswertung und Darstellung der Ergebnisse erfolgte mittels Tecan i-control, Microsoft Excel und GraphPad Prism.

2.2.4 NanoFCM

2.2.4.1 Wesentliche Unterschiede der NanoFCM zur FCM

Die Detektion von EVs mittels NanoFCM entspricht weitestgehend dem Prinzip der Flowzytometrie (FCM) zur Multiparameter-Analyse einzelner Zellen. Aufgrund des kleineren Durchmessers von EVs werden jedoch einige Anpassungen nötig, die erst durch technologische Fortschritte der vergangenen Jahre möglich wurden. Welsh et al. formulierten vier wesentliche Unterschiede zur herkömmlichen FCM. Erstens werden stärkere Laser mit höherer Energie benötigt, die einen kleineren Fokuspunkt ermöglichen. So kann ein einzelnes EV beleuchtet werden, dessen Durchmesser im Nanometerbereich liegt, während Zelldurchmesser meist im Mikrometerbereich liegen. Zweitens muss ein EV-Strom mit einem kleineren Durchmesser im Zentrum der Durchflusskammer erzeugt werden, damit verhindert wird, dass zwei EVs gleichzeitig durch den Fokuspunkt des Lasers laufen. Eine Schwierigkeit ergibt sich hier aus einem niedrigen Streuungssignal durch kleine EVs und einem verhältnismäßig stärkeren Rauschen aufgrund der erhöhten Breite des Mantelstroms. Drittens werden sensitivere Detektoren zur Erfassung von Fluoreszenz- bzw. Seitwärtsstreuung benötigt. Statt Photovervielfachungsröhrchen (PMT) kommen hier zum Beispiel Lawinen-Photodioden (engl. *Avalanche photodiodes*) zum Einsatz, die in der Lage sind ein einzelnes Photon zu absorbieren, das Signal zu digitalisieren und als Pixel anzuzeigen (Aull 2016). Viertens werden auch zur Erfassung der Vorwärtsstreuung sensitivere Detektoren

benötigt sowie ein größerer Balken zum Abfangen nicht gestreuter Photonen des hochenergetischen Lasers (Welsh et al. 2017).

2.2.4.2 Durchführung der NanoFCM

Für die Messung von EV-Proben wurde ein NanoFCM verwendet. Dieses verfügte über einen 488 nm Laser und drei Lawinen-Photodioden zur Registrierung einzelner Photonen. Zur Kalibrierung und als Referenz für die Partikelkonzentration dienten 200 nm Polystyrol-Kügelchen mit einer Konzentration von 2.08×10^8 Partikeln $\times \text{mL}^{-1}$. Als Referenzstandard zur Determinierung der Größe von EVs wurden monodisperse Siliziumdioxid-Kügelchen in vier verschiedenen Größen (68 nm, 91 nm, 113 nm, 155 nm) verwendet. Jede Probe wurde für 1 min bei einem Druck von 0,4 kPa gemessen. Der optimale Bereich der Messung lag bei 2500-12000 Events. Die EV-Proben wurden in 0,22 μm -gefilterter, 0,9 %-NaCl-Lösung suspendiert. Die Partikelkonzentration und Größenverteilung wurden durch NanoFCM Software berechnet. Die Darstellung der Ergebnisse erfolgte in Histogrammen mit logarithmischer Skalierung. Die Konzentrationsangabe einer gemessenen Probe erfolgt in Partikel $\times \text{mL}^{-1}$. Das Gerät wurde von der AG Pogge von Strandmann zur Verfügung gestellt und die Analysen durch Dr. Christian Preusser durchgeführt.

Da die Sensitivität des NanoFCM sehr hoch sein muss, um einzelne EVs zu registrieren, ist es unvermeidlich, dass auch andere Partikel registriert werden, die nicht EVs entsprechen. Die Angabe der Konzentration einer EV-Probe nach Messung durch NanoFCM erfolgt daher immer normalisiert gegen Werte einer 0,22 μm -gefilterten PBS-Lösung.

2.2.5 Konfokalmikroskopie zur Detektion der Aufnahme von EVs in BEAS-2B Zellen

Es sollte nachverfolgt werden, ob apikale EVs gesunder PBEZ durch BEAS-2B Zellen aufgenommen werden.

Dazu wurde ein Laser Scanning Microscope (LSM) der Firma Zeiss verwendet, das im Folgenden vereinfachend als Konfokalmikroskop bezeichnet wird. Es ist geeignet, um hochauflösende Bilder in XYZ-Richtung zu erstellen. Dazu wird jeder Punkt einer Ebene gescannt und ggf. wird dies in beliebig vielen weiteren Ebenen wiederholt. Die erhaltenen Daten jedes Punktes werden durch Zen 2010 Software zu einem Bild zusammengefügt. Es wurde ein Plan-Apochromat 63x 1.4 Oil Objektiv verwendet. Zur Illumination wurden nacheinander Laser Diode 405 nm, Laser DPSS 488 nm und Laser DPSS 555 nm verwendet. Als Reflektoren kamen für DAPI EX 350/50, für FITC (bzw.

CFSE) EX 480/30 und für Phalloidin EX 545/10 zum Einsatz. Das Gerät wurde von der AG Hantschel und Yun Jiang zur Verfügung gestellt.

BEAS-2B Zellen, die zuvor in einer Kulturflasche kultiviert wurden und sich in Passage 14 befanden, wurden in Suspension gebracht und gezählt. Es wurden 125 000 Zellen/cm² in jeder Kammer einer Ibidi-8-Well-Platte in 300 µL BEGM ohne HC ausgesät und 24 h bei 37°C, 5 % CO₂ inkubiert.

Am nächsten Tag erfolgte eine Inkubation der Zellen mit fluoreszenzmarkierten EVs. Hierzu wurden EVs, deren Konzentration (4 x 10⁹ EV x mL⁻¹) und Anteil an fluoreszierenden EVs (85,8 %) durch NanoFCM bekannt war, auf Eis aufgetaut. Dann wurden diese in 0,22 µm-gefilterter 0,9 %-NaCl-Lösung auf eine Konzentration von 4 x 10⁸ EV x mL⁻¹ verdünnt. Hierzu wurde zuerst das Probenvolumen (V_A) gemessen und das benötigte Verdünnungsvolumen (V_{Verdünnung}) berechnet.

$$(1) V_{\text{Verdünnung}} = \left(\frac{C_{\text{ist}}}{C_{\text{soll}}} - 1 \right) \times V_A$$

V_{Verdünnung} wurde mit der EV-Lösung zusammengefügt und durch sanftes Vortexen vermischt. Ein Stimulationsmedium (1 mL 2 x 10⁸ EV x mL⁻¹) wurde vorbereitet, indem die verdünnte EV-Lösung (500 µL, 4 x 10⁸ EV x mL⁻¹) mit BEGM ohne HC (500 µL) vermischt wurde. Zellkulturüberstand wurde von den Kammern 3, 5, 7 und 8 abgenommen (grüne Felder in Tabelle 9) und jeweils 234 µL des EV-enthaltenden Stimulationsmedium hinzugegeben.

Tabelle 9: Schematischer Plan der Fluoreszenzmarkierung von BEAS-2B Zellen und ihrer Inkubation mit CFSE-markierten EVs. Kammern 1-8 einer Ibidi-8-Well-Platte. Zellen: BEAS-2B Zellen 125 000 Zellen/cm² in BEGM ohne HC. EV/CFSE (grün): Apikale EVs gesunder PBEZ durch CFSE markiert (85,8 % FITC-positiv), 6 h Inkubation mit BEAS-2B Zellen bei einer Konzentration von 2 x 10⁸ EV x mL⁻¹. Nach Waschen und Fixierung Färbung durch DAPI (0,1 % in PBS, blau) bzw. Phalloidin (0,1 % in PBS, rot)

Kammer 1: Zellen + DAPI + Phalloidin	Kammer 2: Zellen + DAPI	Kammer 3: Zellen + DAPI + EV/CFSE	Kammer 4: Zellen
Kammer 5: Zellen + EV/CFSE	Kammer 6: Zellen + Phalloidin	Kammer 7: Zellen + Phalloidin + EV/CFSE	Kammer 8: Zellen + DAPI + Phalloidin + EV/CFSE

Nach Hinzugabe des EV-enthaltenden Stimulationsmediums wurde die Ibidi-8-Well-Platte für weitere 6 h bei 37°C, 5 % CO₂ im Inkubator platziert. Für alle folgenden Schritte

wurde die Platte durch Alufolie verdunkelt, um Photobleichung zu minimieren. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde der Überstand entfernt und alle Kammern 3 x 3 min mit 200 µL PBS gewaschen, um ungebundene EVs zu entfernen. Dann wurden die Zellen fixiert, indem 200 µL 4 %-PFA in alle Kammern gegeben und 20 min bei RT inkubiert wurde. Nachdem die Fixierung der Zellen abgeschlossen war, wurden alle Kammern zweimal mit 200 µL PBS gewaschen und 200 µL DAPI-Lösung in die Kammern 1, 2, 3 und 8 gegeben (blaue Felder in Tabelle 9). Während der Inkubationszeit von 5 min, wurde die Ibidi-8-Well-Platte bei langsamer Geschwindigkeit auf einen Plattenschüttler platziert. Sobald die Färbung durch DAPI abgeschlossen war, wurden die entsprechenden Kammern zweimal mit 200 µL PBS gewaschen. Im Folgenden wurden 200 µL Phalloidin-Lösung auf die Kammern 1, 6, 7 und 8 gegeben (rote Felder in Tabelle 9) und für 55 min bei RT und langsamer Geschwindigkeit auf einem Plattenschüttler inkubiert. Die gefärbten Kammern wurden zweimal mit 200 µL PBS gewaschen. Für die Konfokalmikroskopie wurden 200 µL PBS in allen Kammern belassen.

In Kammer 8 konnte die Aufnahme von EVs in BEAS-2B Zellen überprüft werden. Die anderen Kammern dienten als Kontrollen. Bei der Mikroskopie wurde im Sinne von Negativkontrollen besonders darauf geachtet, ob in Kammern ohne EV/CFSE-Inkubation ein vergleichbares grünes Signal (FITC) beobachtet wurde, wie in Kammern mit EV/CFSE-Inkubation.

2.2.6 Stimulation von BEAS-2B Zellen durch EVs und LPS

2.2.6.1 Versuchsaufbau

Für den Stimulationsversuch von BEAS-2B Zellen lagen insgesamt sechs apikale Überstände von PBEZ aus ALI-Kulturen vor, die von jeweils drei gesunden bzw. drei asthmatischen Spenderzellpopulationen stammten. Aus diesen Proben wurden jeweils EVs isoliert, sodass EV-Proben als biologische Triplikate für die Konditionen gesund (G1-G3) und asthmatisch (A1-A3) vorlagen. Für jede biologische Probe wurden wiederum Triplikate mit drei separaten BEAS-2B Kulturen angefertigt, die als „technische Triplikate“ bezeichnet werden. Parallel wurden technische Triplikate vorbereitet, die mit LPS stimuliert wurden. LPS ist als Membranbestandteil gramnegativer Bakterien ein starker Stressinduktor für humane Zellen. LPS fungierte als Positivkontrolle, um die grundsätzliche Funktionsfähigkeit des Experiment systems und die Eignung der gewählten Methoden zu prüfen. Zudem wurden auf derselben Platte jeweils technische Triplikate ohne Stimulation als Negativkontrolle (C) vorbereitet. Schließlich erfolgte eine Analyse in Doppelbestimmung bei den analytischen Methoden (RT-qPCR, ELISA und

NO-Quantifizierung nach Griess). Eine schematische Übersicht der verschiedenen Ansätze ist in Abbildung 3 dargestellt.

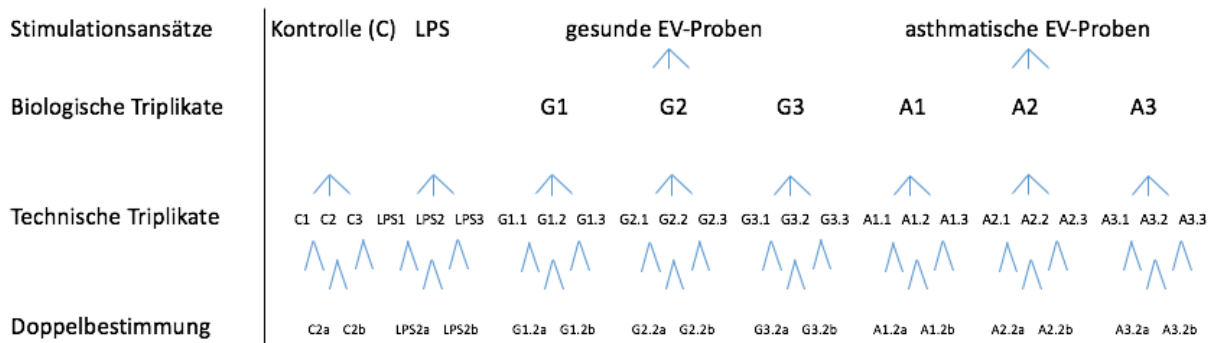


Abbildung 3: Schematische Übersicht der verschiedenen Ansätze für die Stimulation von BEAS-2B Zellen. Unstimulierte Kontrolle angefertigt in technischen Triplikaten (C1, C2, C3) und Doppelbestimmung bei analytischen Methoden (exemplarisch C2a, C2b). LPS-Stimulation angefertigt in technischen Triplikaten (LPS1, LPS2, LPS3) und Doppelbestimmung bei analytischen Methoden (exemplarisch LPS2a, LPS2b). Gesunde EV-Proben von drei gesunden Spendern als biologische Triplikate (G1-G3), technische Triplikate (exemplarisch G2.1, G2.2, G2.3) für die Stimulation und Doppelbestimmung bei analytischen Methoden (exemplarisch G2.2a, G2.2b). Asthmatische EV-Proben von drei asthmatischen Spendern als biologische Triplikate (A1-A3), technische Triplikate (exemplarisch A2.1, A2.2, A2.3) für die Stimulation und Doppelbestimmung bei analytischen Methoden (exemplarisch A2.2a, A2.2b).

2.2.6.2 Durchführung

BEAS-2B Zellen aus Passage 13 wurden in Kultur genommen und einmal in BEGM mit HC passagiert. Sobald sie 80 % Konfluenz erreicht hatten, wurde die BEAS-2B Kultur in Suspension gebracht und in 2,5 mL BEGM ohne HC resuspendiert. Dann wurden die Zellen mit 125 000 Zellen/cm² in 250 µL BEGM ohne HC auf einer 48-Well-Platte ausgesät. Insgesamt wurden 32 Kammern einer 48-Well-Platte mit einer Fläche von 0,64 cm²/Kammer verwendet. Vor dem Aussäen der Zellen wurde darauf geachtet, dass die Zellsuspension gut durchmischt war und eine gleichmäßige Verteilung der Zellen in Suspension vorlag. Nach dem Aussäen wurden die Zellen 24 h bei 37°C, 5 % CO₂ inkubiert.

Am Folgetag wurde die Stimulation von BEAS-2B Zellen durch LPS und EVs durchgeführt. Hierzu wurden die zu verwendenden EV-Proben, die bereits entsprechend den Beschreibungen aus 2.2.2 aufbereitet waren, auf Eis aufgetaut. Die durch NanoFCM bestimmten Konzentrationen der verschiedenen EV-Proben sind in Tabelle 10 aufgeführt. Vereinfachend wird im Folgenden davon ausgegangen, dass jeder Partikel einem EV entspricht und somit eine Konzentration von EV x mL⁻¹ gilt.

Table 10: Zusammenstellung der verwendeten EV-Proben für die Stimulation von BEAS-2B Zellen mit zugehöriger Konzentration [EV x mL⁻¹] durch NanoFCM ermittelt. G1-G3: EV-Proben, gewonnen aus Zellkulturüberstand gesunder PBEZ; A1-A3: EV-Proben gewonnen aus Zellkulturüberstand asthmatischer PBEZ.

EV-Probe	Konzentration [EV/mL]
G1	$2,56 \times 10^{10}$
G2	$1,46 \times 10^9$
G3	$3,16 \times 10^9$
A1	$4,44 \times 10^8$
A2	$4,83 \times 10^8$
A3	$3,8 \times 10^{10}$

Jede EV-Probe wurde durch Hinzugabe 0,22 µm gefilterter, 0,9 %-NaCl-Lösung auf eine Konzentration von 4×10^8 EVs x mL⁻¹ verdünnt. 240 µL einer verdünnten EV-Lösung (4×10^8 EVs x mL⁻¹) wurden mit 240 µL BEGM ohne HC vermischt. Somit wurde für jede Probe ein EV-Stimulationsmedium mit 480 µL und einer Konzentration von 2×10^8 EVs x mL⁻¹ hergestellt.

Parallel wurde ein LPS-Stimulationsmedium vorbereitet. Hierzu wurde 1 µL LPS-Stammlösung mit 9 µL BEGM ohne HC vermischt. Aus dieser Lösung (10 µL; $0,1 \mu\text{g} \times \mu\text{L}^{-1}$) wurde 1 µL entnommen und in einem separaten Gefäß mit 499 µL BEGM ohne HC vermischt (500 µL; $0,2 \mu\text{g} \times \text{mL}^{-1}$). Zu dieser Lösung wurden 500 µL 0,22 µm-gefilterte, 0,9 %-NaCl-Lösung gegeben, sodass die Konzentration des LPS-Stimulationsmediums $0,1 \mu\text{g} \times \text{mL}^{-1}$ betrug.

Für die Kammern, die als Negativkontrolle dienen sollten, wurde ein Kontrollmedium vorbereitet. Hierzu wurden 500 µL, 0,22 µm-gefilterte 0,9 %-NaCl-Lösung mit 500 µL BEGM ohne HC zusammengefügt und durch Pipettieren vermischt.

Nachdem die verschiedenen Mediumansätze vorbereitet waren, wurde der Zellkulturüberstand sequentiell von den BEAS-2B Kulturen abgenommen und 150 µL des jeweils vorgesehenen Mediumansatzes in die Kammern gegeben. Es folgte eine Inkubation bei 37°C, 5 % CO₂ für 6 h. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde ein Volumen von 300 µL BEGM ohne HC in jede Kammer hinzugegeben. Es folgten weitere 18 h Inkubation. Danach wurde der Zellkulturüberstand abgenommen, bei 4°C, 10 min, 4000 x g zentrifugiert und bei -80°C gelagert. Die Zellen wurden lysiert und ihre Ribonukleinsäure (RNA) isoliert.

2.2.6.3 RT-qPCR

RT-qPCR ist eine sehr sensitive Methode, um die Expression ausgewählter Gene auf transkriptioneller Ebene zu erfassen. Dazu wird zunächst RNA aus Zellen isoliert. Dann wird daraus durch reverse Transkription komplementäre DNA (cDNA) hergestellt, die im Rahmen einer PCR vervielfacht wird. Anhand von Fluoreszenzsignal, das durch Bindung des Farbstoffs *SYBR-Green* an durch PCR neu gebildete Doppelstrang DNA generiert wird, erfolgt die Analyse der Expression eines Gens von Interesse. Die Quantifizierung erfolgt dabei relativ zur Fluoreszenzintensität eines Haushaltsgens, dessen Expression sich im Rahmen einer Stimulation nicht verändert.

Falls ein Kit verwendet wurde, wurden alle Arbeitsschritte stets entsprechend den Empfehlungen des Herstellers durchgeführt. Materialien, die nicht unter 2.1 aufgeführt sind, waren Bestandteile der verwendeten Kits. Kitkomponenten, deren Zusammensetzung im Rahmen der Kit-Vorbereitung verändert wurden, sind unter 2.1.6.4 aufgeführt.

RNA-Isolation

Die Isolation von RNA aus *in vitro* kultivierten BEAS-2B Zellen erfolgte mit Hilfe eines *RNeasy Mini Kits*. Dieses wurde kombiniert mit einem *RNase-Free DNase Kit*, um eventuell vorhandene kontaminierende DNA zu entfernen.

Für die RNA-Isolierung wurden pro Kammer 350 µL RLT-Puffer auf die stimulierten BEAS-2B Zellen gegeben, 3-5 min inkubiert und durch Pipettieren lysiert. Die lysierten Zellen in RLT-Puffer wurden in Reaktionsgefäße (1,5 mL) übertragen und bei -80°C eingefroren.

Für die Weiterverarbeitung wurde eine Probe auf Eis aufgetaut, 350 µL 70 %-Ethanol hinzugegeben und durch Pipettieren vermischt. Das Probenvolumen von nunmehr 700 µL wurde auf eine RNeasy Mini Säule gegeben, die in einem 2 mL Sammelgefäß platziert war und für 15 s bei 8000 x g zentrifugiert. Nach jedem auch im Folgenden aufgeführten Zentrifugationsschritt wurde durch die Säule gelaufene Flüssigkeit entsorgt und im Sammelgefäß verbliebene Flüssigkeit durch Klopfen gegen ein sauberes Papiertuch möglichst vollständig entfernt. Es folgte ein Waschschrift mit RW1-Puffer mit anschließender Zentrifugation für 15 s bei 8000 x g. Als nächstes wurde ein DNase-Verdau durchgeführt. Dafür wurden 10 µL DNase-Lösung mit 70 µL RDD-Puffer durch Pipettieren vermischt. Diese Lösung wurde auf die Mitte der Membran der RNeasy-Säule gegeben und für 15 min bei RT inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden 350 µL RW1-Puffer auf die Säule gegeben und für 15 s bei 8000 x g zentrifugiert. Dann wurden nacheinander zweimal 500 µL RPE-Puffer auf die Säule gegeben, für 15 s bei 8000 x g zentrifugiert. Danach wurde die RNeasy-Säule in ein neues 2 mL

Sammelgefäß übertragen und für 1 min bei 17 000 x g zentrifugiert, wobei der Deckel der RNeasy-Säule nicht geschlossen wurde, um die Membran trocknen zu lassen. Zuletzt wurde die RNeasy-Säule in ein 1,5 mL Reaktionsgefäß übertragen, 30-50 µL nukleasefreies Wasser auf die Säule gegeben und für 1 min bei 8000 x g zentrifugiert. So wurde die zu isolierende RNA aus der Membran der Säule herausgelöst.

RNA-Konzentrationsbestimmung

Die Bestimmung der RNA-Konzentration erfolgte durch ein Nanodrop Spektrophotometer. Die RNA-Konzentration wurde in $\text{ng} \times \mu\text{L}^{-1}$ angegeben. Um sicherzustellen, dass auch für niedrige RNA-Konzentrationen an der Sensitivitätsgrenze des Nanodrops zuverlässige Konzentrationsangaben gemessen werden, wurde jede Probe zweifach gemessen und der Mittelwert berechnet. Für eine Messung wurde 1 µL der zu messenden Probe auf die Messsonde gegeben. Zwischen zwei Messungen erfolgte eine Reinigung durch Ethanol. Der 260/280-Quotient, der als Maß für die Reinheit der isolierten RNA-Probe dient, wurde für jede Probe überprüft. Der Sollwert lag bei 2, wobei Schwankungen zwischen 1,8 und 2,2 als akzeptabler Bereich angesehen wurden. Alle gemessenen Proben lagen in diesem Bereich.

cDNA-Synthese

Vor der Durchführung einer RT-qPCR muss einzelsträngige RNA in doppelsträngige cDNA revers transkribiert werden. Hierfür wurde ein *qScript^R Flex cDNA Synthesis Kit* verwendet. Alle Schritte der cDNA-Synthese wurden auf Eis ausgeführt, um RNA-Degradation zu minimieren.

Zunächst wurden die RNA-Probe und alle benötigten Kit-Komponenten aufgetaut. Dann wurde ein Volumen aus der RNA-Probe entnommen, welches 100 ng RNA enthielt. Dieses wurde in einem 0,2 mL PCR-Gefäß mit nukleasefreiem Wasser vermischt, sodass das Volumen insgesamt 13 µL betrug. Dazu wurden 2 µL Oligo-dT-Primer hinzugegeben und durch Pipettieren vermischt. Es folgte eine Inkubation in einem Thermozykler für 5 min bei 65°C. Sobald die Inkubationszeit abgelaufen war, wurden 4 µL qScript-Flex-Reaktionsmix (5X) und 1 µL qScript-reverse-Transkriptase in das Reaktionsgefäß gegeben und durch Pipettieren vermischt. Das nun 20 µL enthaltende Reaktionsgefäß wurde in einen Thermozykler platziert und nacheinander für 60 min bei 42°C und für 5 min bei 85°C inkubiert. Synthetisierte cDNA wurde bei -20°C gelagert. Kurz vor ihrer weiteren Verwendung wurde die cDNA durch Hinzugabe von RNase-freiem Wasser in einem Verhältnis von 1:2,5 verdünnt.

RT-qPCR Durchführung

Alle benötigten Komponenten wurden auf Eis aufgetaut. Dazu gehörten nukleasefreies Wasser, die zu untersuchende cDNA-Probe, Primer-Mix und *SYBR-Green-PCR-Mix*.

Letzterer enthielt HotStar-Taq-plus-DNA-Polymerase, Rotor-Gene-SYBR-Green-PCR-Buffer und einen dNTP-Mix. Alle Schritte der RT-qPCR wurden auf Eis ausgeführt.

Die folgenden Mengenangaben beziehen sich auf einen einzelnen PCR-Ansatz und wurden entsprechend der gesamten Anzahl an zu untersuchenden Proben und Genen angepasst. Zuerst wurde ein Reaktionsmix vorbereitet. Dieser enthielt 12,5 µL des SYBR-Green-PCR-Mix, 6,5 µL RNase-freies Wasser, und 1 µL des gewünschten Primer-Mix. 20 µL des Reaktionsmix wurden in ein PCR-Röhrchen übertragen und 5 µL verdünnte cDNA hinzugegeben. Jeder cDNA-Ansatz wurde als Duplikat vorbereitet, um Pipettierfehler auszugleichen. Zudem wurde für jeden Reaktionsmix eine Probe angefertigt, zu der lediglich nukleasefreies Wasser hinzugegeben wurde, um eine Kontamination im Reaktionsmix erkennen zu können. Zuletzt wurden die PCR-Röhrchen in einen Rotor Gene Q platziert. Es erfolgte eine initiale Inkubationsphase bei 95°C für 7 min, um die hitzestabile DNA-Polymerase zu aktivieren und DNA-Doppelstränge zu denaturieren. Daran schlossen sich 40 Zyklen zur Vervielfachung der PCR-Produkte an, wobei sich jeder Zyklus aus einer Denaturierungsphase bei 95°C, einer Annealingphase bei 60°C und einer Extensionsphase bei 72°C für jeweils 30 s zusammensetzte.

RT-qPCR Auswertung

Der Threshold wurde für alle PCR-Kurven manuell in die exponentielle Steigungsphase platziert und die Ct-Werte durch *Rotor Gene Q Software* ermittelt. Schmelzkurven wurden analysiert, um die Spezifität der PCR-Produkte zu prüfen. Die quantitative Auswertung erfolgte durch die $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode nach Livak mit Hilfe von Microsoft Excel (Livak und Schmittgen 2001). Dazu wurden die Ct-Werte der PCR-Duplikate gemittelt und gegen das Haushaltsgen PGK1 normalisiert (ΔCt). Im nächsten Schritt wurden stimulierte Proben gegen eine unstimulierte Kontrolle normalisiert ($\Delta\Delta\text{Ct}$) und die relative Quantifizierung ($\text{RQ} = 2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$) ermittelt. Die Darstellung der Ergebnisse und Berechnung von Signifikanzniveaus erfolgte durch GraphPad Prism. Signifikanzniveaus wurden für LPS, gesunde EVs und asthmatische EVs gegenüber der Kontrolle sowie für asthmatische gegenüber gesunden EVs berechnet.

2.2.6.4 Quantitative Zytokin-Bestimmung mittels ELISA

Es wurde ein *human IL-8/CXCL8 DuoSet ELISA-Kit* verwendet. Das Kit beruht auf dem Prinzip eines Sandwich ELISAs. Dabei wird IL8 durch einen an eine ELISA-Platte adsorbierten Fänger-Antikörper gebunden. Ein Nachweis-Antikörper bindet wiederum an IL8. Durch Aktivierung eines an den Nachweis-Antikörper gekoppelten Fluoreszenzfarbstoffes, kann die Konzentration von IL8 anhand einer Standardreihe bestimmt werden. Die Durchführung des ELISAs und die Vorbereitung einer Standardreihe erfolgte entsprechend den Angaben des Herstellers. Materialien die nicht

unter 2.1 aufgeführt sind, waren Bestandteile des verwendeten Kits. Die Zusammensetzung verwendeter Puffer und Lösungen, die nicht unveränderte Bestandteile des Kits waren, ist unter 2.1.6.5 aufgeführt.

Zuerst wurden 100 µL einer Fänger-Antikörper-Lösung in alle 96 Kammern einer F96 Maxisorp nunc-immuno Platte gegeben. Die Platte wurde abgedeckt und im Dunklen über Nacht bei 4°C inkubiert. Am nächsten Tag wurden alle Kammern dreimal mit einem ELISA-Waschpuffer gewaschen. Danach wurden 300 µL eines proteinreichen Blockpuffers in die Kammern gegeben, um im Folgenden unspezifische Bindungen an Wänden und Böden zu verhindern. Nach 2 h Inkubationszeit auf einem Plattenschüttler bei RT wurden erneut alle Kammern mit ELISA-Waschpuffer gewaschen. Während der Inkubationszeit wurden alle zu messenden Proben in einem Verhältnis von 1:1 mit ELISA-RD verdünnt und durch Pipettieren gemischt. Nun wurden 100 µL aus jedem der zehn Verdünnungsschritte der Standardreihe und von den zu messenden Proben jeweils als Duplikat zu den vorgesehenen Kammern hinzugegeben. Die IL8-Antigene konnten in der folgenden Inkubationszeit von zwei Stunden, bei RT, auf einem Plattenschüttler an die spezifischen Epitope der Fänger-Antikörper binden. Nach einem weiteren Waschschrift wurden 100 µL der Lösung mit biotinylierten Nachweis-Antikörpern in jede Kammer gegeben. Diese konnten in der nächsten zweistündigen Inkubationszeit ebenfalls an die zuvor spezifisch gebundenen IL8-Antigene binden. Sobald die Inkubationszeit abgelaufen war, wurden ein weiteres Mal alle Kammern der Platte gewaschen und mit 100 µL Streptavidin-Horseradish-Peroxidase-Lösung (Streptavidin-HRP) befüllt. In den folgenden 20 min Inkubationszeit bei RT konnte Streptavidin-HRP an die biotinylierten Nachweis-Antikörper binden. Nach einem letzten Waschschrift, wurden 100 µL POD-Substratlösung BM Blue in alle Kammern gegeben. Die Spaltung des POD-Substrates durch HRP führte zu einem Farbumschlag in blau. Die Inkubation lief bei RT, im Dunklen so lange bis die Abstufungen der Standardreihe mit dem Auge deutlich zu erkennen waren (ca. 20 min). Die Reaktion wurde durch Hinzugabe von 50 µL einer Stopp-Lösung (2M H₂SO₄) gestoppt, was einen Farbumschlag von blau zu gelb auslöste. Die Absorptionsdichte wurde möglichst ohne eine größere Zeitverzögerung durch einen Tecan Reader infinite 200 PRO bei 450 nm gemessen. Während einer Zeitverzögerung von mehr als 20 min könnte es zur Bildung von teilweise makroskopisch sichtbaren Präzipitaten kommen, die falsch niedrige Ergebnisse der Absorptionsdichte zur Folge hätten.

Die Absorptionsdichte wurde durch einen Tecan Reader infinite 200 PRO ermittelt und mit Hilfe der Software Tecan i-control und Microsoft Excel ausgewertet. Alle Werte wurden gegen Blankwerte normalisiert. Duplikate wurden gemittelt und auf zwei Nachkommastellen gerundet. Für alle Duplikate galt eine Standardabweichung < 0,07.

Die Mittelwerte der Duplikate wurden manuell zwischen den jeweils nächstgelegenen, ebenfalls gerundeten Werten der Standardreihe linear interpoliert, um die IL8-Konzentration der Proben zu ermitteln. Dann wurde die Verdünnung der Proben in die Kalkulation einbezogen. Die Darstellung erfolgt mittels GraphPad Prism.

2.2.6.5 Indirekte NO-Quantifizierung durch NO-Assay-Kit

NO hat im menschlichen Körper nur eine sehr geringe Halbwertszeit von Sekunden bis wenigen Minuten und wird daher meist indirekt über die Messung von Nitrit (NO^{2-}) und Nitrat (NO^{3-}) nach Griess quantifiziert (Giustarini et al. 2008) Es wurde ein *NO-Assay-Kit* verwendet, wobei die Bestimmung von Nitrit und Nitrat separat erfolgte. Alle Arbeitsschritte wurden weitgehend entsprechend den Empfehlungen des Herstellers durchgeführt. Jedoch konnte aufgrund von mangelndem Probenmaterial entgegen den Herstellerangaben keine Filterung durch einen 10.000 MWCO Filter erfolgen. Materialien die nicht unter 2.1 aufgeführt sind, waren Bestandteile des verwendeten Kits.

Nitrit-Bestimmung

1X RD wurde aus den Kit Komponenten hergestellt. Eine Verdünnungsreihe des Nitrit-Standards wurde angefertigt. Alle Proben und Standardverdünnungsschritte wurden als Duplikate auf eine durchsichtige 96-Mikrotiterplatte gegeben. Es wurden jeweils 200 μL 1X RD in die für die Blanks vorgesehenen Kammern gegeben. Dann wurden jeweils 50 μL der einzelnen Standardverdünnungsschritte, des 1X RD als „Zero standard“ und der zu bestimmenden Proben in die entsprechenden Kammern gegeben. Als nächstes wurden aufeinanderfolgend 50 μL 1X RD, 50 μL Griess-Reagent 1 und 50 μL Griess-Reagent 2 in alle Kammern außer den Blanks pipettiert. Die Inhalte der Platte wurden durch leichtes Antippen mit einem Finger vermischt und für 10 min bei RT inkubiert. Abschließend wurden die einzelnen Kammern durch einen Tecan Reader infinite 200 PRO bei 540 nm absorptionsspektroskopisch analysiert.

Nitrat-Bestimmung

1X RD wurde aus den Kit Komponenten hergestellt. Eine Verdünnungsreihe des Nitrat-Standards wurde angefertigt. Die Abfolge an Arbeitsschritten folgte größtenteils der, des vorangegangenen Nitrit-Assays. Sie unterschied sich lediglich darin, dass statt 50 μL 1X RD zuerst 25 μL verdünnte NADH-Lösung und dann 25 μL verdünnte Nitrat-Reduktase in alle Kammern außer zu den Blanks hinzugegeben und die Platte dann für 30 min bei 37°C inkubiert wurde. Danach wurden auch hier 50 μL Griess-Reagent 1 und 50 μL Griess-Reagent 2 hinzugegeben. Die Absorptionsdichte wurde durch einen Tecan Reader infinite 200 PRO bei 540 nm ermittelt.

Für die Auswertung der Ergebnisse wurden Tecan i-control und Microsoft Excel verwendet. Sämtliche Werte wurden gegen Blankwerte normalisiert und Duplikate

gemittelt. Da sämtliche Werte der optischen Dichte kleiner waren als der niedrigste Wert der Standardreihe, konnte keine Interpolierung und damit keine Bestimmung der Konzentration erfolgen. Die Darstellung erfolgte mittels GraphPad Prism unter Angabe der Mittelwerte und Standardabweichungen der technischen Triplikate.

2.2.7 Statistik

Zur Berechnung von Signifikanzniveaus wurde für alle Analysen eine Normalverteilung der Daten angenommen. Mit Hilfe von GraphPad Prism wurde ein Zweistichproben-t-Test für unabhängige Stichproben angewendet. P-Werte ≤ 0.05 wurden als statistisch signifikant gewertet und die Signifikanzniveaus (*: p 0,01-0,05; **: p 0,001-0,01; ***: p 0,0001-0,001; ****: p <0,0001) entsprechend in den Graphen eingetragen. Die Box-Plots der RT-qPCR-Ergebnisse geben den Bereich von der 25. bis zur 75. Perzentile der Werte an. Die eingezeichnete Linie beschreibt den Median der Datengruppe. Zusätzlich ist die Spannweite der gesamten Datengruppe angegeben.

3 Ergebnisse

3.1 Effektive EV-Konzentrierung durch UF(A) und SEC

Zunächst sollte untersucht werden, ob UF(A) und SEC geeignete Methoden sind, um EVs effektiv aus Zellkulturüberständen zu konzentrieren (vgl. 2.2.2). In Abbildung 4 wird die Verteilung von EVs über die gesammelten Fraktionen nach einer UF(A) und SEC dargestellt. Die EVs stammten aus dem apikalen Kompartiment von gesunden PBEZ. Zur Bestimmung der Partikelkonzentration wurden alle gesammelten Fraktionen durch NanoFCM analysiert. Es zeigte sich, dass EVs in den Fraktionen 8-15, hauptsächlich jedoch in den Fraktionen 9-11 gesammelt wurden. Somit konnte durch UF(A) und SEC eine effektive Konzentrierung von apikalen EVs in spezifischen Fraktionen erreicht werden.

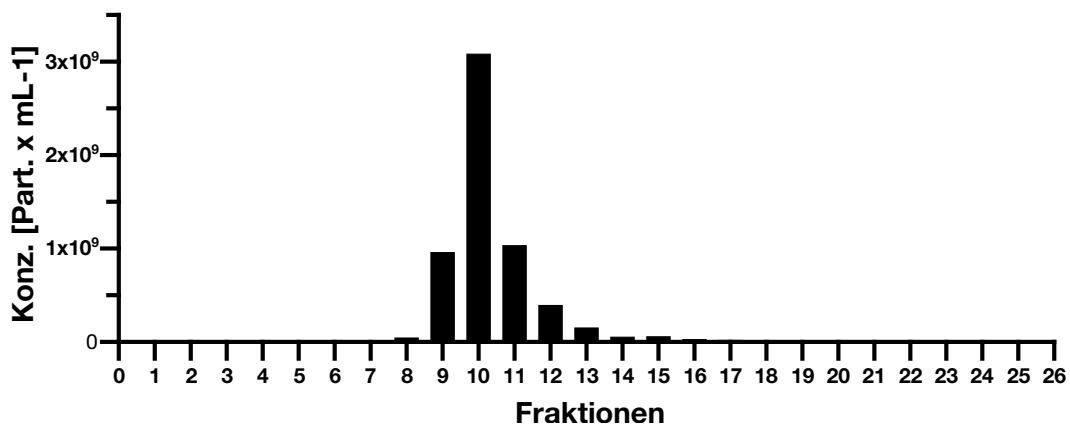


Abbildung 4: Verteilung der Partikelkonzentrationen über die gesammelten Fraktionen nach Aufreinigung apikaler EVs von PBEZ über UF(A) und SEC, gemessen mittels NanoFCM.

3.2 Vergleich verschiedener Fluoreszenzfarbstoffe zur EV-Markierung

Insgesamt wurden drei Methoden der Fluoreszenzmarkierung von EVs durchgeführt. Ziel war es herauszuarbeiten, welche Methode die effizienteste Markierung von EVs gesunder PBEZ ermöglicht, um später die Aufnahme von EVs durch BEAS-2B Zellen mittels Konfokalmikroskopie nachweisen zu können. Zudem wurde untersucht, ob sich das Färbeverhalten von EVs apikalen Ursprungs von dem basaler EVs unterscheidet

3.2.1 Fluoreszenzmarkierung von EVs gesunder PBEZ des apikalen Kompartiments

Für diese Analysen wurden EVs gesunder PBEZ des apikalen Kompartiments verwendet, die somit gemeint sind, wann immer in diesem Unterkapitel die Bezeichnung „EVs“ oder „EV-Probe“ verwendet wird.

Fluoreszenzgekoppelte mAbs

Nach Inkubation einer EV-Probe über Nacht mit fluoreszenzgekoppelten mAbs gegen eines der Tetraspanine (CD9, CD63, CD81), wurde die Fluoreszenzintensität der EVs durch NanoFCM analysiert. In Abbildung 5 wird der Anteil an EVs gezeigt, die sich durch Bindung von fluoreszenzgekoppelten mAbs markieren ließen. Es zeigte sich, dass sich nur ein geringer Anteil an EVs durch diese Methode markieren ließ. Die Inkubation mit PE-anti-CD9-mAbs ergab mit 4,2 % EVs den größten Anteil an PE-positiven Events. Für die Anfärbung mit PE-anti-CD63- bzw. FITC-anti-CD81-mAbs ergaben sich geringere Anteile an fluoreszierenden Events von 2,9 % bzw. 2,8 %. Somit wurde gezeigt, dass sich EVs von PBEZ des apikalen Kompartiments nicht effektiv durch fluoreszenzgekoppelte mAbs gegen Tetraspanine markieren ließen.

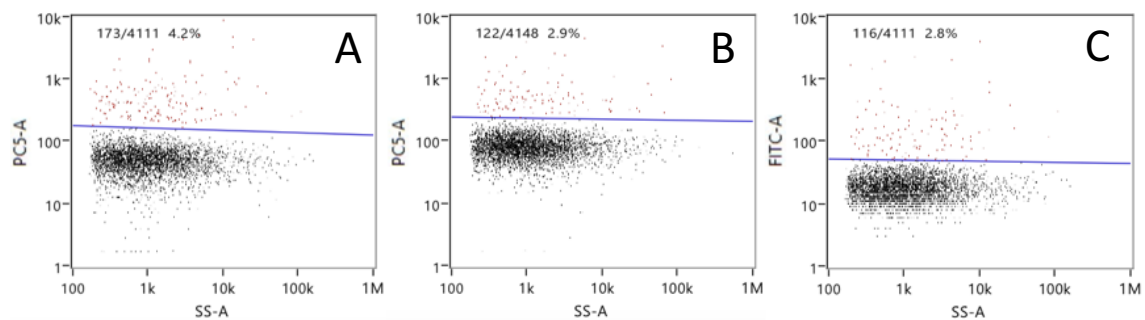


Abbildung 5: Histogramme apikaler EVs von PBEZ nach Inkubation mit fluoreszenzgekoppelten mAbs, gemessen durch NanoFCM.

A: Fluoreszenzintensität nach Inkubation mit PE-anti-CD9-mAbs, Konzentration $9,7 \times 10^5$ Partikel $\times \text{mL}^{-1}$, 4,2 % der registrierten Events PE-positiv. B: Fluoreszenzintensität nach Inkubation mit PE-anti-CD63-mAbs, Konzentration $1,45 \times 10^5$ Partikel $\times \text{mL}^{-1}$, 2,9 % der registrierten Events PE-positiv. C: Fluoreszenzintensität nach Inkubation mit FITC-anti-CD81-mAbs, Konzentration $4,85 \times 10^4$ Partikel $\times \text{mL}^{-1}$, 2,8 % der registrierten Events FITC-positiv.

Es soll an dieser Stelle erwähnt sein, dass alle im Folgenden aufgeführten EV-Proben (apikal in Kap.3.2.1 und basal in Kap. 3.2.2) nach ihrer Inkubation mit DiO bzw. CFSE zusätzlich mit PE-gekoppelten mAbs gegen CD63 inkubiert wurden. Diese Tatsache wurde allerdings für die Auswertung der Ergebnisse vernachlässigt. Dies wird zum einen durch den Nachweis gerechtfertigt, dass sich generell nur ein kleiner Anteil an EVs durch fluoreszenzgekoppelte mAbs markieren ließ (vgl. Abbildung 5). Zum anderen wird in Abbildung 6 dargestellt, dass auf Grund einer Inkubation allein mit PE-anti-CD63-mAbs kaum ein Signal im FITC-Kanal detektiert wurde. Es stellten sich lediglich 0,1 % der registrierten Events FITC-positiv dar.

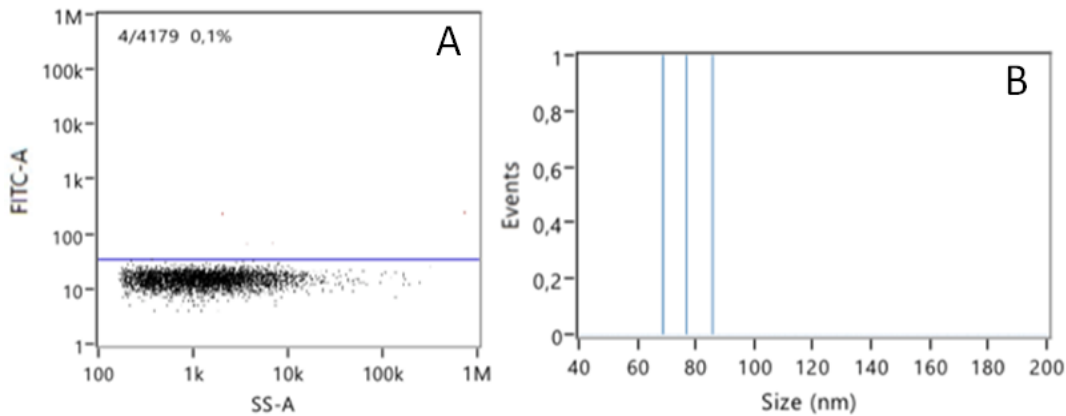


Abbildung 6: Histogramme apikaler EVs von PBEZ nach Inkubation mit PE-anti-CD63-mAbs, gemessen durch NanoFCM. Konzentration $-1,87 \times 10^6$ Partikel $\times \text{mL}^{-1}$. A: Fluoreszenzintensität der Events, 0,1 % der registrierten Events sind positiv im FITC-Kanal (rote Punkte). B: Größenverteilung der FITC-positiven Events im für EVs typischen Bereich.

Somit konnte gezeigt werden, dass eine Inkubation mit PE-anti-CD63-mAbs nicht zu einer wesentlichen Einstrahlung von PE-Signal in den FITC-Kanal führt. Auf dieser Grundlage wird im Folgenden angenommen, dass FITC-positive Events auf DiO bzw. CFSE zurückzuführen sind und nicht auf eine Inkubation mit PE-anti-CD63-mAbs.

DiO

Nach Färbung von EVs mit DiO und der Vorbereitung einer Kontrolllösung ohne EVs, wurde der Anteil an fluoreszierenden Events in den Proben durch NanoFCM gemessen. Mithilfe der Kontrolllösung sollte untersucht werden, ob DiO allein zur Bildung fluoreszierender Partikel in wässriger Umgebung neigt. Die Ergebnisse der Analyse der EV-Probe sind in Abbildung 7 dargestellt. Hier ergab sich ein Anteil von 9,0 % an fluoreszierenden Events. Die Messung der Kontrolllösung nach DiO-Inkubation ergab einen Anteil von 6,1 % an fluoreszierenden Events (vgl. Abbildung 8). Im Vergleich der Größenverteilung der fluoreszierenden Events fällt eine größere Streuung in der Kontrolllösung auf, eine klare Unterscheidung der Partikel in der Kontrolllösung und der EV-Probe anhand ihrer Durchmesser ist nicht möglich.

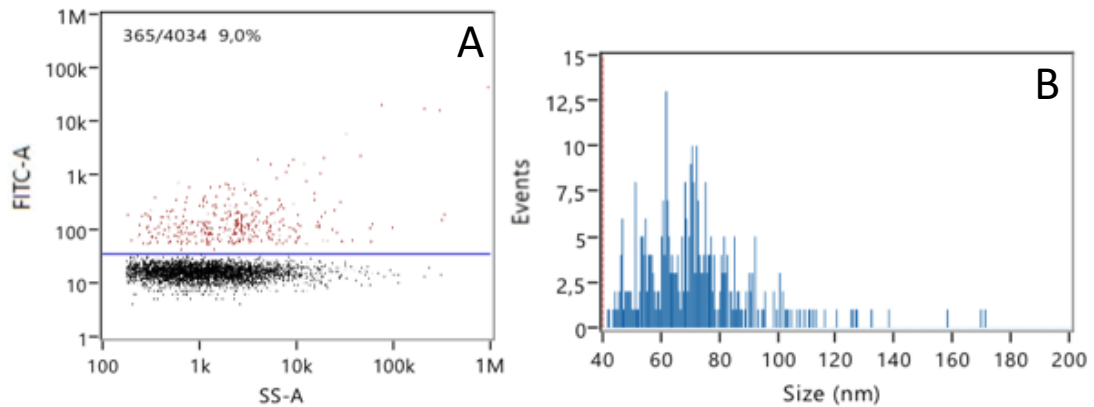


Abbildung 7: Histogramme apikaler EVs von PBEZ nach Inkubation mit DiO und PE-anti-CD63-mAbs, gemessen durch NanoFCM. Konzentration $2,81 \times 10^6$ Partikel $\times \text{mL}^{-1}$. A: Fluoreszenzintensität der Events, 9,0 % der registrierten Events FITC-positiv. B: Größenverteilung der FITC-positiven Events im für EVs typischen Bereich.

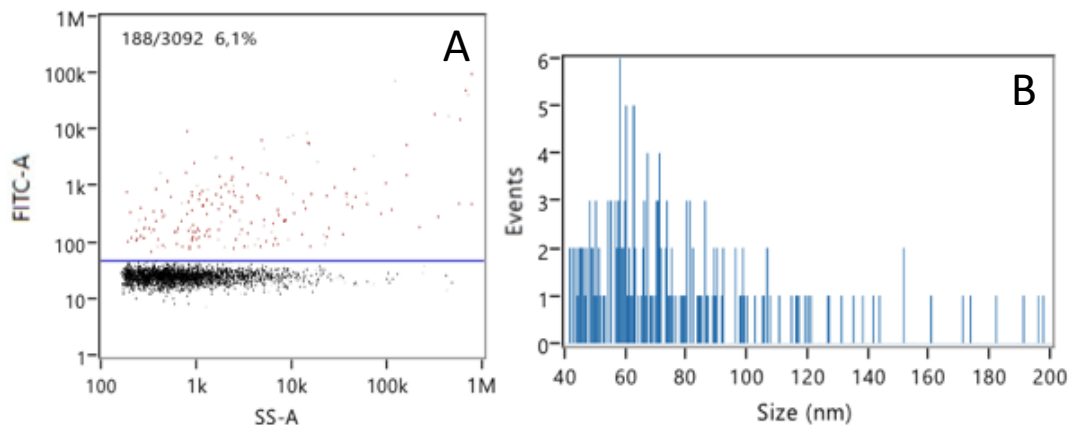


Abbildung 8: Histogramme einer Kontrolllösung nach Inkubation mit DiO und PE-anti-CD63-mAbs, gemessen durch NanoFCM. Konzentration $5,18 \times 10^5$ Partikel $\times \text{mL}^{-1}$. A: Fluoreszenzintensität der Events, 6,1 % der registrierten Events FITC-positiv. B: Größenverteilung der FITC-positiven Events im für EVs typischen Bereich.

CFSE

Nach Inkubation einer EV-Lösung und einer Kontrolllösung ohne EVs mit CFSE wurde jeweils der Anteil an fluoreszierenden Events durch NanoFCM gemessen. Die Ergebnisse der EV-Lösung werden in Abbildung 9 dargestellt. Es zeigte sich ein Anteil von 93,1 % an FITC positiven Events im FITC-Kanal. Die Größenverteilungen der registrierten Events stützt die Annahme, dass es sich hierbei größtenteils um EVs handelte (vgl. 1.2.1). Die Messung der Kontrolllösung lieferte keinen Anhalt für die Bildung fluoreszierender Partikel durch CFSE allein (vgl. Abbildung 10).

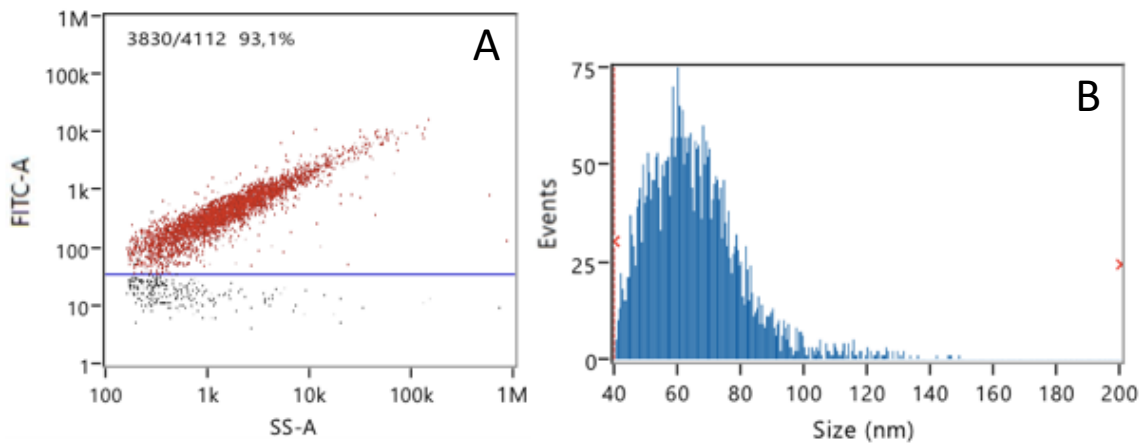


Abbildung 9: Histogramme apikaler EVs nach Inkubation mit CFSE und PE-anti-CD63-mAbs, gemessen durch NanoFCM. Konzentration $4,77 \times 10^7$ Partikel $\times \text{mL}^{-1}$. A: Fluoreszenzintensität der Events, 93,1 % der registrierten Events FITC-positiv. B: Größenverteilung der FITC-positiven Events im für EVs typischen Bereich.

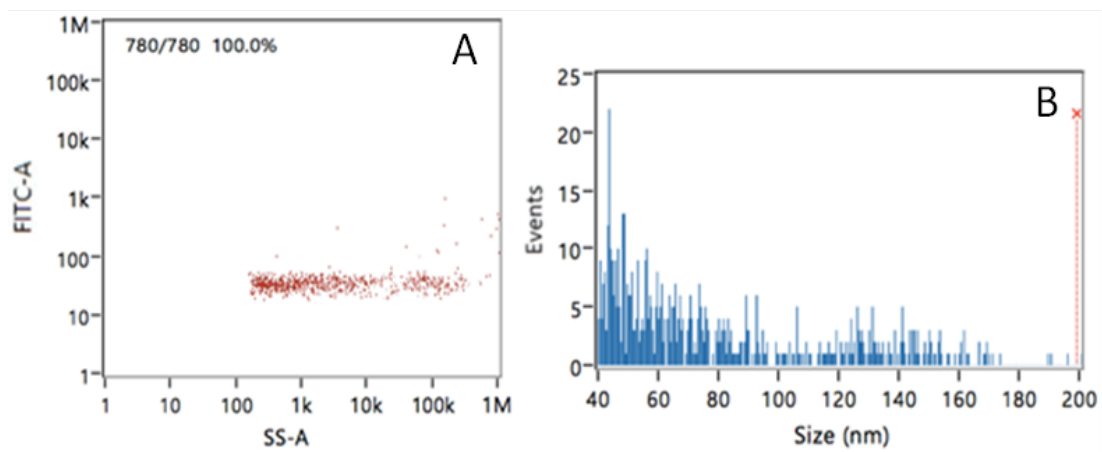


Abbildung 10: Histogramm einer Kontrolllösung nach Inkubation mit CFSE, gemessen durch NanoFCM. Konzentration $1,17 \times 10^7$ Partikel $\times \text{mL}^{-1}$. A: Fluoreszenzintensität der Events. B: Größenverteilung aller Events.

Außerdem wurde nach Inkubation einer EV-Probe mit CFSE und darauffolgender SEC die Fluoreszenzintensität der einzelnen Fraktionen fluoreszenzspektroskopisch bestimmt. Hierdurch wurde untersucht, ob sich EV-assoziierte und nicht-EV-assoziierte CFSE-Moleküle durch eine SEC voneinander trennen lassen und somit in verschiedenen Fraktionen nachweisbar waren. In Abbildung 11 ist die Verteilung der Fluoreszenzintensität über die Fraktionen gezeigt. Es ließ sich ein deutlicher Anstieg der Fluoreszenzintensität in den Fraktionen 19-25 beobachten. In diesen Fraktionen sind sehr kleine Partikel zu erwarten und entsprechen am ehesten nicht-EV-gebundenen CFSE-Molekülen bzw. Aggregaten. Zudem wird ein Anstieg der Fluoreszenzintensität in den Fraktionen 8-10 beobachtet. Nachdem bereits gezeigt wurde, dass ein Großteil der

EVs in diesen Fraktionen konzentriert wird (vgl. Abbildung 4), ist davon auszugehen, dass der Anstieg der Fluoreszenzintensität auf EV-assoziierte CFSE-Moleküle zurückzuführen ist. Somit wurde gezeigt, dass EV-assoziierte und nicht-EV-assoziierte CFSE-Moleküle durch SEC getrennt werden können. Außerdem lässt sich daraus schließen, dass FITC-positive Events der NanoFCM-Messung auf EV-assoziierte CFSE-Moleküle zurückzuführen sind.

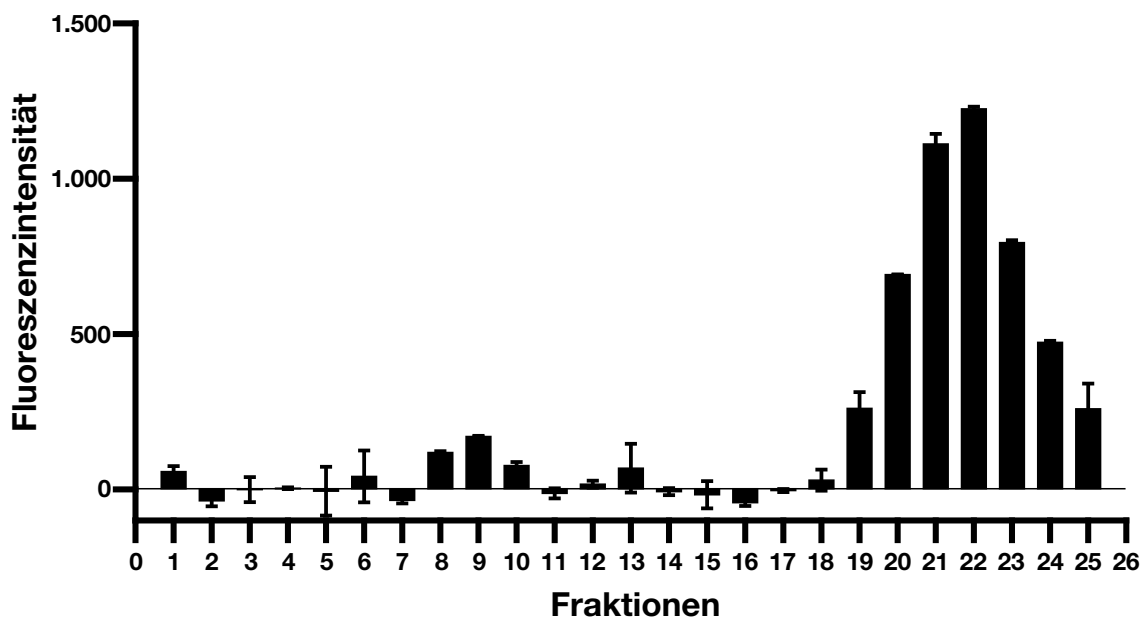


Abbildung 11: Fluoreszenzspektroskopische Messung der CFSE-Verteilung über die Fraktionen nach CFSE-Inkubation und SEC einer apikalen EV-Probe. Gezeigt werden Mittelwerte und ihre Standardabweichung (n=2). Gemessen durch Tecan Reader infinite 200 PRO, Ex/Em: 488/518 nm, Signalverstärkung 124.

In Zusammenschau der unter diesem Kapitel aufgeführten Ergebnisse erwies sich CFSE als die vielversprechendste Option zur Fluoreszenzmarkierung von apikalen EVs von PBEZ und wurde daher für folgende konfokalmikroskopische Untersuchungen zur Aufnahme von EVs durch BEAS-2B Zellen weiterverwendet.

3.2.2 Fluoreszenzmarkierung von EVs gesunder PBEZ des basalen Kompartiments

Es sollte untersucht werden, ob sich basale EVs in ihrer Anfärbbarkeit durch Fluoreszenzfarbstoffe von apikalen EVs unterscheiden. Wann immer in diesem Unterkapitel daher die Bezeichnung „EV“ oder „EV-Probe“ verwendet wird, sind EVs aus dem basalen Kompartiment gesunder PBEZ gemeint.

Fluoreszenzgekoppelte mAbs

Nach Inkubation einer EV-Probe über Nacht mit fluoreszenzgekoppelten mAbs gegen CD63, wurde die Fluoreszenzintensität der EVs durch NanoFCM analysiert. In Abbildung 12 sind Histogramme der NanoFCM-Analyse dargestellt. Es zeigte sich, dass sich nur ein kleiner Anteil von 1,8 % der EVs durch PE-anti-CD63-mAbs markieren ließ. Die Antikörper-basierte Variante führte also wie für apikale auch für basale EVs nicht zu einer effizienten Fluoreszenzmarkierung. Eine Inkubation mit Anti-CD9- und Anti-CD-81-mAbs erfolgte nicht.

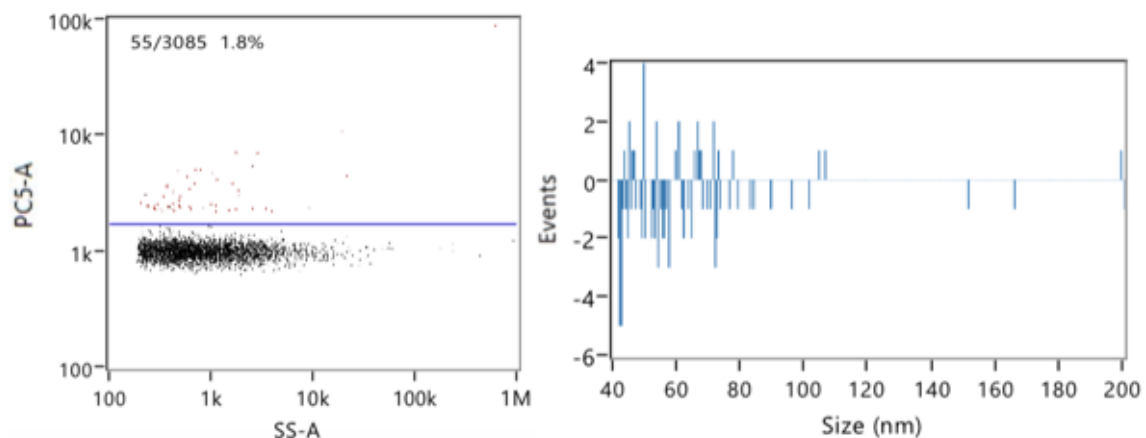


Abbildung 12: Histogramme basaler EVs nach Inkubation mit PE-anti-CD63-mAbs, gemessen durch NanoFCM. Konzentration $-6,36 \times 10^5$ Partikel $\times \text{mL}^{-1}$. A: Fluoreszenzintensität der Events, 1,8 % der registrierten Events PE-positiv. B: Größenverteilung der PE-positiven Events im für EVs typischen Bereich.

DiO

Nach Inkubation einer EV-Lösung und einer Kontrolllösung ohne EVs mit DiO wurden die Proben durch NanoFCM gemessen und der Anteil an fluoreszierenden Events bestimmt. Die Ergebnisse der EV-Lösung sind in Abbildung 13 dargestellt. Hier ergab sich ein Anteil von 2,9 % fluoreszierenden Partikeln im FITC-Kanal mit einer breiten Streuung der gemessenen Partikelgrößen. Die Ergebnisse der Kontrolllösung werden in Abbildung 14 gezeigt. Für die Kontrolllösung ergab sich ein Anteil von 7,9 % an fluoreszierenden Events.

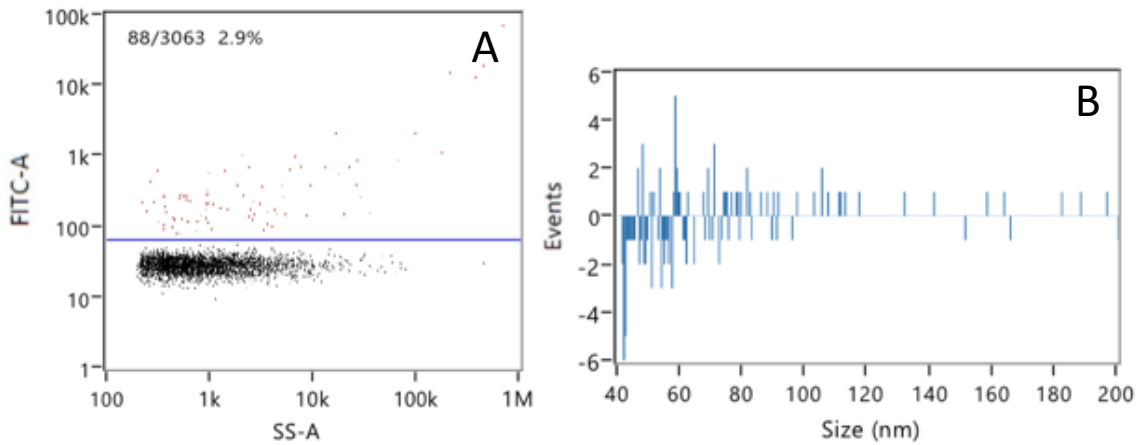


Abbildung 13: Histogramme basaler EVs nach Inkubation mit DiO und PE-anti-CD63-mAbs, gemessen durch NanoFCM. Konzentration $-9,78 \times 10^4$ Partikel $\times \text{mL}^{-1}$. A: Fluoreszenzintensität der Events, 2,9 % der registrierten Events FITC-positiv. B: Größenverteilung der FITC-positiven Events im für EVs typischen Bereich.

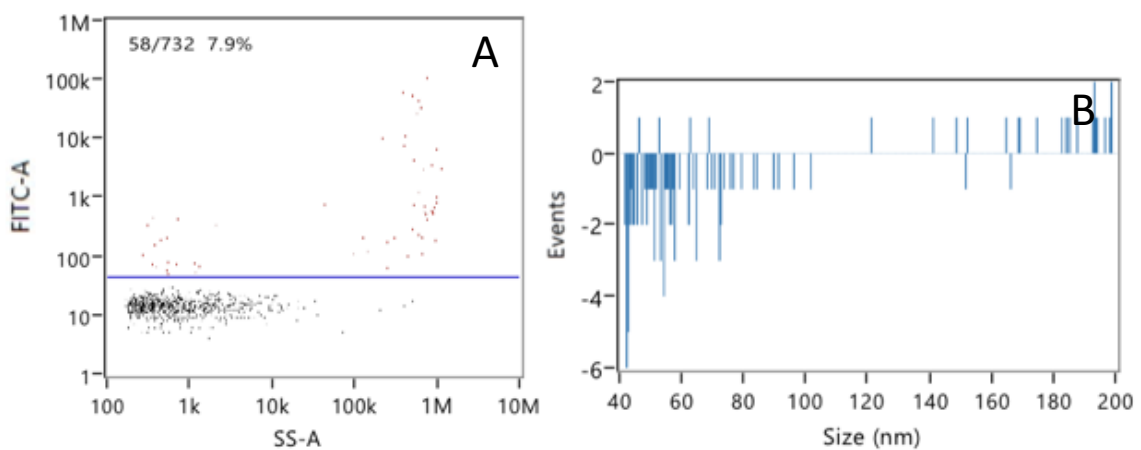


Abbildung 14: Histogramme Kontrolllösung nach Inkubation mit DiO und PE-anti-CD63-mAbs, gemessen durch NanoFCM. Konzentration $-5,87 \times 10^5$ Partikel $\times \text{mL}^{-1}$. A: Fluoreszenzintensität der Events, 7,9 % der registrierten Events FITC-positiv. B: Größenverteilung der positiven Events im FITC-Kanal im für EVs typischen Bereich.

CFSE

Nach Färbung einer EV-Lösung mit CFSE wurde der Anteil an fluoreszierenden Events durch NanoFCM bestimmt. Die Ergebnisse werden in Abbildung 15 dargestellt. Es ist zu sehen, dass 24,9 % der erfassten Events Fluoreszenzaktivität im FITC-Kanal aufwiesen. In Zusammenschau mit der typischen Größenverteilung (vgl. 1.2.1) kann davon ausgegangen werden, dass der größte Teil der Partikel fluoreszenzmarkierten EVs entspricht.

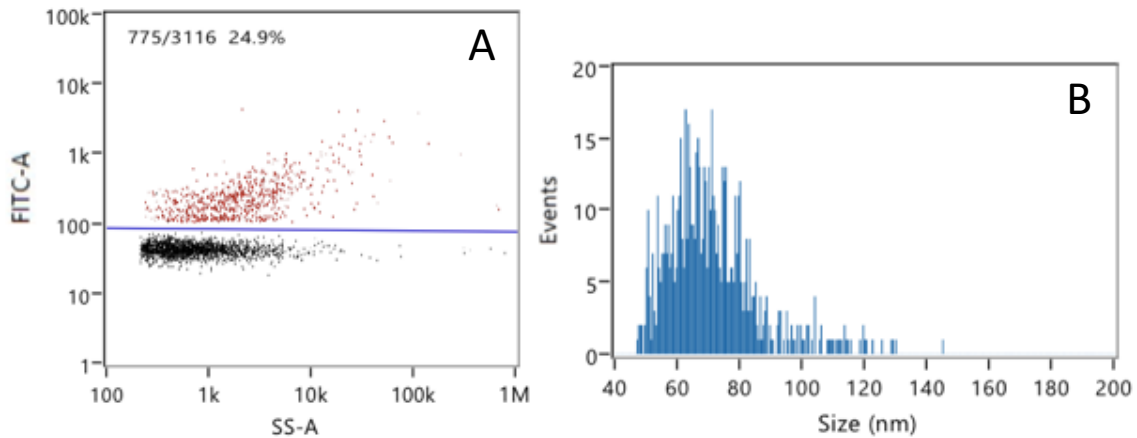


Abbildung 15: Histogramme basaler EVs nach Inkubation mit CFSE und PE-anti-CD63-mAbs, gemessen durch NanoFCM. Konzentration $1,11 \times 10^7$ Partikel $\times \text{mL}^{-1}$. A: Fluoreszenzintensität der Events, 24,9 % der registrierten Events FITC-positiv. B: Größenverteilung der positiven Events im FITC-Kanal im für EVs typischen Bereich.

3.3 Nachweis der Bindung CFSE-markierter, apikaler EVs von PBEZ an BEAS-2B Zellen mittels Konfokalmikroskopie

Es wurde die Hypothese aufgestellt, dass EVs einer Funktion der interzellulären Signaltransduktion erst nach Aufnahme durch Zellen effektiv nachkommen können. Bevor eine funktionelle Untersuchung von EVs durchgeführt wurde, sollte daher überprüft werden, ob apikale EVs gesunder PBEZ durch BEAS-2B Zellen aufgenommen werden. Dazu wurden BEAS-2B Zellen für 6 h mit CFSE-markierten EVs inkubiert. Das Zytoskelett der Zellen (F-Aktin) wurde durch Phalloidin rot markiert. Nuklei der Zellen stellten sich nach Färbung durch DAPI blau dar. In Abbildung 16 sind exemplarisch zwei der durch Konfokalmikroskopie erhaltenen Bilder gezeigt. Darunter ist jeweils die orthogonale Schnittebene vergrößert abgebildet. Es zeigten sich einzelne grüne Punkte, die sich in räumlicher Nähe von Zellen und ihren blau markierten Nuklei befanden. In der zugehörigen orthogonalen Schnittebene schienen die grünen Punkte allerdings auf den Zellen aufgelagert zu sein. In Abbildung 17 ist ein Ausschnitt einer BEAS-2B Zellkultur nach Färbung allein durch DAPI gezeigt. Hier waren keine grünen Punkte nachweisbar.

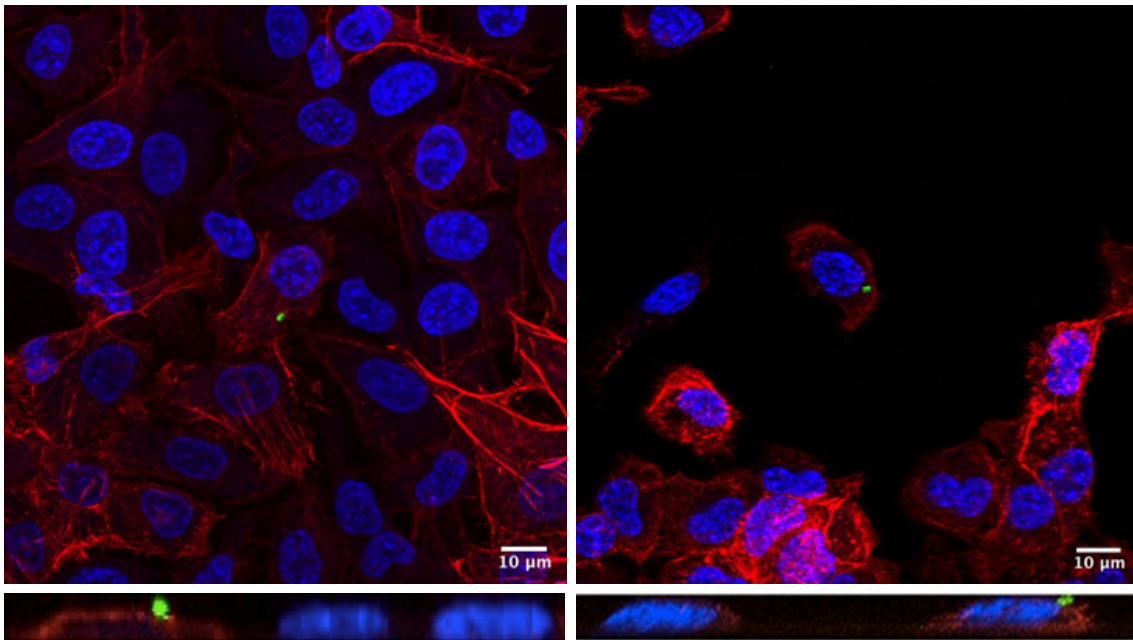


Abbildung 16: Konfokalmikroskopische Aufnahmen (Z-Stack) von BEAS-2B Zellen nach Inkubation mit CFSE-markierten, apikalen EVs gesunder PBEZ. Rot: F-Aktin markiert durch Phalloidin; Blau: Nukleus markiert durch DAPI; Grün: EV markiert durch CFSE. Unterhalb ist jeweils die Abbildung der zugehörigen orthogonalen Schnittebene zur Veranschaulichung der räumlichen Verhältnisse vergrößert dargestellt.

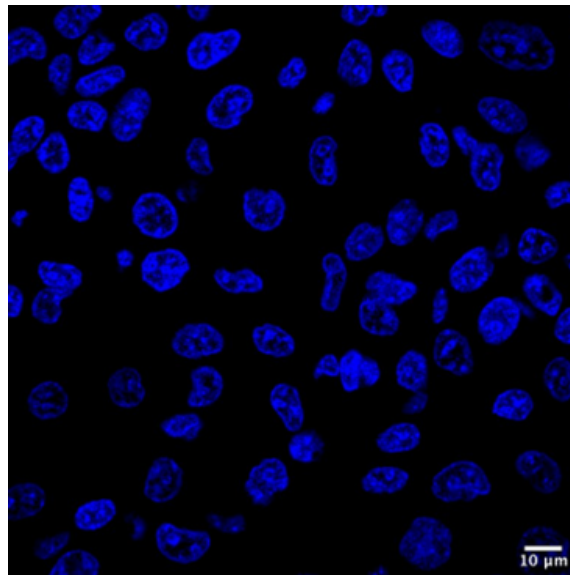


Abbildung 17: Konfokalmikroskopische Aufnahme von BEAS-2B Zellen. Blau: Nukleus markiert durch DAPI.

3.4 Stimulation durch EVs und LPS führt zu einer Stressreaktion in BEAS-2B Zellen

In diesem Kapitel werden die Ergebnisse der Stimulation von BEAS-2B Zellen durch EVs von PBEZ gesunder und asthmatischer Donoren sowie LPS dargestellt. Der Versuchsaufbau und seine Durchführung sind unter 2.2.6 erläutert.

Zur Erfassung der Reaktion von BEAS-2B Zellen auf LPS sowie EVs aus PBEZ wurden drei verschiedene Methoden gewählt. Zum einen erfolgte eine RT-qPCR, um die Expression ausgewählter Gene auf transkriptioneller Ebene zu analysieren. Zum anderen wurde ein ELISA für humanes IL8 durchgeführt, um eine Stressreaktion von BEAS-2B Zellen auch auf translationaler Ebene zu erfassen. Zusätzlich erfolgte über die Quantifizierung von Nitrat und Nitrit im Zellkulturüberstand der BEAS-2B Kulturen eine indirekte Messung der NO-Produktion.

3.4.1 Ergebnisse der Genexpressionsanalyse von BEAS-2B Zellen nach Stimulation durch EVs mittels RT-qPCR

Als Haushaltsgene wurden PGK1 und GAPDH ausgewählt. Dabei ergaben die Ct-Werte für PGK1 eine Standardabweichung von 0,35. Dagegen ergab sich für die Ct-Werte von GAPDH eine Standardabweichung von 0,54. Da PGK1 eine geringere Standardabweichung aufwies und eine geringe Streuung der Ct-Werte als Gütekriterium eines Haushaltsgens zu bewerten ist, wurde PGK1 für die Auswertung der RT-qPCR-Ergebnisse herangezogen.

Es lagen jeweils biologische Triplikate der EV-Proben (jeweils von PBEZ von drei gesunden und drei asthmatischen Donoren) vor. Zusätzlich wurden für jeden Stimulationsansatz technische Triplikate mit unabhängigen BEAS-2B Kulturen angefertigt. Für alle folgenden Graphen werden die Analyseergebnisse der technischen Triplikate und für EV-Stimulationsansätze auch die biologischen Triplikate zusammengefasst (1 x 3 Ansätze für LPS und Kontrolle; 3 x 3 Ansätze für EVs gesunder und asthmatischer Donoren) und auf der X-Achse aufgeführt. Auf der y-Achse sind nach Livak errechnete RQs ($2^{-\Delta\Delta CT}$) der Genexpression aufgetragen (vgl. 2.2.6.3). Anhand der RQs wurden Signifikanzniveaus zwischen den verschiedenen Ansätzen berechnet. Dabei wurden zum einen durch LPS- bzw. EVs gesunder bzw. asthmatischer Donoren stimulierte Ansätze einer unstimulierten Kontrolle gegenübergestellt. Zum anderen wurde ermittelt, ob zwischen Ansätzen, die durch EVs asthmatischer bzw. gesunder Donoren stimuliert wurden, signifikant unterschiedliche Genexpressionen nachzuweisen waren.

In Abbildung 18 werden die RQs der Gene IL8 und NOS2 dargestellt. Es stellte sich heraus, dass die IL8-Expression in BEAS-2B Zellen lediglich nach LPS-Stimulation gegenüber einer Kontrolle signifikant erhöht war. Dagegen war für keinen der Stimulationsansätze eine signifikant veränderte NOS2-Expression festzustellen.

Die RQs der Gene IL25 und TSLP werden in Abbildung 19 dargestellt. Für keinen der Stimulationsansätze ließ sich eine signifikant veränderte IL25-Expression nachweisen. Dagegen zeigte sich, dass die TSLP-Expression in BEAS-2B Zellen nach Stimulation

durch EVs asthmatischer Donoren gegenüber einer Kontrolle signifikant vermindert war. Im Vergleich der beiden EV-Stimulationsansätze ergab sich gegenüber den EVs gesunder Donoren eine signifikant verminderte TSLP-Expression nach Stimulation durch EVs von Donoren mit Asthma.

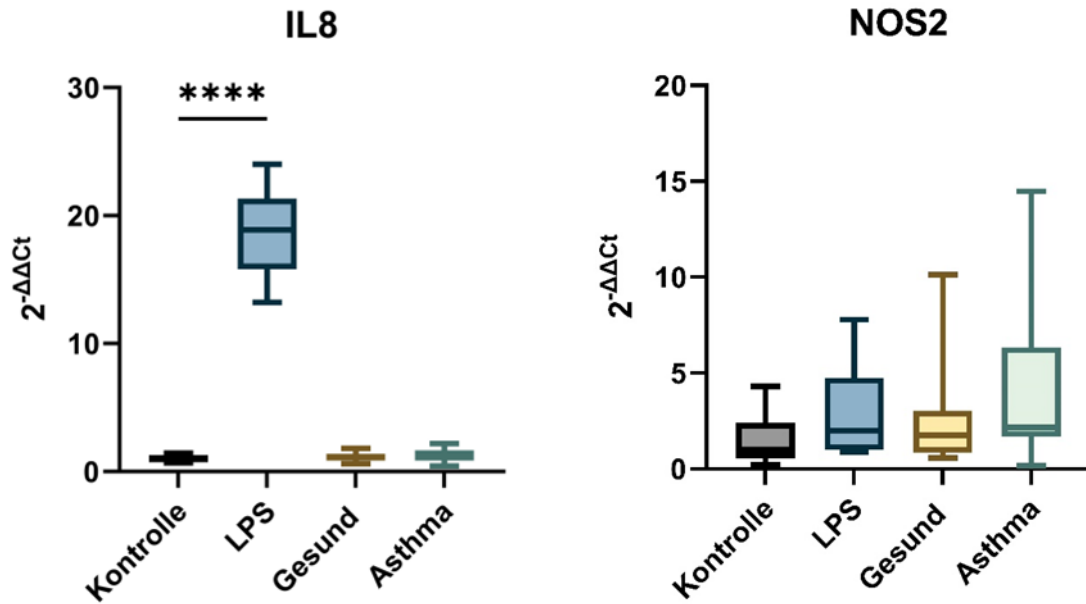


Abbildung 18: Expressionslevel der Gene IL8 und NOS2 analysiert durch RT-qPCR. Normalisiert zu Haushaltsgen PGK1, angegeben als RQ ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) auf der Y-Achse. X-Achse: Experimentansätze für Kontrolle, LPS, EVs gesunder (Gesund) und asthmatischer (Asthma) Donoren.

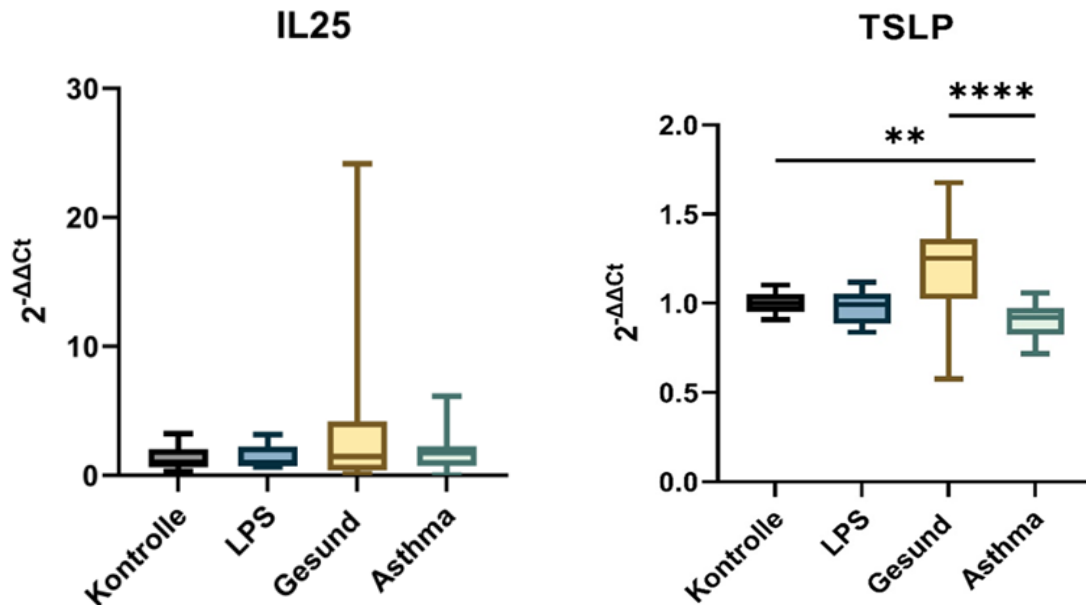


Abbildung 19: Expressionslevel der Gene IL25 und TSLP analysiert durch RT-qPCR. Normalisiert zu Haushaltsgen PGK1, angegeben als RQ ($2^{-\Delta\Delta C_T}$) auf der Y-Achse. X-Achse: Experimentansätze für Kontrolle, LPS, EVs gesunder (Gesund) und asthmatischer (Asthma) Donoren.

Des Weiteren wurden die RQs der Gene MUC5AC und PYCARD ermittelt. Die Ergebnisse werden in Abbildung 20 gezeigt. Es stellte sich heraus, dass die MUC5AC-Expression in BEAS-2B Zellen nach Stimulation durch LPS bzw. EVs von asthmatischen Donoren gegenüber einer unstimulierten Kontrolle signifikant vermindert war. Eine Stimulation durch EVs von Donoren mit Asthma führte im Vergleich zu EVs von gesunden Donoren zu einer signifikant verminderten MUC5AC-Expression. In Bezug auf PYCARD ließ sich feststellen, dass die Expression in BEAS-2B Zellen nach Stimulation durch LPS bzw. EVs asthmatischer Donoren gegenüber einer Kontrolle signifikant vermindert war. EVs asthmatischer Donoren führten darüber hinaus auch gegenüber EVs gesunder Donoren zu einer signifikant verminderten PYCARD-Expression.

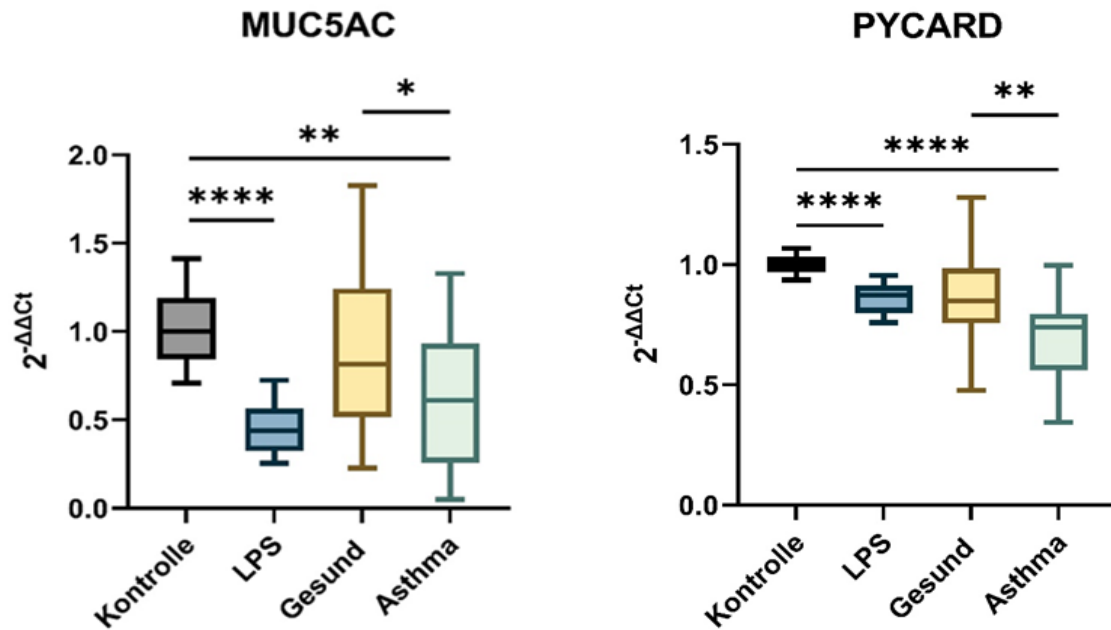


Abbildung 20: Expressionslevel der Gene MUC5AC und PYCARD analysiert durch RT-qPCR. Normalisiert zu Haushaltsgen PGK1, angegeben als RQ ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) auf der Y-Achse. X-Achse: Experimentansätze für Kontrolle, LPS, EVs gesunder (Gesund) und asthmatischer (Asthma) Donoren.

In Abbildung 21 werden die RQs der Gene E-Cad und Vim dargestellt. Die Bezeichnung E-Cad entspricht definitionsgemäß dem Protein, das sich aus der Translation des CDH1-Gens ergibt, wird jedoch im Weiteren synonym verwendet. Für keinen der Stimulationsansätze ließ sich eine signifikant veränderte E-Cad-Expression feststellen. Dagegen war die Vim-Expression in BEAS-2B Zellen nach Stimulation durch EVs von Donoren mit Asthma gegenüber einer Kontrolle und gegenüber der Stimulation durch EVs gesunder Donoren signifikant vermindert.

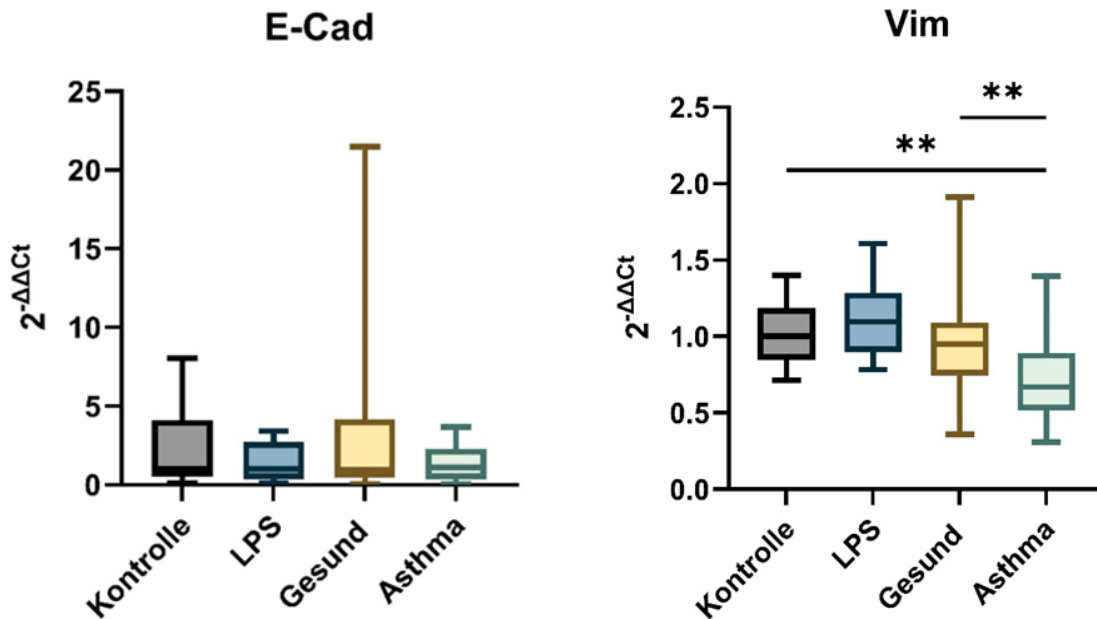


Abbildung 21: Expressionslevel der Gene E-Cad und Vim analysiert durch RT-qPCR. Normalisiert zu Haushaltsgen PGK1, angegeben als RQ ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) auf der Y-Achse. X-Achse: Experimentansätze für Kontrolle, LPS, EVs gesunder (Gesund) und asthmatischer (Asthma) Donoren.

Die RQs der Gene CLDN1 und CLDN4 werden in Abbildung 22 dargestellt. Nach LPS-Stimulation zeigte sich eine signifikant gesteigerte CLDN1-Expression in BEAS-2B Zellen gegenüber einer Kontrolle, wohingegen sie nach Stimulation durch EVs aus PBEZ asthmatischer Donoren signifikant vermindert war. Im Vergleich der beiden EV-Stimulationsansätze ergab sich gegenüber EVs gesunder Donoren eine signifikant verminderte CLDN1-Expression nach Stimulation durch EVs von Donoren mit Asthma. Die CLDN4-Expression war nach Stimulation durch LPS bzw. EVs asthmatischer Donoren gegenüber einer Kontrolle signifikant vermindert. Auch im Vergleich zur Stimulation mit EVs gesunder Donoren war die CLDN4-Expression nach Stimulation durch EVs asthmatischer Donoren signifikant vermindert.

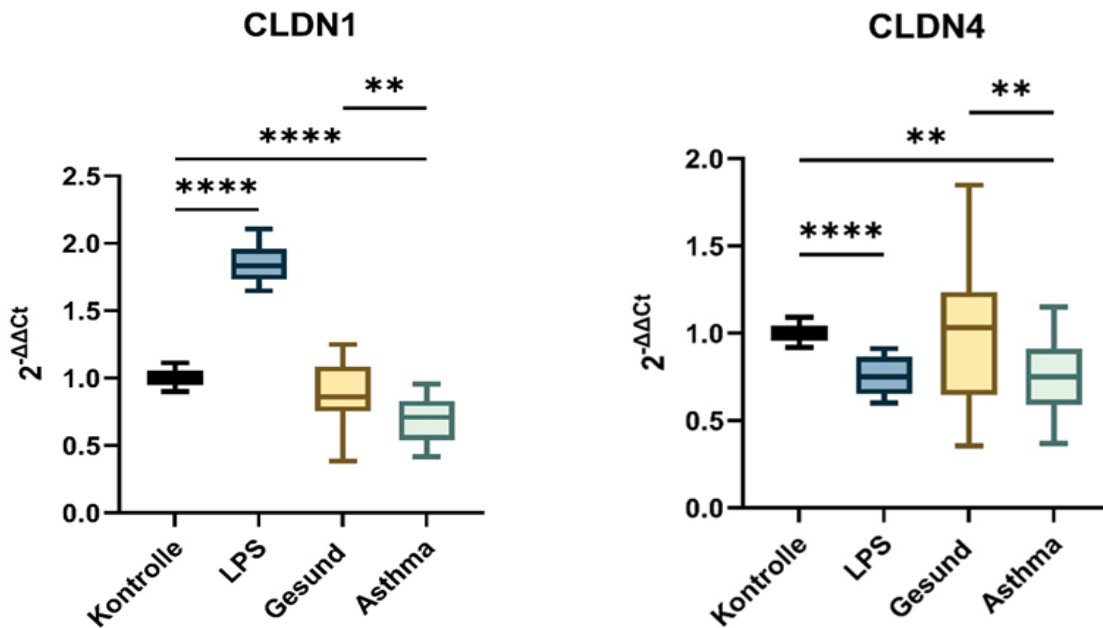


Abbildung 22: Expressionslevel der Gene CLDN1 und CLDN4 analysiert durch RT-qPCR. Normalisiert zu Haushaltsgen PGK1, angegeben als RQ ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) auf der Y-Achse. X-Achse: Experimentansätze für Kontrolle, LPS, EVs gesunder (Gesund) und asthmatischer (Asthma) Donoren.

In Abbildung 23 werden die RQs der Gene OCLN, ZO1 und TJP1 dargestellt. Es stellte sich heraus, dass die OCLN-Expression in BEAS-2B Zellen nach Stimulation durch EVs von Donoren mit Asthma gegenüber einer Kontrolle sowie gegenüber der Stimulation durch EVs gesunder Donoren signifikant vermindert war. Die ZO1-Expression war nach Stimulation durch LPS bzw. EVs von Donoren mit Asthma gegenüber einer Kontrolle signifikant vermindert. Auch im Vergleich zur Stimulation durch EVs von gesunden Donoren zeigte sich eine signifikant verminderte ZO1-Expression nach Stimulation durch EVs von Donoren mit Asthma. Für TJP1 war sowohl nach Stimulation durch LPS als auch durch EVs von Donoren mit Asthma gegenüber einer Kontrolle eine signifikant verminderte Expression festzustellen. Ebenso zeigte sich nach Stimulation durch EVs von Donoren mit Asthma im Vergleich zur Stimulation mit EVs gesunder Donoren eine signifikant verminderte TJP1-Expression.

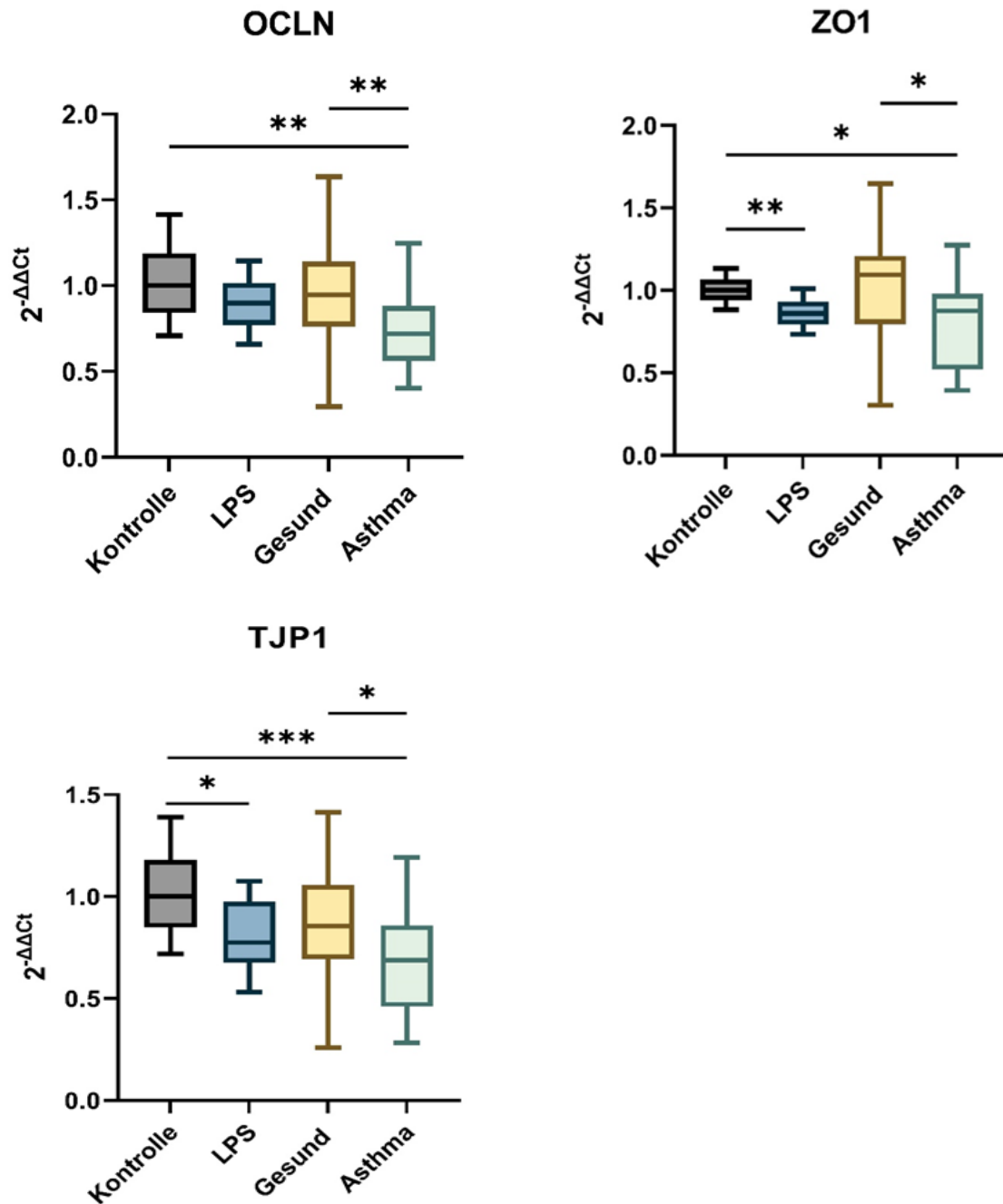


Abbildung 23: Expressionslevel der Gene OCLN, ZO1 und TJP1 analysiert durch RT-qPCR. Normalisiert zu Haushaltsgen PGK1, angegeben als RQ ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) auf der Y-Achse. X-Achse: Experimentansätze für Kontrolle, LPS, EVs gesunder (Gesund) und asthmatischer (Asthma) Donoren.

3.4.2 Ergebnisse der Analyse der IL-8 Sekretion durch BEAS-2B Zellen nach Stimulation mit EVs

In diesem Unterkapitel werden die Ergebnisse des ELISA zur Quantifizierung der IL8-Produktion durch BEAS-2B Zellen nach Stimulation beschrieben. In Abbildung 24 sind

die verschiedenen Stimulationsansätze auf der X-Achse aufgetragen. Wie sich die Werte jeweils zusammensetzen wird unter 2.2.6.1 beschrieben. Auf der Y-Achse wird ihnen jeweils die erhaltene IL8-Konzentration in pg/mL zugeordnet. Die Präsentation der Ergebnisse erfolgt unter Verwendung von GraphPad Prism in Form eines Balkendiagramms unter Angabe der Mittelwerte und der zugehörigen Standardabweichungen.

Für den Überstand der BEAS-2B Kulturen, die durch LPS stimuliert wurden, ließ sich gegenüber der unstimulierten Kontrolle eine signifikant erhöhte Menge an IL8 nachweisen. Dagegen zeigten sich für die Stimulationsansätze mit EVs sowohl gesunder als auch asthmatischer Donoren signifikant verminderte IL8-Konzentrationen gegenüber der Kontrolle.

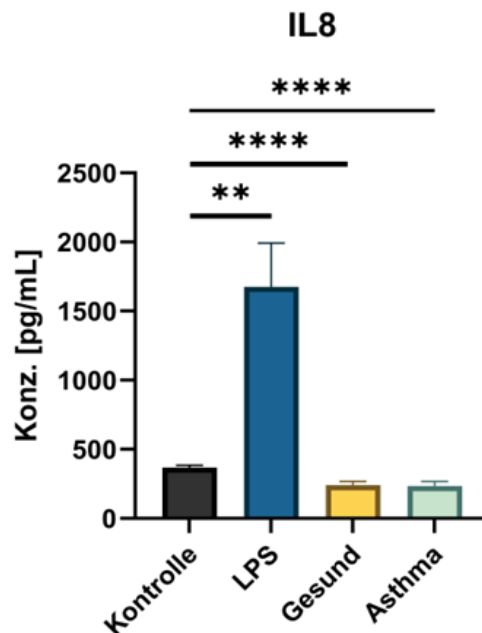


Abbildung 24: IL8-Produktion durch BEAS-2B Zellen analysiert mittels IL8-ELISA.

Absorptionsspektroskopie mittels Tecan Reader infinite 200 PRO. X-Achse: Experimentansätze für Kontrolle, LPS, gesunde EVs (Gesund) und asthmatische EVs (Asthma). Y-Achse: Konzentration in pg/mL nach linearer Interpolierung in Standardreihe. Angabe von Mittelwerten und Standardabweichungen der Experimentansätze.

3.4.3 Ergebnisse der Analyse der NO-Freisetzung durch BEAS-2B Zellen nach Stimulation mit EVs

In diesem Unterkapitel werden die Ergebnisse der indirekten Quantifizierung der NO-Produktion durch BEAS-2B Zellen nach Stimulation dargestellt (vgl. Abbildung 25). Auf der X-Achse werden die verschiedenen Stimulationsansätze LPS, EVs gesunder und asthmatischer Donoren aufgeführt. Wie sich die Werte jeweils zusammensetzen, wird

unter 2.2.6.1 beschrieben. Daneben werden auch die Kontrolle und der letzte Verdünnungsschritt (niedrigste Konzentration) der Standardreihe aufgetragen. Auf der Y-Achse wird den verschiedenen Ansätzen jeweils die absorptionsspektroskopisch ermittelte optische Dichte (OD) zugeordnet. Die OD sämtlicher Stimulationsansätze war jedoch außerhalb des Bereichs der Standardreihe. Somit konnte kein Nachweis der Freisetzung von Nitrit oder Nitrat durch BEAS-2B Zellen ermittelt werden. Aufgrund der extrem niedrigen Produktion von NO nach Stimulation konnte auch kein signifikanter Unterschied zwischen den verschiedenen Stimulationsansätzen und der Kontrolle festgestellt werden.

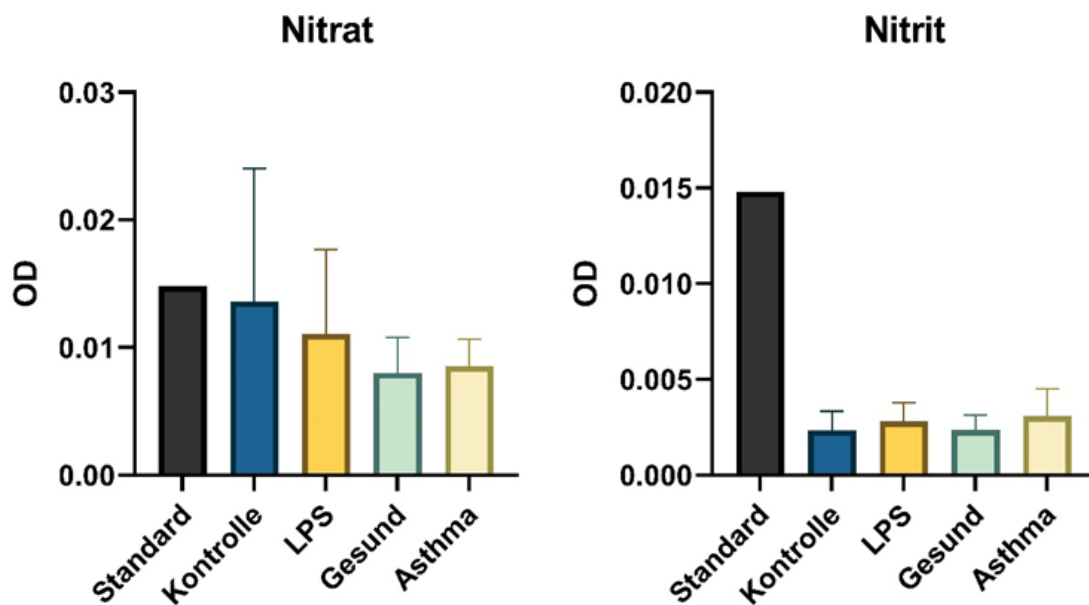


Abbildung 25: Indirekte Quantifizierung der Freisetzung von NO durch stimulierte BEAS-2B Zellen durch absorptionsspektroskopische Messung von Nitrat und Nitrit nach Griess. Messung durch Tecan Reader infinite 200 PRO. X-Achse: Experimentansätze für Kontrolle LPS, EVs gesunder (Gesund) und asthmatischer (Asthma) Donoren und letzter Standardverdünnungsschritt (Standard). Y-Achse: OD, Angabe von Mittelwerten und Standardabweichung der Stimulationsansätze.

4 Diskussion

Im Rahmen dieser Arbeit erfolgte eine funktionelle Untersuchung von EVs im Kontext epithelialer Aktivierungsprozesse bei Asthma bronchiale. Hierzu wurde mittels Konfokalmikroskopie untersucht, ob fluoreszenzmarkierte EVs von BEAS-2B Zellen aufgenommen werden. Des Weiteren wurde analysiert, ob EVs asthmatischer Spenderzellpopulationen im Gegensatz zu EVs gesunder Spenderzellpopulationen eine Entzündungsreaktion in BEAS-2B Zellen auslösen. Zum Nachweis einer Entzündungsreaktion in BEAS-2B Zellen wurden die Methoden RT-qPCR, ELISA für IL8 und NO-Quantifizierung nach Griess angewendet.

In der vorliegenden Arbeit wurden UF und SEC angewendet, um eine Konzentrierung von EVs aus Zellkulturüberständen von PBEZ in bestimmten Fraktionen zu erreichen. Der Erfolg der Konzentrierung wurde überprüft, indem die Partikelkonzentration in den verschiedenen Fraktionen durch NanoFCM bestimmt wurde. Gleichzeitig sollten gelöste und möglicherweise funktionelle Proteine von EVs getrennt werden, um im weiteren Verlauf Analysen zur Funktion von EVs durchführen zu können. Eine größenabhängige Auftrennung durch SEC war hierfür besonders gut geeignet, da gelöste und nicht-aggregierte Proteine üblicherweise deutlich kleiner sind als EVs und sich somit in höheren Fraktionen wiederfinden (Böing et al. 2014). Zudem können EVs durch eine SEC schonend von Proteinen und anderen Biomolekülen getrennt werden, ohne ihre Morphologie und Funktion wesentlich zu beeinträchtigen (Benedikter et al. 2017; Monguió-Tortajada et al. 2019). Im Gegensatz dazu führt die Methode der UZ, die gängigste Alternative zur Konzentrierung von EVs, durch hohe Zentrifugalkräfte von bis zu 200.000 x g oft zur Aggregation von Proteinen und EVs (Linares et al. 2015; Konoshenko et al. 2018). Dadurch wird eine zuverlässige Trennung von EVs und Proteinen anhand ihrer Größe unmöglich. Zudem beeinträchtigen die Zentrifugalkräfte während einer UZ sowohl Morphologie als auch Funktionalität von EVs (Linares et al. 2015; Taylor und Shah 2015; Monguió-Tortajada et al. 2019). Eine Untersuchung der Funktion von EVs im weiteren Verlauf wäre somit nach einer UZ nicht sinnvoll. Aus diesen Überlegungen ergibt sich, dass eine Kombination aus UF und SEC für unsere Fragestellungen die Methode der ersten Wahl zur Aufbereitung der EV-Proben darstellt. Nach Durchführung einer SEC wurden die EV-Fraktionen anhand der gemessenen Partikelkonzentrationen für eine funktionelle Analyse ausgewählt, während die übrigen Fraktionen verworfen wurden (vgl. Abbildung 4). So sollten kontaminierende Proteine von der EV-Funktionsanalyse ausgeschlossen werden. Dabei sollte beachtet werden, dass der Übergang von EV-Fraktionen zu nicht-EV-Fraktionen fließend ist. Eine Auswahl bestimmter EV-Fraktionen zu Gunsten des Ausschlusses kontaminierender Proteine stellt somit eine Selektion von EVs anhand ihrer Größe dar. Besonders kleinere EVs, die

sich tendenziell in den höheren Fraktionen sammelten, werden dabei möglicherweise von nachfolgenden funktionellen Untersuchungen ausgeschlossen. Es wird jedoch davon ausgegangen, dass gerade auch kleine EVs bzw. Exosomen funktionell aktiv sind (Kalluri und LeBleu 2020). Ihr Ausschluss von der weiteren Analyse könnte somit einen Einfluss auf die Funktionsanalyse der aufbereiteten EV-Probe haben. Darüber hinaus sollte entsprechend den MISEV Leitlinien von 2018 zu bedenken gegeben werden, dass anhand der hier durchgeführten Experimente nicht sicher unterschieden werden kann, ob funktionelle Auswirkungen auf EVs selbst oder funktionell aktive, EV-assoziierte Proteine zurückzuführen sind, da diese durch eine SEC nicht voneinander getrennt werden können (Théry et al. 2018).

Durch Konfokalmikroskopie sollte überprüft werden, ob apikale EVs von PBEZ durch BEAS-2B Zellen aufgenommen werden, um darauffolgend einer signalübermittelnden Funktion nachkommen zu können. Zur Fluoreszenzmarkierung von EVs wurden drei Methoden ausgewählt, die sich jeweils in ihrem zugrundeliegenden Mechanismus unterscheiden.

MAbs, die mit einem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt sind, binden an Oberflächenproteine wie zum Beispiel die Gruppe der Tetraspanine. Aus anderen Studien geht hervor, dass Tetraspanine zu den häufigsten Proteinen auf EV-Membranen gehören (Andreu und Yáñez-Mó 2014). Die hier erhaltenen Ergebnisse zeigten jedoch, dass sich weder apikale noch basale EVs effizient durch mAbs gegen Tetraspanine markieren ließen. Ein möglicher Erklärungsansatz hierfür könnte sein, dass die Sensitivität des NanoFCM zu gering war, um einzelne, gebundene fluoreszenzgekoppelte mAbs nachzuweisen.

Als zweite Variante der Fluoreszenzmarkierung von EVs wurde der Farbstoff DiO ausgewählt. Dieser interkaliert aufgrund seiner lipophilen Eigenschaften in biologische Membranen. Farbstoffmenge, Inkubationsdauer und Temperatur wurden entsprechend den Angaben anderer Studien gewählt (Morales-Kastresana et al. 2017; Jung et al. 2018; Murdica et al. 2020). In den Ergebnissen zeigte sich, dass sich EVs von PBEZ auch durch DiO nicht effizient markieren ließen. Im Rahmen einer theoretischen Überlegung ergibt sich aus der Differenz der fluoreszierenden Events der Kontrolllösung (6,1 %) und der apikalen EV-Probe (9,0 %) lediglich ein Anteil von ungefähr 3 % fluoreszenzmarkierter EVs. Neben einer geringen Anfärbung von EVs durch DiO zeigte sich hier auch, dass sich in einer Kontrolllösung ohne EVs 6,1 % fluoreszierende Partikel mit einem ähnlichen Durchmesser wie EVs bildeten. Dies ist am ehesten darauf zurückzuführen, dass DiO in wässriger Umgebung aufgrund seiner lipophilen Eigenschaften zur Bildung fluoreszierender Partikelaggregate neigt. Dies deckt sich mit Beobachtungen von Puzar Dominkus et al. (2018), die auch für den strukturverwandten

Farbstoff PKH26 eine Neigung zur Bildung fluoreszierender Partikelaggregate nachwies. Die Bildung nicht-EV-assoziiertes DiO-Partikel könnte der Grund für eine mangelhafte Interkalierung von DiO in EV-Membranen sein, da hierdurch weniger DiO-Moleküle verfügbar sind. Für die basale EV-Probe ergab die NanoFCM-Messung sogar einen deutlich geringeren Anteil an fluoreszierenden Partikeln in der EV-Probe als in der Kontrolllösung. Dagegen sind die Ergebnisse beider Kontrolllösungen vergleichbar, die jeweils parallel zur apikalen bzw. basalen Probe vorbereitet wurden. Es wäre zu erwarten gewesen, dass DiO in einer 0,9 %-NaCl-Kontrolllösung gleichermaßen, wie in einer 0,9 %-NaCl-getragenen EV-Lösung zur Bildung fluoreszierender Partikel neigt. Möglicherweise beeinträchtigt DiO die Integrität basaler EVs oder die Anwesenheit basaler EVs wirkt störend auf die Formierung von DiO-Partikeln. Dieser Frage wurde jedoch in dieser Arbeit nicht weiter nachgegangen. Entscheidend ist, dass aufgrund der ähnlichen Größenverteilung nicht-EV-assoziierte DiO-Partikel durch eine SEC nicht von EVs getrennt werden können. Somit eignet sich dieser Farbstoff nicht für einen konfokalmikroskopischen Nachweis der Aufnahme von fluoreszenzmarkierten EVs durch BEAS-2B Zellen.

Die dritte ausgewählte Variante der Fluoreszenzmarkierung war der Farbstoff CFDA-SE. Menge an Farbstoff, Inkubationsdauer und Temperatur wurden entsprechend den Angaben anderer Studien gewählt (Morales-Kastresana et al. 2017). Die Spaltung von CFDA-SE zum fluoreszierenden CFSE-Molekül ist von funktionsfähigen Esterasen innerhalb eines EVs abhängig. Lässt sich ein EV durch CFDA-SE markieren, kann gefolgert werden, dass die Membran intakt ist und enthaltene Enzyme funktionell aktiv sind (Ender et al. 2019). Die Messung einer apikalen EV-Probe von PBEZ ergab mit einem Anteil von 93,1 % fluoreszierender Partikel eine extrem effiziente Färbung von apikalen EVs durch CFSE. Außerdem kann daraus geschlossen werden, dass die angewandten Methoden der Aufbereitung einer EV-Probe durch UF und SEC gut geeignet waren, um die Integrität und Funktion von apikalen EVs zu erhalten. In einer basalen EV-Probe ließen sich dagegen nur 24,9 % der EVs anfärben. Grund hierfür könnte eine geringere Widerstandsfähigkeit basaler EVs sein, die möglicherweise im Rahmen der Aufbereitung Schaden nehmen. Da die Inkubationsbedingungen für die Stabilität von EVs relevant zu sein scheinen, ließen sich Temperatur und Dauer der CFSE-Inkubation besonders für basale EVs möglicherweise noch optimieren (Ender et al. 2019). Andererseits könnten basale EVs auch von vorherein weniger funktionell aktive Esterasen als apikale EVs enthalten. Es sollte festgehalten werden, dass eine Anfärbung durch CFSE aufgrund der Abhängigkeit funktionsfähiger Esterasen zu einer Selektion bestimmter EV-Untergruppen führen könnte.

Im Vergleich mit DiO und Fluoreszenz-gekoppelten mAbs erwies sich eine Markierung durch CFSE sowohl für apikale als auch für basale EVs als effizienteste Methode. Für jede getestete Art der Fluoreszenzmarkierung zeigte sich für basale EVs eine schlechtere Anfärbbarkeit als für EVs des apikalen Kompartiments. Möglicherweise leiden basale EVs stärker unter der Aufbereitungsprozedur und büßen dabei teilweise ihre funktionelle sowie morphologische Integrität ein. Diese Vermutung wird durch die Beobachtung gestützt, dass sämtliche durch NanoFCM gemessenen Konzentrationen basaler EV-Proben niedriger sind als die ihres apikalen Pendant, obwohl für alle Proben eine gleiche Startanzahl von 3×10^8 EVs gewählt wurde. Ein Vergleich der Konzentrationen kann hier jedoch allenfalls als Tendenz angesehen werden, da das Volumen nach UF (B) nur geschätzt wurde und keine genaue Bestimmung erfolgte. Somit kann keine Aussage über die absolute Anzahl an EVs in den verschiedenen EV-Proben getroffen werden.

Es wurde gezeigt, dass CFDA-SE-Moleküle, die nicht mit EVs assoziiert waren, durch eine SEC von EV-assoziierten CFSE-Molekülen getrennt werden konnten. Zudem wurde jede BEAS-2B Kultur in der Vorbereitung für die Konfokalmikroskopie mehrmals gründlich gewaschen und Zellkulturüberstand inklusive gelösten, nicht gebundenen oder aufgenommenen EVs wurde entfernt. Daher wird davon ausgegangen, dass sämtliche grün fluoreszierenden Partikel EVs entsprechen, die durch CFSE markiert und fest an Zellen gebunden waren. Die orthogonalen Schnittebenen zeigten, dass EVs eher an Zelloberflächen aufgelagert waren, als dass sie durch sie aufgenommen wurden. Möglicherweise kommen EVs ihrer Funktion als Signalübermittler durch vorübergehende Bindung an Empfängerzellen nach, ohne dabei zwangsläufig komplett durch diese aufgenommen zu werden. Es sollte an dieser Stelle erwähnt sein, dass für konfokalmikroskopische Untersuchungen lediglich apikale EVs von gesunden PBEZ verwendet wurden. Mulcahy et al. (2014) resümieren, dass die Aufnahme von EVs im Wesentlichen abhängig von Energie und einem funktionierenden Zytoskelett abläuft (Mulcahy et al. 2014). Daher wurde die Annahme getroffen, dass sich das Aufnahmeverhalten hinsichtlich apikaler und basaler bzw. gesunder und asthmatischer EVs nicht grundlegend unterscheidet.

Durch die Konfokalmikroskopie kann keine Bewertung morphologischer Eigenschaften der EVs, wie Form und Größe erfolgen, da ihre Erscheinung primär abhängig von der Menge an gebundenen Fluoreszenzmolekülen ist. Durch eine sorgfältige Auswahl und Durchführung schonender Methoden (SEC, UF) wurde versucht einer Aggregatbildung von EVs entgegenzuwirken. Wie bereits von Mulcahy et al. (2014) diskutiert wurde, kann jedoch nicht sicher ausgeschlossen werden, dass EVs teilweise als Aggregate vorlagen und somit fluoreszenzspektroskopisch deutlicher nachzuweisen waren als einzelne EVs

(Mulcahy et al. 2014). Insgesamt wurden ungefähr 5×10^7 EVs, welche zu 85,8 % durch CFSE markiert waren, zu einer BEAS-2B Zellpopulation ($125.000 \text{ Zellen/cm}^2$, $150 \mu\text{L Medium}/0,64 \text{ cm}^2$) hinzugegeben. Die konfokalmikroskopischen Bilder zeigten, dass nach einer sechsständigen Inkubation nur eine Minderheit der Zellen in räumlicher Nähe zu EVs standen. Möglicherweise könnte dies darauf zurückzuführen sein, dass EVs nur vorübergehend an Zellen gebunden waren und danach wieder in Lösung traten und später beim Spülen aus der Probe entfernt wurden. Es ist außerdem davon auszugehen, dass ein gewisser Anteil an EVs im Rahmen der Versuchsvorbereitungen verloren gegangen ist, indem EVs zum Beispiel an Oberflächen von Aufbereitungsmaterialien hängen blieben. Außerdem könnten EVs auch durch einwirkende mechanische Kräfte im Rahmen einer Zentrifugation zu Grunde gegangen sein. Zusätzlich ist die Auflösung eines Konfokalmikroskops zwar grundsätzlich ausreichend, um fluoreszierende EVs auszumachen. Jedoch ist die Auflösung möglicherweise unzureichend, um auch schwach fluoreszierende EVs mit wenigen CFSE-Molekülen klar vom Hintergrund abzugrenzen. All diese Faktoren trugen wahrscheinlich dazu bei, dass insgesamt weniger EVs dargestellt werden konnten als erwartet. Bei einer Wiederholung des Versuchs wäre es sicherlich sinnvoll eine größere Anzahl an fluoreszenzmarkierten EVs zu verwenden. Abzuwägen wäre auch, ob der Einsatz einer alternativen bildgebenden Methode mit einer noch höheren Auflösung geeignet wäre.

Das Verhältnis von EVs zu Volumen und Zellen war für Konfokalmikroskopie und funktionelle Untersuchungen das gleiche. Nachdem sich in der Konfokalmikroskopie nachweisen ließ, dass nur eine Minderheit der Zellen EVs gebunden hatten, ist Ähnliches auch für die funktionellen Untersuchungen anzunehmen. Aufgrund der begrenzten Verfügbarkeit an EVs konnte jedoch keine größere Anzahl an EVs für funktionelle Untersuchungen verwendet werden.

Nach Stimulation von BEAS-2B Zellen durch LPS, gesunde EVs und asthmatische EVs wurden die Zellen mithilfe der RT-qPCR, eines IL8-ELISA-Kits und eines NO-Assay-Kits analysiert. Neben biologischen Triplikaten der EV-Proben, wurden technische Triplikate mit separaten BEAS-2B Kulturen für jeden Stimulationsansatz angefertigt, um Schwankungen durch BEAS-2B Zellen zu mitteln und die Verlässlichkeit der Ergebnisse zu erhöhen. Zur Kultur von BEAS-2B Zellen während der Stimulation wurde BEGM ohne HC verwendet, da ein Einfluss von HC auf Endozytoseprozesse nicht auszuschließen ist (Lu et al. 2008). Zudem hat HC eine immunsuppressive Wirkung und könnte einen hemmenden Einfluss auf die Aktivierung von BEAS-2B Zellen haben (Prodanovic et al. 2018). Zur Inkubation von BEAS-2B Zellen mit EVs wurde, wie auch für die Konfokalmikroskopie, eine Dauer von 6 h mit einer Konzentration von $2 \times 10^8 \text{ EVs} \times \text{mL}^{-1}$

¹ gewählt. Es wurde auf Basis der Untersuchungen von Tian et.al. (2013) vermutet, dass dieser Zeitraum zur Signalübermittlung durch EVs ausreichen sollte (Tian et al. 2013). Danach wurde die Konzentration an EVs vermindert, indem BEGM hinzugegeben wurde, um genügend Nährstoffe für die Inkubation von weiteren 18 h zur Verfügung zu stellen. So sollte vermieden werden, dass eine Stressreaktion der BEAS-2B Zellen durch Nährstoffmangel ausgelöst wird. Die Inkubation von 18 h erfolgte, um Zellen ausreichend Zeit zu geben sowohl auf transkriptioneller als auch auf translationaler Ebene auf die Stimulation zu reagieren. Für zukünftige Experimente und bei ausreichendem Probenmaterial könnte eine Analyse zu mehreren Zeitpunkten nach Stimulation sinnvoll sein. Da post-transkriptionelle, translationale und post-translationale Faktoren auf mRNA- und Proteinlevel Einfluss haben können, ist nicht sicher vorherzusagen, wann ein Maximum der verschiedenen mRNA- bzw. Proteinlevels vorliegt (Buccitelli und Selbach 2020). Auf Basis der hier durchgeführten Experimente kann keine Aussage darüber getroffen werden, ob eine Inkubationszeit von 24 h eine optimale Zeitspanne zur Erfassung einer Stressreaktion von BEAS-2B Zellen darstellt.

Für die Auswertung der Ergebnisse der RT-qPCR ist es von essenzieller Bedeutung, dass ein Haushaltsgen konstant und unabhängig von einer Stimulation exprimiert wird. In diesem Fall wurden PGK1 und GAPDH als Haushaltsgene ausgewählt, die beide für Enzyme des Glykolyse-Stoffwechselweges kodieren und im Rahmen einer asthmatischen Entzündungsreaktion weitgehend unverändert exprimiert werden (He et al. 2008). Da PGK1 im Vergleich eine kleinere Standardabweichung aufwies und sich die Güte eines Haushaltsgens über eine kleine Streuung der Ct-Werte auszeichnet, wurde PGK1 für die Auswertung der RT-qPCR-Ergebnisse herangezogen.

IL8 ist ein Zytokin der CXC-Familie, das als Chemokin der Attraktion neutrophiler Zellen dient (Baggiolini und Clark-Lewis 1992). Für Studien mit BEAS-2B Zellen ist es ein häufig verwendeter Marker zum Nachweis einer Aktivierung der Zellen nach Stimulation (Takizawa et al. 2000; Jang et al. 2017; Wang et al. 2019; Liu et al. 2020). Die Analyse von IL8 sowohl auf transkriptioneller als auch auf translationaler Ebene sollte als interne Kontrolle der Ergebnisse dienen, da mRNA-Expressionslevel und Protein-Translationslevel oft korrelieren (Buccitelli und Selbach 2020). Sowohl in der Genexpressionsanalyse durch RT-qPCR als auch durch den IL8-ELISA ergab sich nach LPS-Stimulation wie erwartet eine deutliche Steigerung der Expression und Translation von IL8 (Si und Zhang 2021). Mit der Übereinstimmung der Ergebnisse beider Methoden kann dies im Sinne einer Positivkontrolle als Bestätigung für ein funktionierendes experimentelles System gesehen werden, um Stressreaktionen von BEAS-2B Zellen nachzuweisen. Eine Stimulation durch gesunde und asthmatische EVs führte gegenüber der Kontrolle jedoch nicht zu einer veränderten Expression des IL8-Gens, während sich

anhand des IL8-ELISAs sogar eine verminderte Translation des IL8-Proteins ergab. Dies könnte als Zeichen einer Stressreaktion in BEAS-2B Zellen interpretiert werden. Jedoch bleibt unklar, warum auch EVs gesunder Donoren eine Stressreaktion induzieren.

Auch die NO-Produktion wurde auf zwei Ebenen analysiert. Hierzu wurde zum einen die Expression des Gens NOS2 untersucht, das für die induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase kodiert und im Rahmen asthmatischer Entzündungen häufig hochreguliert wird (Holgate et al. 2015). Zum anderen wurde die Produktion von NO indirekt über die Quantifizierung von Nitrat und Nitrit nach Griess gemessen. Jedoch führte entgegen den Erwartungen keiner der Stimulationsansätze zu einer Veränderung der NOS2-Expression bzw. NO-Produktion in BEAS-2B Zellen (Hou et al. 2021). Möglicherweise war die Inkubationszeit von insgesamt 24 h zu lang, um gesteigerte Expressionslevel von NOS2 bzw. Produktionslevel von Nitrit und Nitrat nachzuweisen. Andererseits ist die Produktion von NO von NADPH abhängig (Guo et al. 2000). Es könnte sein, dass in dem gewählten Experimentensystem mit BEAS-2B Zellen als *in vitro* Modell nicht genügend NADPH zur Verfügung stand und deshalb nur wenig NO produziert wurde. Andererseits ist vielleicht auch eine größere Menge an LPS oder EVs nötig, um eine gesteigerte NO-Produktion durch BEAS-2B Zellen in Antwort auf eine Stimulation zu verursachen.

Die RT-qPCR für TSLP ergab eine signifikant verminderte Expression nach Stimulation durch asthmatische EVs gegenüber einer Kontrolle. Zwischen asthmatischen und gesunden EV-Stimulationsansätzen war ein signifikanter Unterschied zu messen. Für IL25, das ebenfalls zu der Gruppe der Alarmine gezählt wird, konnte keine signifikante Veränderung der Expression nach Stimulation nachgewiesen werden. Die Ergebnisse der RT-qPCR für IL33 mussten aufgrund einer kontaminierten Kontrolle von der Auswertung ausgeschlossen werden. Insgesamt entsprechen die erhaltenen Ergebnisse nicht den Erwartungen, da Alarmine während asthmatischer Entzündungsreaktionen des Atemwegsepithels normalerweise vermehrt exprimiert werden (Hirose et al. 2017; Kuruvilla et al. 2019). Auch für BEAS-2B Zellen wurden in anderen Untersuchungen erhöhte Level von Alarminen während einer Stressreaktion gezeigt (Gao et al. 2021). Aufgrund der Tatsache, dass auch eine LPS-Stimulation keine erhöhte Expression von Alarminen zur Folge hatte, können die Ergebnisse an dieser Stelle nicht sinnvoll interpretiert werden. Alarmine werden im ungestressten Zustand der Zellen nur in sehr geringem Maße exprimiert. Somit ist eine Quantifizierung relativ zu einer unstimulierten Kontrolle durch RT-qPCR problematisch. Denn mit einer geringeren Expression eines Gens steigt die Fehleranfälligkeit der Methode. Die Änderung der Expression muss dann deutlicher sein, um nachgewiesen werden zu können. Möglicherweise wäre die Verwendung größerer Mengen an LPS bzw. EVs bei einer Wiederholung des Versuches sinnvoll, um stärkere Reaktionen hervorzurufen, die zuverlässiger mittels RT-qPCR

erfasst werden können. Dies gilt insbesondere für die Expressionsanalyse von IL25, die eine große Schwankungsbreite der erhaltenen Ct-Werte zwischen 32 und 40 ergab. Durch verbesserte PCR-Bedingungen (u.a. Verwendung alternativer Primer) könnte diese Untersuchung ggf. weiter optimiert werden.

Nach Stimulation durch LPS und asthmatische EVs ergab sich eine verminderte Expression von MUC5AC gegenüber einer Kontrolle. Auch zwischen dem Expressionslevel nach Stimulation durch gesunde bzw. asthmatische EVs war ein signifikanter Unterschied festzustellen. Im Gegensatz zu den hier erhaltenen Ergebnissen konstatieren Tan et al. (2019) für einen eosinophilen und neutrophilen Asthma-Phänotyp erhöhte Expressionslevel von MUC5AC (Tan et al. 2019). Die Diskrepanz der Ergebnisse könnte möglicherweise darauf zurückgeführt werden, dass keiner der vorliegenden Spender von PBEZ einen solchen Asthma-Phänotyp hatte. Es sollte jedoch insbesondere auch festgehalten werden, dass Tan et al. ein Experimentssystem mit Mäusen verwendeten, wodurch die Ergebnisse ggf. nicht direkt vergleichbar sind. Zudem sind BEAS-2B Zellen zwar Epithelzellen, jedoch differenzieren sie in dem verwendeten Kultursystem nicht weiter. Das fehlende Vorliegen von schleimproduzierenden Becherzellen könnte ein Grund dafür sein, dass MUC5AC nicht wie erwartet anstieg.

PYCARD diene als Marker für die Bildung von Inflammasomen (Martinon et al. 2002; Rathinam et al. 2012; Nambayan et al. 2019). Sie werden nach Aktivierung von PAMPs und DAMPs von Zellen gebildet und gehen mit einer Aktivierung von Caspase 1 einher (Man und Kanneganti 2015). PYCARD wird auch von BEAS-2B Zellen exprimiert und wurde in anderen Studien bereits als Aktivierungsmarker derselben verwendet (Liu et al. 2021). Im Rahmen der RT-qPCR wurde jedoch festgestellt, dass PYCARD nach Stimulation durch LPS bzw. asthmatische EVs in BEAS-2B Zellen vermindert exprimiert wurde. Demnach bestand kein Hinweis auf vermehrte pyroptotische Prozesse nach Stimulation durch LPS oder EVs. Auch hier entsprechen die Ergebnisse nicht denen von Tan et al., die eine vermehrte Expression von PYCARD in verschiedenen Subtypen asthmatisch induzierter Atemwegsentzündungen feststellten. Auch hier könnte der Unterschied auf die Anwendung eines Experimentensystems mit Mäusen zurückzuführen sein.

TJs bestehen aus einer heterogenen Gruppe an Proteinen, die in ihrer Summe für die Barrierefunktion des bronchialen Atemwegsepithels verantwortlich sind (Loxham und Davies 2017; Gon und Hashimoto 2018). Im Rahmen einer asthmatischen Atemwegsentzündung werden in Abhängigkeit des Asthma-Endotypen Expressionslevel verschiedener Gene hoch- oder runterreguliert, wodurch es zu einer Beeinträchtigung der Barrierefunktion kommen kann (Hellings und Steelant 2020). Um die Heterogenität

von TJs zu berücksichtigen, wurden fünf verschiedene Gene (ZO1, OCLN, CLDN1, CLDN4 und TJP1) analysiert, die für verschiedene Proteine der TJs kodieren. Für all diese Gene ließ sich eine signifikant verminderte Expression nach Stimulation durch asthmatische EVs gegenüber einer Kontrolle bzw. einer Stimulation durch gesunde EVs messen. Diese Ergebnisse decken sich mit anderen Studien, die ebenfalls eine Herunterregulation von TJ-Genen während einer asthmatischen Entzündungsreaktion zeigten (Feldman et al. 2005; Fanning und Anderson 2009). Eine Hochregulation von CLDN4 im Rahmen einer neutrophilen Atemwegsentzündung, die Tan et al. in ihrer Studie feststellten, konnte hier nicht beobachtet werden. Dagegen ergab sich nach LPS-Stimulation eine erhöhte Expression von CLDN1, was laut Lv et al. während des Prozesses der EMT in BEAS-2B auftreten kann (Lv et al. 2017). Insgesamt sind die beobachteten Ergebnisse mit einer gestörten Barrierefunktion und einer erhöhten Durchlässigkeit des Epithels nach Stimulation durch asthmatische EVs vereinbar, was wiederum ein typisches Zeichen einer asthmatischen Atemwegsentzündung ist (Hellings und Steelant 2020).

E-Cad und Vim wurden hier analysiert, um den Epithelzell-Charakter von BEAS-2B Zellen einzuschätzen und um potentielle Veränderungen infolge von Prozessen der EMT zu erfassen. E-Cad ist Teil der AJs und wird von Epithelzellen exprimiert, wohingegen Vim von Mesenchymzellen exprimiert wird (Meigs et al. 2002; Kuruvilla et al. 2019). Auch BEAS-2B Zellen exprimieren E-Cad und Vim (Si und Zhang 2021). Im Rahmen einer EMT ist eine verminderte Expression von E-Cad und eine steigende Expression von Vim zu erwarten (Ijaz et al. 2014). Die hier durchgeführte RT-qPCR ergab keine veränderten Expressionslevel von E-Cad. Für Vim wurden entgegen den Erwartungen verminderte Expressionslevel nach Stimulation durch asthmatische EVs gegenüber der Kontrolle bzw. einer Stimulation durch gesunde EVs gemessen. Eine EMT schien somit nicht durch asthmatische EVs ausgelöst worden zu sein. Neben der relativen Quantifizierung der beiden Gene wurden auch die absoluten Ct-Werte der beiden Gene verglichen. Während die RT-qPCR für Vim Ct-Werte zwischen 12,26 und 14,16 ergab, ließen sich für E-Cad Ct-Werte zwischen 34,08 und 42,80 nachweisen. Dies spricht für eine sehr hohe Expression von Vim neben einer extrem niedrigen Expression von E-Cad in BEAS-2B Zellen. Die Messungen für E-Cad sollten ggf. unter Verwendung eines alternativen Primers wiederholt werden. Hohe Ct-Werte können zurückzuführen sein auf eine unzureichende Primerqualität einhergehend mit reduzierter Bildung von PCR-Produkten. Sollten sich diese Ergebnisse wiederholt in ähnlicher Weise darstellen, entspräche dies aufgrund der hohen Vim- und niedrigen E-Cad-Expression am ehesten einem mesenchymalen Phänotyp von BEAS-2B Zellen. Ihre Verwendung als Zelllinie zur

in vitro-Simulation bronchialer Atemwegsepithelien müsste dann kritisch hinterfragt werden.

Insgesamt ergaben besonders die Gene der TJs ein einheitliches Bild, indem alle nach Stimulation durch asthmatische EVs vermindert exprimiert waren. Für die ausgewählten epithelialen Entzündungsmarker TSLP, IL25, IL8, NOS2, MUC5AC und PYCARD ließen sich dagegen keine erhöhten bzw. teilweise sogar verminderte Expressionslevel nach Stimulation durch asthmatische EVs feststellen. Für jeden Stimulationsansatz wurde hier theoretisch eine absolute Anzahl von 3×10^7 EVs auf 80.000 Zellen verwendet. Möglicherweise war die Stressinduktion durch asthmatische EVs nicht intensiv genug, um eine gesteigerte Expression der Entzündungsmarker auszulösen. In zukünftigen Analysen könnte ein größeres Verhältnis von EVs zu Zellen sinnvoll sein. Zudem wäre es auch empfehlenswert, vergleichende Untersuchungen mit unterschiedlich vielen EVs durchzuführen, um so eine Aussage über eine dosisabhängige Wirkung von EVs treffen zu können. Alternativ könnte es auch hilfreich sein, ein *in vitro*-Modell eines differenzierten Atemwegsepithels als experimentelles System zu verwenden. Hierzu könnte die Kultur von BEAS-2B Zellen oder PBEZ in ALI-Kulturen geeignet sein. Dieses Kultursystem erlaubt Epithelzellen in die unterschiedlichen Zelltypen von Atemwegsepithel zu differenzieren, indem die physiologische Situation mit Luft auf der apikalen und Nährstoffversorgung auf der basalen Seite simuliert wird. Es ist denkbar, dass ein differenziertes Atemwegsepithel auch differenzierter auf übermittelte Signale asthmatischer EVs reagieren kann. Somit wäre die Expression von epithelialen Entzündungsmarkern möglicherweise besser beurteilbar. Andererseits sollte auch beachtet werden, dass die Produktion der genannten Entzündungsmarker teilweise der Attraktion von Immunzellen und Regulation einer Entzündungsreaktion im Gewebe dient. Allerdings wurden für die beschriebenen Experimente nicht weiter differenzierte BEAS-2B Zellen ohne jeglichen Kontakt zu anderen Zelltypen als *in vitro*-Modell verwendet. Es könnte sein, dass eine Expressionssteigerung entsprechender Gene zumindest teilweise auf einer bilateralen Interaktion von Epithel- und Immunzellen basiert. Falls möglich wäre die Verwendung eines *in vivo*-Experimentensystems sinnvoll, um die Art der ausgelösten Stressreaktion zuverlässiger beurteilen zu können.

Die Streuung der RQs nach RT-qPCR asthmatischer EV-Stimulationsansätze war nahezu durchweg kleiner als bei gesunden EV-Stimulationsansätzen. Dies erscheint überraschend, da die EV-Proben von verschiedenen Spendern stammten und im Vorfeld keine Charakterisierung des asthmatischen Endotyps erfolgt war. Es ist möglich, dass zufälligerweise alle asthmatischen Spender den gleichen Asthma-Endotyp hatten und daher ähnliche Reaktionen in BEAS-2B Zellen hervorriefen. Für zukünftige Untersuchungen wäre es interessant die Endotypen der asthmatischen Spender in

Erfahrung zu bringen, um zu untersuchen, ob bestimmte Endotypen mit unterschiedlichen Stressreaktionen in gesunden Epithelzellen korreliert werden können. Auch die Auswahl der experimentellen Readouts könnte dann spezifischer angepasst werden. Als mögliche Erklärung dafür, dass gesunde EVs zu einer größeren Streuung der Ergebnisse führten, lässt sich anführen, dass die Bezeichnung gesunde EVs vor allem darauf bezogen ist, dass sie von nicht-asthmatischen Spenderzellen stammten. Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass auch bei „gesunden“ Spendern pulmonale (oder andere) Erkrankungen vorlagen, die über EVs vermittelt teilweise mit leichten Stressreaktionen von BEAS-2B Zellen einhergingen. Andererseits ist es auch denkbar, dass allein der Kontakt mit biologischem Material in BEAS-2B Zellen zu einer Stressreaktion führt.

Abschließend lässt sich festhalten, dass sich für viele der ausgewählten Gene bzw. Proteine signifikant veränderte Ergebnisse nach Stimulation durch asthmatische EVs gegenüber einer Kontrolle ergaben. Dagegen führte eine Stimulation durch gesunde EVs für keines der ausgewählten Gene zu einer veränderten Genexpression. Somit konnte die zu Beginn aufgestellte Hypothese, dass asthmatische EVs als Signaltransduktoren eine Stressreaktion in gesunden Epithelzellen hervorrufen, bestätigt werden. Nun stellt sich die Frage inwiefern die Ergebnisse als Hinweis darauf gedeutet werden können, dass EVs und ggf. assoziierte Proteine bzw. weitere biologisch aktive Moleküle durch Signaltransduktion zur Pathogenese von Asthma bronchiale beitragen. Durch asthmatische EV-Proben konnte zwar eine Stressreaktion in BEAS-2B Zellen hervorgerufen werden, jedoch entsprachen nicht alle Ergebnisse den im Rahmen einer asthmatischen Entzündung erwarteten Veränderungen. In dieser Arbeit wurden nur die konzentrierten EV-Proben zur Stimulation von Zellen verwendet. In diesem Punkt weicht das Vorgehen von den MISEV Leitlinien von 2018 ab, in denen empfohlen wird neben EV-Proben auch die jeweiligen nicht-EV-Proben und die ursprüngliche Probe mit EVs und nicht-EV-Bestandteilen für funktionelle Untersuchungen zu analysieren. Dabei soll herausgefunden werden, inwiefern auch nicht-EV-assoziierte Proteine und andere lösliche Bestandteile einer Probe zur Übermittlung von Entzündungssignalen beitragen. Da für diese Arbeit die Funktion von EVs selbst im Vordergrund stand, wurde von der Analyse von nicht-EV-Proben abgesehen. Vor dem Hintergrund der erhaltenen Ergebnisse wäre es jedoch interessant, ob auch die korrespondierenden Proben ohne EVs eine Expressionsveränderung der jeweiligen Entzündungsmarker auslösen. Möglicherweise bzw. sogar sehr wahrscheinlich ist es auch eine Kombination aus EVs und nicht-EV-Bestandteilen einer Probe, die entscheidend ist für das Auslösen einer umfassenden Entzündungsreaktion. Falls möglich wäre neben der Verwendung einer nicht-EV-Probe auch eine Stimulation durch den ursprünglichen Zellkulturüberstand

sinnvoll, in dem EVs und andere lösliche bioaktive Bestandteile wie Proteine enthalten sind. Andererseits könnte es sein, dass auch basale EVs bzw. gerade eine Kombination aus apikalen und basalen EVs zur Auslösung einer vollwertigen Entzündungsreaktion nötig sind. Basale EVs werden in das basale Kompartiment und damit in räumliche Nähe zu umliegendem Gewebe und anderen Zellen wie Immunzellen abgegeben. Somit wäre es denkbar, dass gerade basale EVs in Empfängerzellen zu einer gesteigerten Expression von Entzündungsmarkern wie Zytokinen führen, während apikale EVs, die in das Lumen sezerniert werden, primär der Regulation von TJs dienen.

Abschließend lässt sich festhalten, dass die in dieser Arbeit beschriebenen Ergebnisse eine Bedeutung von EVs für der Pathogenese von Asthma nahelegen. Eine Fortführung und Ausweitung der hier beschriebenen Experimente erscheint als vielversprechender Ansatz, um in Zukunft ein tieferes Verständnis der vielfältigen und komplexen Pathomechanismen von Asthma bronchiale zu erlangen.

5 Zusammenfassung

Die zentrale Fragestellung der vorliegenden Arbeit bestand darin zu untersuchen, ob von Zellen sezernierte extrazelluläre Vesikel (EVs) eine Funktion in der interzellulären Kommunikation übernehmen und so zur Entstehung und Ausbreitung entzündlicher Prozesse in den Atemwegen bei Asthma bronchiale beitragen. Die Untersuchungen wurden *in vitro* mittels Zellen der humanen bronchialen Epithelzelllinie BEAS-2B durchgeführt. Es wurden EV-Proben verwendet, die aus Überständen von *Air-liquid-interface*-Kulturen primärer, bronchialer Epithelzellen von gesunden bzw. asthmatischen Spendern gewonnen wurden. Zur Isolation der EVs wurde eine Kombination aus Ultrafiltration und Größenausschlusschromatographie eingesetzt. Aus den Ergebnissen von Voruntersuchungen ging hervor, dass diese Methode gut geeignet ist, um EVs aus einer Probe zu konzentrieren und dabei ihre morphologischen sowie funktionellen Eigenschaften zu erhalten.

Im Rahmen der Arbeit sollte zunächst die Hypothese überprüft werden, dass EVs durch epitheliale Empfängerzellen aufgenommen werden. Hierzu wurden EVs durch verschiedene Fluoreszenzfarbstoffe markiert. Von den getesteten Farbstoffen stellte sich die Anfärbung mit Carboxyfluorescein-Succinimidyl-Ester (CFSE) als die beste Variante der Fluoreszenzmarkierung für apikal und basal freigesetzte EVs von primären humanen bronchialen Epithelzellen heraus. Im Folgenden wurde die Aufnahme von CFSE-markierten apikalen EVs durch Empfängerzellen konfokalmikroskopisch analysiert. Dabei zeigte sich, dass diese EVs nach sechs Stunden zwar an Zellen gebunden vorlagen, sie schienen jedoch nicht durch Empfängerzellen aufgenommen worden zu sein.

Des Weiteren wurde die Hypothese getestet, dass apikale EVs, die von Zellen asthmatischer Spender stammen, im Gegensatz zu EVs gesunder Donoren eine proinflammatorische Reaktion in gesunden Empfängerzellen auslösen. Hierzu wurden BEAS-2B Zellen für 24 Stunden durch EVs aus bronchialen Epithelzellen gesunder beziehungsweise asthmatischer Spender stimuliert. Die Reaktion der Zellen wurde durch quantitative-Polymerase-Ketten-Reaktion (RT-qPCR) zum Nachweis der Expression verschiedener Gene, Enzym-gekoppeltem Immunadsorptionstest (ELISA) für Interleukin 8 und indirekte Stickstoffmonoxid-Quantifizierung nach Griess analysiert. Dabei wurden die Ergebnisse nach Stimulation durch EVs jeweils den Ergebnissen einer unstimulierten Negativkontrolle und einer durch Lipopolysaccharid stimulierten Probe gegenübergestellt. Für alle ausgewählten Gene der Tight-Junction-Proteine zeigten sich gegenüber der Negativkontrolle signifikant verminderte Expressionslevel nach Stimulation durch EVs asthmatischer Spender. Dies kann als Ausdruck einer gestörten Barrierefunktion und einer erhöhten Durchlässigkeit des Epithels im Rahmen einer

asthmatischen Atemwegsentzündung gedeutet werden. Für die ausgewählten epithelialen Entzündungsmarker sowie das PYD- und CARD-Domäne-enthaltende-Gen wurden verminderte oder unveränderte Expressionslevel nach Stimulation durch EVs asthmatischen Ursprungs beobachtet. Im Gegensatz zu EVs von Asthma-Patienten konnten EVs gesunder Spender für keines der ausgewählten Gene eine signifikante Änderung der Genexpression auslösen. Allein die Translation von Interleukin 8 war auch nach Stimulation durch EVs gesunder Spender vermindert.

Zusammenfassend weisen die erhaltenen Ergebnisse auf eine mögliche Beteiligung von EVs an der interzellulären Signalübermittlung bei Asthma hin. Sie scheinen zur Entstehung und Ausbreitung einer asthmatischen Entzündungsreaktion beizutragen. Somit könnte ihre weitere funktionelle Analyse ein bedeutender Aspekt sein, um ein tieferes Verständnis zugrundeliegender Pathomechanismen von Asthma bronchiale zu erlangen. Perspektivisch könnte es aufgrund der Heterogenität von Pathomechanismen von Asthma bronchiale sinnvoll sein, Endotypen von asthmatischen Spendern spezifisch zu analysieren, um Ergebnisse funktioneller Untersuchungen von EVs besser einordnen zu können. Weitere Untersuchungen anhand anderer experimenteller Systeme und ggf. auch anhand anderer Empfängerzellen sind notwendig, um die Reproduzierbarkeit der erhaltenen Ergebnisse zu prüfen. Außerdem sollten neben EVs auch die zugehörigen EV-freien Proben im Hinblick auf eine Aktivierung von Zielzellen analysiert werden. Möglicherweise könnte eine synergistische Kombination von EVs und löslichen Bestandteilen wie Proteinen in den Überständen der Epithelzellkulturen erforderlich sein, um das volle Potential der Signalübermittlung durch EVs auszuschöpfen.

Die Analyse der Funktionen von EVs für pathologische Prozesse bei Asthma bronchiale birgt großes Potential zugrundeliegende Pathomechanismen zu verstehen und beitragende Akteure des Entzündungsgeschehens zu identifizieren. Sollten sich EVs als wichtige Faktoren der Signalübermittlung bei Asthma erweisen, könnte eine Hemmung entsprechender Funktionen als innovativer Ansatz zur Entwicklung individualisierter Therapiekonzepte dienen. Daneben könnten EVs in Zukunft auch in der Diagnostik zur Identifikation von Asthma-Endotypen von Bedeutung sein, da sie in Abhängigkeit des Zustandes ihrer Ursprungszelle verschiedene Signalmoleküle transportieren. Darüber hinaus stellen EVs einen vielversprechenden Ansatz zur zielgerichteten Verteilung von Medikamenten dar. Sicherlich werden weitere methodische Verbesserungen entscheidend dazu beitragen das noch junge Forschungsfeld der EVs weiterhin und tiefergehend zu explorieren.

6 Summary

The major aim of the present study referred to the question, whether extracellular vesicles (EVs), that are released by cells, play a role in intercellular communication mechanisms and thereby contribute to the emergence and propagation of inflammatory processes in the airways during asthma. The respective analyses were conducted *in vitro* using cells of the human bronchial epithelial cell line BEAS-2B. EVs were obtained from cell culture supernatant of healthy and asthmatic primary bronchial epithelial cells cultured under air-liquid-interface conditions. EVs were concentrated by a combination of ultrafiltration and size exclusion chromatography. The results of preliminary experiments suggested that this method was well suited to concentrate EVs in a sample without compromising their morphological and functional properties.

Within the scope of this study, initially the hypothesis should be examined, that EVs are taken up by recipient epithelial cells. Therefore, EVs were labelled by different fluorescence dyes. Of the tested dyes carboxyfluorescein-succinimidyl-ester (CFSE) proved to be the most promising labeling approach for extracellular vesicles originating from the apical and basal compartment of primary bronchial epithelial cells. Thereafter the uptake of CFSE-labelled apical EVs was investigated by confocal microscopy. It was shown that EVs seemed to become attached to the cell surface rather than having been incorporated by recipient cells after six hours of incubation time.

The second hypothesis to be tested in this study implied, that apical EVs from asthmatic cells in contrast to EVs from healthy cells induce an inflammatory response in healthy recipient cells. For this purpose, BEAS-2B cells were incubated with EVs of healthy or asthmatic origin for 24 hours. The extend of a potential inflammatory response of the recipient cells was examined by real-time-quantitative-polymerase-chain-reaction (RT-qPCR) to detect the expression of a variety of related genes, enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for Interleukin 8 and by indirect quantification of nitric oxide according to Griess. In each case the results after stimulation by EVs were compared to unstimulated negative and lipopolysaccharide-stimulated positive control samples. For all selected genes of tight-junction-proteins a significant decrease of expression as compared to the negative control was detected after stimulation by EVs from asthmatic patients. This might hint to an impaired barrier function and an increased epithelial permeability during asthmatic airway inflammation. For the selected epithelial inflammatory markers as for the PYD and CARD domain containing gene a decreased or unaltered expression was detected after stimulation by EVs of asthmatic origin. In contrast to EVs from asthmatic patients EVs from healthy donors did not cause a significant change in the expression of any of the selected genes. Only the translation of Interleukin 8 was decreased after stimulation by EVs from healthy donors.

In summary, the results suggest a potential role of EVs in intercellular signaling processes in asthma. They seem to contribute to emergence and propagation of asthmatic inflammatory processes. Hence further examination of extracellular vesicle function might substantially add to our understanding of underlying pathomechanisms of asthma. Prospectively it might be helpful to specifically analyze EVs from asthmatic patients affected by different endotypes of the disease to evaluate results on a more substantiated basis as heterogenic and multiple pathomechanisms possibly induce different forms of inflammatory responses. Further experiments with other experimental systems and perhaps other recipient cells are necessary to verify the reproducibility of obtained results suggesting a signal transmitting function of EVs in asthma. Furthermore, associated non-EV samples should be analyzed in parallel to identify their functional contribution to signal transmission processes. Conceivably a synergistic interaction of EVs and soluble components like proteins might be crucial to exploit the full signal transmitting potential of EVs.

A more profound knowledge of EV function may certainly contribute to further improve our understanding of pathomechanisms and to identify players involved in asthma development. Should EVs be proven to significantly contribute to asthmatic inflammatory processes, their inhibition might represent a novel approach for individualized concepts of therapy. In addition, EVs might also serve as tools for a better diagnosis of different asthma endotypes, since the information they carry depends largely on the status of their originating cell. Furthermore, there are attempts to instrumentalize EVs as a promising system for drug delivery into the human body. Certainly, further improvement of methods will have a major impact on advances on the still emerging but promising field of EV research.

7 Literaturverzeichnis

Abels, Erik R.; Breakefield, Xandra O. (2016): Introduction to Extracellular Vesicles: Biogenesis, RNA Cargo Selection, Content, Release, and Uptake. In: *Cellular and molecular neurobiology* 36 (3), S. 301–312. DOI: 10.1007/s10571-016-0366-z.

Akdis, Cezmi A. (2021): Does the epithelial barrier hypothesis explain the increase in allergy, autoimmunity and other chronic conditions? In: *Nature reviews. Immunology* 21 (11), S. 739–751. DOI: 10.1038/s41577-021-00538-7.

Akers, Johnny C.; Gonda, David; Kim, Ryan; Carter, Bob S.; Chen, Clark C. (2013): Biogenesis of extracellular vesicles (EV): exosomes, microvesicles, retrovirus-like vesicles, and apoptotic bodies. In: *Journal of neuro-oncology* 113 (1), S. 1–11. DOI: 10.1007/s11060-013-1084-8.

Alashkar Alhamwe, Bilal; Miethe, Sarah; Pogge von Strandmann, Elke; Potaczek, Daniel P.; Garn, Holger (2020): Epigenetic Regulation of Airway Epithelium Immune Functions in Asthma. In: *Frontiers in immunology* (11), Artikel 1747, S. 1–8. DOI: 10.3389/fimmu.2020.01747.

Alashkar Alhamwe, Bilal; Potaczek, Daniel P.; Miethe, Sarah; Alhamdan, Fahd; Hintz, Lukas; Magomedov, Arslan; Garn, Holger (2021): Extracellular Vesicles and Asthma- More Than Just a Co-Existence. In: *International journal of molecular sciences* 22 (9), Artikel 4984, S. 1–20. DOI: 10.3390/ijms22094984.

Andreu, Zoraida; Yáñez-Mó, María (2014): Tetraspanins in extracellular vesicle formation and function. In: *Frontiers in immunology* 5, S. 442. DOI: 10.3389/fimmu.2014.00442.

Aull, Brian (2016): Geiger-Mode Avalanche Photodiode Arrays Integrated to All-Digital CMOS Circuits. In: *Sensors (Basel, Switzerland)* 16 (4), Artikel 495, S. 1–14. DOI: 10.3390/s16040495.

Baggiolini, M.; Clark-Lewis, I. (1992): Interleukin-8, a chemotactic and inflammatory cytokine. In: *FEBS letters* 307 (1), S. 97–101. DOI: 10.1016/0014-5793(92)80909-z.

Baldassi, Domizia; Gabold, Bettina; Merkel, Olivia (2021): Air-liquid interface cultures of the healthy and diseased human respiratory tract: promises, challenges and future directions. In: *Advanced nanobiomed research* 1 (6), Artikel 2000111, S. 1–19. DOI: 10.1002/anbr.202000111.

- Banno, Asoka; Reddy, Aravind T.; Lakshmi, Sowmya P.; Reddy, Raju C. (2020): Bidirectional interaction of airway epithelial remodeling and inflammation in asthma. In: *Clinical science* 134 (9), S. 1063–1079. DOI: 10.1042/CS20191309.
- Bartemes, Kathleen R.; Kita, Hirohito (2012): Dynamic role of epithelium-derived cytokines in asthma. In: *Clinical immunology* 143 (3), S. 222–235. DOI: 10.1016/j.clim.2012.03.001.
- Bayguinov, Peter O.; Oakley, Dennis M.; Shih, Chien-Cheng; Geanon, Daniel J.; Joens, Matthew S.; Fitzpatrick, James A. J. (2018): Modern Laser Scanning Confocal Microscopy. In: *Current protocols in cytometry* 85 (1), Artikel e39, 1-17. DOI: 10.1002/cpcy.39.
- Bazzan, Erica; Tinè, Mariaenrica; Casara, Alvise; Biondini, Davide; Semenzato, Umberto; Cocconcelli, Elisabetta et al. (2021): Critical Review of the Evolution of Extracellular Vesicles' Knowledge: From 1946 to Today. In: *International journal of molecular sciences* 22 (12), Artikel 6417, S. 1–13. DOI: 10.3390/ijms22126417.
- Benedikter, Birke J.; Bouwman, Freek G.; Vajen, Tanja; Heinzmann, Alexandra C. A.; Grauls, Gert; Mariman, Edwin C. et al. (2017): Ultrafiltration combined with size exclusion chromatography efficiently isolates extracellular vesicles from cell culture media for compositional and functional studies. In: *Scientific reports* 7 (1), Artikel 15297, S. 1–13. DOI: 10.1038/s41598-017-15717-7.
- Bertheloot, Damien; Latz, Eicke; Franklin, Bernardo S. (2021): Necroptosis, pyroptosis and apoptosis: an intricate game of cell death. In: *Cellular & molecular immunology* 18 (5), S. 1106–1121. DOI: 10.1038/s41423-020-00630-3.
- Böing, Anita N.; van der Pol, Edwin; Grootemaat, Anita E.; Coumans, Frank A. W.; Sturk, Auguste; Nieuwland, Rienk (2014): Single-step isolation of extracellular vesicles by size-exclusion chromatography. In: *Journal of extracellular vesicles* 3. DOI: 10.3402/jev.v3.23430.
- Bousquet, Khaltaev (Hg.) (2007): Global surveillance, prevention and control of chronic respiratory diseases. A comprehensive approach. Weltgesundheitsorganisation. Geneva: WHO. Online verfügbar unter <https://www.who.int/publications/i/item/global-surveillance-prevention-and-control-of-chronic-respiratory-diseases>, zuletzt geprüft am 10.06.2021.
- Buccitelli, Christopher; Selbach, Matthias (2020): mRNAs, proteins and the emerging principles of gene expression control. In: *Nature reviews. Genetics* 21 (10), S. 630–644. DOI: 10.1038/s41576-020-0258-4.

CDC (2013): Asthma Facts: CDC's National Asthma Control Program Grantees. Online verfügbar unter https://www.cdc.gov/asthma/pdfs/Asthma_Facts_Program_Grantees.pdf, zuletzt geprüft am 10.06.2021.

Chen, Shuai; Schoen, Jennifer (2019): Air-liquid interface cell culture: From airway epithelium to the female reproductive tract. In: *Reproduction in domestic animals* 54 (S3), S. 38–45. DOI: 10.1111/rda.13481.

Cheng, Lesley; Hill, Andrew F. (2022): Therapeutically harnessing extracellular vesicles. In: *Nature reviews. Drug discovery* 21 (5), S. 379–399. DOI: 10.1038/s41573-022-00410-w.

Chuo, Steven Ting-Yu; Chien, Jasper Che-Yung; Lai, Charles Pin-Kuang (2018): Imaging extracellular vesicles: current and emerging methods. In: *Journal of biomedical science* 25 (1), Artikel 91, S. 1–10. DOI: 10.1186/s12929-018-0494-5.

Colombo, Marina; Raposo, Graça; Théry, Clotilde (2014): Biogenesis, secretion, and intercellular interactions of exosomes and other extracellular vesicles. In: *Annual review of cell and developmental biology* 30, S. 255–289. DOI: 10.1146/annurev-cellbio-101512-122326.

Cozens, Daniel; Sutherland, Erin; Marchesi, Francesco; Taylor, Geraldine; Berry, Catherine C.; Davies, Robert L. (2018): Temporal differentiation of bovine airway epithelial cells grown at an air-liquid interface. In: *Scientific reports* 8 (1), Artikel 14893, S. 1–15. DOI: 10.1038/s41598-018-33180-w.

Derichs, Nico; Jin, Byung-Ju; Song, Yuanlin; Finkbeiner, Walter E.; Verkman, A. S. (2011): Hyperviscous airway periciliary and mucous liquid layers in cystic fibrosis measured by confocal fluorescence photobleaching. In: *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 25 (7), S. 2325–2332. DOI: 10.1096/fj.10-179549.

Ender, Fanny; Zamzow, Piet; Bubnoff, Nikolas von; Gieseler, Frank (2019): Detection and Quantification of Extracellular Vesicles via FACS: Membrane Labeling Matters! In: *International journal of molecular sciences* 21 (1), Artikel 291, S. 1–13. DOI: 10.3390/ijms21010291.

Erjefält, Jonas Sten (2010): The airway epithelium as regulator of inflammation patterns in asthma. In: *The clinical respiratory journal* 4, S. 9–14. DOI: 10.1111/j.1752-699X.2010.00191.x.

Fahy, John V. (2015): Type 2 inflammation - present in most absent in many. In: *Nature reviews. Immunology. Perspectives* (15), S. 57–65. DOI: 10.1038/nri3786.

- Fanning, Alan S.; Anderson, James M. (2009): Zonula occludens-1 and -2 are cytosolic scaffolds that regulate the assembly of cellular junctions. In: *Annals of the New York Academy of Sciences* 1165 (1), S. 113–120. DOI: 10.1111/j.1749-6632.2009.04440.x.
- Feldman, Gemma J.; Mullin, James M.; Ryan, Michael P. (2005): Occludin: structure, function and regulation. In: *Advanced drug delivery reviews* 57 (6), S. 883–917. DOI: 10.1016/j.addr.2005.01.009.
- Fitzner, Dirk; Schnaars, Mareike; van Rossum, Denise; Krishnamoorthy, Gurumoorthy; Dibaj, Payam; Bakhti, Mostafa et al. (2011): Selective transfer of exosomes from oligodendrocytes to microglia by macropinocytosis. In: *Journal of cell science* 124 (Pt 3), S. 447–458. DOI: 10.1242/jcs.074088.
- Fujisawa, Takao; Kato, Yoshiko; Atsuta, Jun; Terada, Akihiko; Iguchi, Kosei; Kamiya, Hitoshi et al. (2000): Chemokine production by the BEAS-2B human bronchial epithelial cells: Differential regulation of eotaxin, IL-8, and RANTES by TH2- and TH1-derived cytokines. In: *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 105 (1), S. 126–133. DOI: 10.1016/s0091-6749(00)90187-8.
- Gao, Wei; Gong, Jiuyu; Mu, Mi; Zhu, Yujin; Wang, Wenjuan; Chen, Wen et al. (2021): The Pathogenesis of Eosinophilic Asthma: A Positive Feedback Mechanism That Promotes Th2 Immune Response via Filaggrin Deficiency. In: *Frontiers in immunology* 12, Artikel 672312, S. 1–17. DOI: 10.3389/fimmu.2021.672312.
- Ghio, Andrew J.; Dailey, Lisa A.; Soukup, Joleen M.; Stonehuerner, Jacqueline; Richards, Judy H.; Devlin, Robert B. (2013): Growth of human bronchial epithelial cells at an air-liquid interface alters the response to particle exposure. In: *Particle and fibre toxicology* 10 (25), S. 1–8. DOI: 10.1186/1743-8977-10-25.
- Ghosh, Sudakshina; Erzurum, Serpil C. (2011): Nitric oxide metabolism in asthma pathophysiology. In: *Biochimica et biophysica acta* 1810 (11), S. 1008–1016. DOI: 10.1016/j.bbagen.2011.06.009.
- Giustarini, Daniela; Rossi, Ranieri; Milzani, Aldo; Dalle-Donne, Isabella. (2008): Nitrite and Nitrate Measurement by Griess Reagent in Human Plasma: Evaluation of Interferences and Standardization. In: *Methods in Enzymology* 440, S. 361–380. DOI: 10.1016/S0076-6879(07)00823-3.
- Global Initiative for Asthma (2022): Global Strategy for Asthma Management and Prevention. Online verfügbar unter <https://ginasthma.org/gina-reports/>, zuletzt geprüft am 29.10.2022.
- Gómez-Serrano, María; Ponath, Viviane; Preußner, Christian; Pogge von Strandmann, Elke (2021): Beyond the Extracellular Vesicles: Technical Hurdles, Achieved Goals and

- Current Challenges When Working on Adipose Cells. In: *International journal of molecular sciences* 22 (7), Artikel 3362, S. 1–22. DOI: 10.3390/ijms22073362.
- Gon, Yasuhiro; Hashimoto, Shu (2018): Role of airway epithelial barrier dysfunction in pathogenesis of asthma. In: *Allergology international : official journal of the Japanese Society of Allergology* 67 (1), S. 12–17. DOI: 10.1016/j.alit.2017.08.011.
- Guarnieri, Michael; Balmes, John R. (2014): Outdoor air pollution and asthma. In: *the Lancet* 383 (9928), S. 1581–1592. DOI: 10.1016/S0140-6736(14)60617-6.
- Guerreiro, Eduarda M.; Vestad, Beate; Steffensen, Lilly Alice; Aass, Hans Christian D.; Saeed, Muhammad; Øvstebø, Reidun et al. (2018): Efficient extracellular vesicle isolation by combining cell media modifications, ultrafiltration, and size-exclusion chromatography. In: *PloS one* 13 (9), Artikel e0204276, 1-17. DOI: 10.1371/journal.pone.0204276.
- Guo, F. H.; Comhair, S. A.; Zheng, S.; Dweik, R. A.; Eissa, N. T.; Thomassen, M. J. et al. (2000): Molecular mechanisms of increased nitric oxide (NO) in asthma: evidence for transcriptional and post-translational regulation of NO synthesis. In: *Journal of immunology* 164 (11), S. 5970–5980. DOI: 10.4049/jimmunol.164.11.5970.
- Gurung, Sonam; Perocheau, Dany; Touramanidou, Loukia; Baruteau, Julien (2021): The exosome journey: from biogenesis to uptake and intracellular signalling. In: *Cell communication and signaling : CCS* 19 (1), Artikel 47, S. 1–19. DOI: 10.1186/s12964-021-00730-1.
- Hackett, Tillie-Louise; Singhera, Gurpreet K.; Shaheen, Furquan; Hayden, Patrick; Jackson, George R.; Hegele, Richard G. et al. (2011): Intrinsic phenotypic differences of asthmatic epithelium and its inflammatory responses to respiratory syncytial virus and air pollution. In: *American journal of respiratory cell and molecular biology* 45 (5), S. 1090–1100. DOI: 10.1165/rcmb.2011-0031OC.
- Hammad, Hamida; Lambrecht, Bart N. (2021): The basic immunology of asthma. In: *Cell* 184 (6), S. 1469–1485. DOI: 10.1016/j.cell.2021.02.016.
- Harju, Maijakaisa; Keski-Nisula, Leea; Georgiadis, Leena; Heinonen, Seppo (2016): Parental smoking and cessation during pregnancy and the risk of childhood asthma. In: *BMC public health* 16, Artikel 428, S. 1–7. DOI: 10.1186/s12889-016-3029-6.
- He, J-Q; Sandford, A. J.; Wang, I-M; Stepaniants, S.; Knight, D. A.; Kicic, A. et al. (2008): Selection of housekeeping genes for real-time PCR in atopic human bronchial epithelial cells. In: *The European respiratory journal* 32 (3), S. 755–762. DOI: 10.1183/09031936.00129107.

- Hellings, Peter W.; Steelant, Brecht (2020): Epithelial barriers in allergy and asthma. In: *The Journal of allergy and clinical immunology* 145 (6), S. 1499–1509. DOI: 10.1016/j.jaci.2020.04.010.
- Henderson, Meredith C.; Azorsa, David O. (2012): The genomic and proteomic content of cancer cell-derived exosomes. In: *Frontiers in oncology* 2, Artikel 38, S. 1–9. DOI: 10.3389/fonc.2012.00038.
- Hirose, Koichi; Iwata, Arifumi; Tamachi, Tomohiro; Nakajima, Hiroshi (2017): Allergic airway inflammation: key players beyond the Th2 cell pathway. In: *Immunological reviews* 278 (1), S. 145–161. DOI: 10.1111/imr.12540.
- Hirota, Nobuaki; Martin, James G. (2013): Mechanisms of airway remodeling. In: *Chest* 144 (3), S. 1026–1032. DOI: 10.1378/chest.12-3073.
- Holgate, Stephen T.; Arshad, Hasan S.; Roberts, Graham C.; Howarth, Peter H.; Thurner, Philipp; Davies, Donna E. (2009): A new look at the pathogenesis of asthma. In: *Clinical science* 118 (7), S. 439–450. DOI: 10.1042/CS20090474.
- Holgate, Stephen T.; Wenzel, Sally; Postma, Dirkje S.; Weiss, Scott T.; Renz, Harald; Sly, Peter D. (2015): Asthma. In: *Nature reviews. Disease primers* 1, Artikel 15025, S. 1–22. DOI: 10.1038/nrdp.2015.25.
- Hou, Jing; Wang, Jun; Meng, Jingyi; Zhang, Xiaoting; Niu, Yuanjing; Gao, Jianping et al. (2021): Zanthoxylum bungeanum Seed Oil Attenuates LPS-Induced BEAS-2B Cell Activation and Inflammation by Inhibiting the TLR4/MyD88/NF-κB Signaling Pathway. In: *Evidence-based complementary and alternative medicine* 2021, Artikel 2073296, S. 1–13. DOI: 10.1155/2021/2073296.
- Ijaz, Talha; Pazdrak, Konrad; Kalita, Mridul; Konig, Rolf; Choudhary, Sanjeev; Tian, Bing et al. (2014): Systems biology approaches to understanding Epithelial Mesenchymal Transition (EMT) in mucosal remodeling and signaling in asthma. In: *The World Allergy Organization journal* 7 (1), Artikel 13, S. 1–14. DOI: 10.1186/1939-4551-7-13.
- Invitrogen (2008): Lipophilic Tracers—Dil, DiO, DiD, DiA, and DiR. In: *Molecular Probes*, S. 1–6. Online verfügbar unter <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/D275>, zuletzt geprüft am 25.06.2022.
- Jackson, Daniel J.; Hartert, Tina V.; Martinez, Fernando D.; Weiss, Scott T.; Fahy, John V. (2014): Asthma: NHLBI Workshop on the Primary Prevention of Chronic Lung Diseases. In: *Annals of the American Thoracic Society* 11 (3), 139-45. DOI: 10.1513/AnnalsATS.201312-448LD.

- Jang, Jaewoong; Jung, Yoonju; Kim, Youngeun; Jho, Eek-Hoon; Yoon, Yoosik (2017): LPS-induced inflammatory response is suppressed by Wnt inhibitors, Dickkopf-1 and LGK974. In: *Scientific reports* 7, Artikel 41612, S. 1–12. DOI: 10.1038/srep41612.
- Jartti, Tuomas; Gern, James E. (2017): Role of viral infections in the development and exacerbation of asthma in children. In: *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 140 (4), S. 895–906. DOI: 10.1016/j.jaci.2017.08.003.
- Jung, Kyung Oh; Jo, Hunho; Yu, Jung Ho; Gambhir, Sanjiv Sam; Pratz, Guillem (2018): Development and MPI tracking of novel hypoxia-targeted theranostic exosomes. In: *Biomaterials* 177, S. 139–148. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2018.05.048.
- Kalluri, Raghu; LeBleu, Valerie S. (2020): The biology, function, and biomedical applications of exosomes. In: *Science* 367, Artikel 6478, S. 1–65. DOI: 10.1126/science.aau6977.
- Koczulla, Andreas R.; Vogelmeier, Claus F.; Garn, Holger; Renz, Harald (2017): New concepts in asthma: clinical phenotypes and pathophysiological mechanisms. In: *Drug discovery today* 22 (2), S. 388–396. DOI: 10.1016/j.drudis.2016.11.008.
- Konoshenko, Maria Yu; Lekchnov, Evgeniy A.; Vlassov, Alexander V.; Laktionov, Pavel P. (2018): Isolation of Extracellular Vesicles: General Methodologies and Latest Trends. In: *BioMed research international* 2018, Artikel 8545347, S. 1–27. DOI: 10.1155/2018/8545347.
- Kreimer, Simion; Belov, Arseniy M.; Ghiran, Ionita; Murthy, Shashi K.; Frank, David A.; Ivanov, Alexander R. (2015): Mass-spectrometry-based molecular characterization of extracellular vesicles: lipidomics and proteomics. In: *Journal of proteome research* 14 (6), S. 2367–2384. DOI: 10.1021/pr501279t.
- Kuruvilla, Merin E.; Lee, F. Eun-Hyung; Lee, Gerald B. (2019): Understanding Asthma Phenotypes, Endotypes, and Mechanisms of Disease. In: *Clinical reviews in allergy & immunology* 56 (2), S. 219–233. DOI: 10.1007/s12016-018-8712-1.
- Lamaze, C.; Fujimoto, L. M.; Yin, H. L.; Schmid, S. L. (1997): The actin cytoskeleton is required for receptor-mediated endocytosis in mammalian cells. In: *Journal of Biological Chemistry* 272 (33), S. 20332–20335. DOI: 10.1074/jbc.272.33.20332.
- Laulicht, Freda; Brocato, Jason; Cartularo, Laura; Vaughan, Joshua; Wu, Feng; Kluz, Thomas et al. (2015): Tungsten-induced carcinogenesis in human bronchial epithelial cells. In: *Toxicology and applied pharmacology* 288 (1), S. 33–39. DOI: 10.1016/j.taap.2015.07.003.

- Linares, Romain; Tan, Sisareuth; Gounou, Céline; Arraud, Nicolas; Brisson, Alain R. (2015): High-speed centrifugation induces aggregation of extracellular vesicles. In: *Journal of extracellular vesicles* 4, Artikel 29509, S. 1–8. DOI: 10.3402/jev.v4.29509.
- Liu, Ying; Zhou, Tong; Sun, Luyao; Wang, Haodong; Zhou, Liting (2020): The effect of Notch signal pathway on PM2.5-induced Muc5ac in Beas-2B cells. In: *Ecotoxicology and environmental safety* 203, Artikel 110956. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2020.110956.
- Liu, Yuhan; Zhou, Jiabin; Luo, Yingying; Li, Jinxiao; Shang, Luorui; Zhou, Fangyuan; Yang, Shenglan (2021): Honokiol alleviates LPS-induced acute lung injury by inhibiting NLRP3 inflammasome-mediated pyroptosis via Nrf2 activation in vitro and in vivo. In: *Chinese medicine* 16 (1), Artikel 127. DOI: 10.1186/s13020-021-00541-z.
- Livak, K. J.; Schmittgen, T. D. (2001): Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. In: *Methods* 25 (4), S. 402–408. DOI: 10.1006/meth.2001.1262.
- Lötvall, Jan; Hill, Andrew F.; Hochberg, Fred; Buzás, Edit I.; Di Vizio, Dolores; Gardiner, Christopher et al. (2014): Minimal experimental requirements for definition of extracellular vesicles and their functions: a position statement from the International Society for Extracellular Vesicles. In: *Journal of extracellular vesicles* 3, Artikel 26913, S. 1–7. DOI: 10.3402/jev.v3.26913.
- Loxham, Matthew; Davies, Donna E. (2017): Phenotypic and genetic aspects of epithelial barrier function in asthmatic patients. In: *The Journal of allergy and clinical immunology* 139 (6), S. 1736–1751. DOI: 10.1016/j.jaci.2017.04.005.
- Lu, Lei; Bao, Yuanwu; Khan, Abdullah; Goldstein, Allan M.; Newburg, David S.; Quaroni, Andrea et al. (2008): Hydrocortisone modulates cholera toxin endocytosis by regulating immature enterocyte plasma membrane phospholipids. In: *Gastroenterology* 135 (1), 185-193. DOI: 10.1053/j.gastro.2008.03.038.
- Lv, Jing; Sun, Baohua; Mai, Zhitao; Jiang, Mingming; Du, Junfeng (2017): CLDN-1 promoted the epithelial to migration and mesenchymal transition (EMT) in human bronchial epithelial cells via Notch pathway. In: *Molecular and cellular biochemistry* 432 (1-2), S. 91–98. DOI: 10.1007/s11010-017-3000-6.
- Man, Si Ming; Kanneganti, Thirumala-Devi (2015): Regulation of inflammasome activation. In: *Immunological reviews* 265 (1), S. 6–21. DOI: 10.1111/imr.12296.
- Martinon, Fabio; Burns, Kimberly; Tschopp, Jürg (2002): The Inflammasome. In: *Molecular Cell* 10 (2), S. 417–426. DOI: 10.1016/s1097-2765(02)00599-3.

- Matsushima, Kouji; de Yang; Oppenheim, Joost J. (2022): Interleukin-8: An evolving chemokine. In: *Cytokine* 153, Artikel 155828. DOI: 10.1016/j.cyto.2022.155828.
- Meigs, Thomas E.; Fedor-Chaiken, Mary; Kaplan, Daniel D.; Brackenbury, Robert; Casey, Patrick J. (2002): Galpha12 and Galpha13 negatively regulate the adhesive functions of cadherin. In: *Journal of Biological Chemistry* 277 (27), S. 24594–24600. DOI: 10.1074/jbc.M201984200.
- Midekessa, Getnet; Godakumara, Kasun; Ord, James; Viil, Janeli; Lättেকivi, Freddy; Dissanayake, Keerthie et al. (2020): Zeta Potential of Extracellular Vesicles: Toward Understanding the Attributes that Determine Colloidal Stability. In: *ACS omega* 5 (27), S. 16701–16710. DOI: 10.1021/acsomega.0c01582.
- Miethe, Sarah; Karsonova, Antonina; Karaulov, Alexander; Renz, Harald (2020): Obesity and asthma. In: *The Journal of allergy and clinical immunology* 146 (4), S. 685–693. DOI: 10.1016/j.jaci.2020.08.011.
- Mims, James W. (2015): Asthma: definitions and pathophysiology. In: *International forum of allergy & rhinology* 5 (1), 2-6. DOI: 10.1002/alr.21609.
- Minciacchi, Valentina R.; Freeman, Michael R.; Di Vizio, Dolores (2015): Extracellular vesicles in cancer: exosomes, microvesicles and the emerging role of large oncosomes. In: *Seminars in cell & developmental biology* 40, S. 41–51. DOI: 10.1016/j.semcd.2015.02.010.
- Mitchell, Patrick D.; O'Byrne, Paul M. (2017): Biologics and the lung: TSLP and other epithelial cell-derived cytokines in asthma. In: *Pharmacology & therapeutics* 169, S. 104–112. DOI: 10.1016/j.pharmthera.2016.06.009.
- Moffatt, Miriam F.; Gut, Ivo G.; Demenais, Florence; Strachan, David P.; Bouzigon, Emmanuelle; Heath, Simon et al. (2010): A large-scale, consortium-based genomewide association study of asthma. In: *The New England journal of medicine* 363 (13), S. 1211–1221. DOI: 10.1056/NEJMoa0906312.
- Mohan, Aradhana; Agarwal, Stuti; Clauss, Matthias; Britt, Nicholas S.; Dhillon, Navneet K. (2020): Extracellular vesicles: novel communicators in lung diseases. In: *Respiratory research* 21 (1), Artikel 175, S. 1–21. DOI: 10.1186/s12931-020-01423-y.
- Möller, Andreas; Lobb, Richard J. (2020): The evolving translational potential of small extracellular vesicles in cancer. In: *Nature reviews. Cancer* 20 (12), S. 697–709. DOI: 10.1038/s41568-020-00299-w.
- Monguió-Tortajada, Marta; Gálvez-Montón, Carolina; Bayes-Genis, Antoni; Roura, Santiago; Borràs, Francesc E. (2019): Extracellular vesicle isolation methods: rising

impact of size-exclusion chromatography. In: *Cellular and molecular life sciences* 76 (12), S. 2369–2382. DOI: 10.1007/s00018-019-03071-y.

Morales-Kastresana, Aizea; Telford, Bill; Musich, Thomas A.; McKinnon, Katherine; Clayborne, Cassandra; Braig, Zach et al. (2017): Labeling Extracellular Vesicles for Nanoscale Flow Cytometry. In: *Scientific reports* 7 (1), Artikel 1878, S. 1–10. DOI: 10.1038/s41598-017-01731-2.

Mulcahy, Laura Ann; Pink, Ryan Charles; Carter, David Raul Francisco (2014): Routes and mechanisms of extracellular vesicle uptake. In: *Journal of extracellular vesicles* 3, Artikel 24641, S. 1–15. DOI: 10.3402/jev.v3.24641.

Murdica, Valentina; Giacomini, Elisa; Makieva, Sofia; Zarovni, Natasa; Candiani, Massimo; Salonia, Andrea et al. (2020): In vitro cultured human endometrial cells release extracellular vesicles that can be uptaken by spermatozoa. In: *Scientific reports* 10 (1), Artikel 8856, S. 1–13. DOI: 10.1038/s41598-020-65517-9.

Nambayan, Reinard Jeffrey T.; Sandin, Suzanne I.; Quint, David A.; Satyadi, David M.; Alba, Eva de (2019): The inflammasome adapter ASC assembles into filaments with integral participation of its two Death Domains, PYD and CARD. In: *The Journal of biological chemistry* 294 (2), S. 439–452. DOI: 10.1074/jbc.RA118.004407.

Nordin, Joel Z.; Lee, Yi; Vader, Pieter; Mäger, Imre; Johansson, Henrik J.; Heusermann, Wolf et al. (2015): Ultrafiltration with size-exclusion liquid chromatography for high yield isolation of extracellular vesicles preserving intact biophysical and functional properties. In: *Nanomedicine : nanotechnology, biology, and medicine* 11 (4), S. 879–883. DOI: 10.1016/j.nano.2015.01.003.

Papi, Alberto; Brightling, Christopher; Pedersen, Søren E.; Reddel, Helen K. (2018): Asthma. In: *the Lancet* 391 (10122), S. 783–800. DOI: 10.1016/S0140-6736(17)33311-1.

Potaczek, Daniel P.; Miethe, Sarah; Schindler, Viktoria; Alhamdan, Fahd; Garn, Holger (2020): Role of airway epithelial cells in the development of different asthma phenotypes. In: *Cellular signalling* 69, Artikel 109523, S. 1–10. DOI: 10.1016/j.cellsig.2019.109523.

Prodanovic, Danica; Keenan, Christine R.; Langenbach, Shenna; Li, Meina; Chen, Qianyu; Lew, Michael J.; Stewart, Alastair G. (2018): Cortisol limits selected actions of synthetic glucocorticoids in the airway epithelium. In: *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 32 (3), S. 1692–1704. DOI: 10.1096/fj.201700730R.

- Qin, Jun; Xu, Qing (2014): Functions and application of exosomes. In: *Acta poloniae pharmaceutica* 71 (4), S. 537–543. PMID: 25272880.
- Quadri, Zainuddin; Elsherbini, Ahmed; Bieberich, Erhard (2022): Extracellular vesicles in pharmacology: Novel approaches in diagnostics and therapy. In: *Pharmacological research* 175, Artikel 105980. DOI: 10.1016/j.phrs.2021.105980.
- Quah, Benjamin J. C.; Parish, Christopher R. (2010): The use of carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester (CFSE) to monitor lymphocyte proliferation. In: *Journal of visualized experiments* 44, Artikel e2259, S. 1–4. DOI: 10.3791/2259.
- Rathinam, Vijay A. K.; Vanaja, Sivapriya Kailasan; Fitzgerald, Katherine A. (2012): Regulation of inflammasome signaling. In: *Nature immunology* 13 (4), S. 333–342. DOI: 10.1038/ni.2237.
- Reddel; Ke; Gerwin; Lechner; Harris (1988): Transformation of human bronchial epithelial cells by infection with SV40 or Adenovirus-12 SV40 Hybrid Virus or Transfection via Strontium Phosphate. In: *Cancer Research* 48, 1904-1909. PMID: 2450641.
- Ridley, Caroline; Thornton, David J. (2018): Mucins: the frontline defence of the lung. In: *Biochemical Society transactions* 46 (5), S. 1099–1106. DOI: 10.1042/BST20170402.
- Rupert, Déborah L. M.; Claudio, Virginia; Lässer, Cecilia; Bally, Marta (2017): Methods for the physical characterization and quantification of extracellular vesicles in biological samples. In: *Biochimica et biophysica acta. General subjects* 1861 (1 Pt A), S. 3164–3179. DOI: 10.1016/j.bbagen.2016.07.028.
- Russell, Richard J.; Brightling, Christopher (2017): Pathogenesis of asthma: implications for precision medicine. In: *Clinical science* 131 (14), S. 1723–1735. DOI: 10.1042/CS20160253.
- Sahoo, Susmita; Adamiak, Marta; Mathiyalagan, Prabhu; Kenneweg, Franziska; Kafert-Kasting, Sabine; Thum, Thomas (2021): Therapeutic and Diagnostic Translation of Extracellular Vesicles in Cardiovascular Diseases: Roadmap to the Clinic. In: *Circulation* 143 (14), S. 1426–1449. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.120.049254.
- Si, Zhenyang; Zhang, Biao (2021): Amygdalin Attenuates Airway Epithelium Apoptosis, Inflammation, and Epithelial-Mesenchymal Transition through Restraining the TLR4/NF- κ B Signaling Pathway on LPS-Treated BEAS-2B Bronchial Epithelial Cells. In: *International archives of allergy and immunology* 182 (10), S. 997–1007. DOI: 10.1159/000514209.

- Stam, Janine; Bartel, Sabine; Bischoff, Rainer; Wolters, Justina C. (2021): Isolation of extracellular vesicles with combined enrichment methods. In: *Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences* 1169, Artikel 122604, S. 1–15. DOI: 10.1016/j.jchromb.2021.122604.
- Steelant, Brecht (2020): Epithelial dysfunction in chronic respiratory diseases, a shared endotype? In: *Current opinion in pulmonary medicine* 26 (1), S. 20–26. DOI: 10.1097/MCP.0000000000000638.
- Stern, Jessica; Pier, Jennifer; Litonjua, Augusto A. (2020): Asthma epidemiology and risk factors. In: *Seminars in immunopathology* 42 (1), S. 5–15. DOI: 10.1007/s00281-020-00785-1.
- Strzelak, Agnieszka; Ratajczak, Aleksandra; Adamiec, Aleksander; Feleszko, Wojciech (2018): Tobacco Smoke Induces and Alters Immune Responses in the Lung Triggering Inflammation, Allergy, Asthma and Other Lung Diseases: A Mechanistic Review. In: *International journal of environmental research and public health* 15 (5), Artikel 1033, S. 1–35. DOI: 10.3390/ijerph15051033.
- Takeuchi, Toshihide (2021): Pathogenic and protective roles of extracellular vesicles in neurodegenerative diseases. In: *Journal of biochemistry* 169 (2), S. 181–186. DOI: 10.1093/jb/mvaa131.
- Takizawa, H.; Ohtoshi, T.; Kawasaki, S.; Abe, S.; Sugawara, I.; Nakahara, K. et al. (2000): Diesel exhaust particles activate human bronchial epithelial cells to express inflammatory mediators in the airways: a review. In: *Respirology* 5 (2), S. 197–203. DOI: 10.1046/j.1440-1843.2000.00245.x.
- Tan, Hern-Tze Tina; Hagner, Stefanie; Ruchti, Fiorella; Radzikowska, Urszula; Tan, Ge; Altunbulakli, Can et al. (2019): Tight junction, mucin, and inflammasome-related molecules are differentially expressed in eosinophilic, mixed, and neutrophilic experimental asthma in mice. In: *Allergy* 74 (2), S. 294–307. DOI: 10.1111/all.13619.
- Taylor, Douglas D.; Shah, Sahil (2015): Methods of isolating extracellular vesicles impact down-stream analyses of their cargoes. In: *Methods* 87, S. 3–10. DOI: 10.1016/j.ymeth.2015.02.019.
- Tertel, Tobias; Bremer, Michel; Maire, Cecile; Lamszus, Katrin; Peine, Sven; Jawad, Rim et al. (2020): High-Resolution Imaging Flow Cytometry Reveals Impact of Incubation Temperature on Labeling of Extracellular Vesicles with Antibodies. In: *Cytometry. Part A : the journal of the International Society for Analytical Cytology* 97 (6), S. 602–609. DOI: 10.1002/cyto.a.24034.

Théry, Clotilde; Ostrowski, Matias; Segura, Elodie (2009): Membrane vesicles as conveyors of immune responses. In: *Nature reviews. Immunology* 9 (8), S. 581–593. DOI: 10.1038/nri2567.

Théry, Clotilde; Witwer, Kenneth W.; Aikawa, Elena; Alcaraz, Maria Jose; Anderson, Johnathon D.; Andriantsitohaina, Ramaroson et al. (2018): Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018 (MISEV2018): a position statement of the International Society for Extracellular Vesicles and update of the MISEV2014 guidelines. In: *Journal of extracellular vesicles* 7 (1), Artikel 1535750, S. 1–47. DOI: 10.1080/20013078.2018.1535750.

Thornton, David J.; Rousseau, Karine; McGuckin, Michael A. (2008): Structure and function of the polymeric mucins in airways mucus. In: *Annual review of physiology* 70, S. 459–486. DOI: 10.1146/annurev.physiol.70.113006.100702.

Tian, Tian; Zhu, Yan-Liang; Hu, Fei-Hu; Wang, Yuan-Yuan; Huang, Ning-Ping; Xiao, Zhong-Dang (2013): Dynamics of exosome internalization and trafficking. In: *Journal of cellular physiology* 228 (7), S. 1487–1495. DOI: 10.1002/jcp.24304.

Tliba, Omar; Panettieri, Reynold A. (2019): Paucigranulocytic asthma: Uncoupling of airway obstruction from inflammation. In: *The Journal of allergy and clinical immunology* 143 (4), S. 1287–1294. DOI: 10.1016/j.jaci.2018.06.008.

Trappe, Anne; Donnelly, Seamas C.; McNally, Paul; Coppinger, Judith A. (2021): Role of extracellular vesicles in chronic lung disease. In: *Thorax*, S. 1–10. DOI: 10.1136/thoraxjnl-2020-216370.

Valkonen, S.; van der Pol, E.; Böing, A.; Yuana, Y.; Yliperttula, M.; Nieuwland, R. et al. (2017): Biological reference materials for extracellular vesicle studies. In: *European journal of pharmaceutical sciences : official journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences* 98, S. 4–16. DOI: 10.1016/j.ejps.2016.09.008.

Verweij, Frederik J.; Balaj, Leonora; Boulanger, Chantal M.; Carter, David R. F.; Compeer, Ewoud B.; D'Angelo, Gisela et al. (2021): The power of imaging to understand extracellular vesicle biology in vivo. In: *Nature methods* 18 (9), S. 1013–1026. DOI: 10.1038/s41592-021-01206-3.

Wang, Muyun; Zhang, Yanbei; Xu, Mengmeng; Zhang, Hai; Chen, Yuqing; Chung, Kian Fan et al. (2019): Roles of TRPA1 and TRPV1 in cigarette smoke -induced airway epithelial cell injury model. In: *Free radical biology & medicine* 134, S. 229–238. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2019.01.004.

- Welsh, Joshua A.; Holloway, Judith A.; Wilkinson, James S.; Englyst, Nicola A. (2017): Extracellular Vesicle Flow Cytometry Analysis and Standardization. In: *Frontiers in cell and developmental biology* 5, S. 78. DOI: 10.3389/fcell.2017.00078.
- Welsh, Joshua A.; van der Pol, Edwin; Arkesteijn, Ger J. A.; Bremer, Michel; Brisson, Alain; Coumans, Frank et al. (2020): MIFlowCyt-EV: a framework for standardized reporting of extracellular vesicle flow cytometry experiments. In: *Journal of extracellular vesicles* 9 (1), Artikel 1713526, S. 1–17. DOI: 10.1080/20013078.2020.1713526.
- Wenzel, Sally E. (2012): Asthma phenotypes: the evolution from clinical to molecular approaches. In: *Nature medicine* 18 (5), S. 716–725. DOI: 10.1038/nm.2678.
- Whitcutt, M. J.; Adler, K. B.; Wu, R. (1988): A biphasic chamber system for maintaining polarity of differentiation of cultured respiratory tract epithelial cells. In: *In vitro cellular & developmental biology : journal of the Tissue Culture Association* 24 (5), S. 420–428. DOI: 10.1007/BF02628493.
- Willis-Owen, Saffron A. G.; Cookson, William O. C.; Moffatt, Miriam F. (2018): The Genetics and Genomics of Asthma. In: *Annual review of genomics and human genetics* 19, S. 223–246. DOI: 10.1146/annurev-genom-083117-021651.
- Xatzipsalti, Maria; Papadopoulos, Nikolaos G. (2007): Cellular and animals models for rhinovirus infection in asthma. In: *Contributions to microbiology* 14, S. 33–41. DOI: 10.1159/000107053.
- Yamamoto, Tomofumi; Yamamoto, Yusuke; Ochiya, Takahiro (2023): Extracellular vesicle-mediated immunoregulation in cancer. In: *International journal of hematology* 117, S. 640–646. DOI: 10.1007/s12185-022-03436-3.
- Yáñez-Mó, María; Siljander, Pia R-M; Andreu, Zoraida; Zavec, Apolonija Bedina; Borràs, Francesc E.; Buzas, Edit I. et al. (2015): Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions. In: *Journal of extracellular vesicles* 4, Artikel 27066, S. 1–62. DOI: 10.3402/jev.v4.27066.
- Yang, Yuemei; Jia, Man; Ou, Yingwei; Adcock, Ian M.; Yao, Xin (2021): Mechanisms and biomarkers of airway epithelial cell damage in asthma: A review. In: *The clinical respiratory journal* 15 (10), S. 1027–1045. DOI: 10.1111/crj.13407.
- Zhang, Zhuo; Pratheeshkumar, Poyil; Budhraj, Amit; Son, Young-Ok; Kim, Donghern; Shi, Xianglin (2015): Role of reactive oxygen species in arsenic-induced transformation of human lung bronchial epithelial (BEAS-2B) cells. In: *Biochemical and biophysical research communications* 456 (2), S. 643–648. DOI: 10.1016/j.bbrc.2014.12.010.

8 Anhang

Verzeichnis der akademischen Lehrer/-innen

Meine akademischen Lehrenden waren in Marburg:

Vorklinischer Studienabschnitt

- Praktikum der Physik für Mediziner – Unter der Leitung von *Dr. Beate Feuser*
- Praktikum der Chemie für Mediziner – Unter der Leitung von *Prof. Neumüller*
- Praktikum der Biologie für Mediziner – Unter der Leitung von *Prof. Lill*
- Seminar und Kursus der makroskopischen und mikroskopischen Anatomie – Unter der Leitung von *Prof. Kinscherf*, unterrichtet von *Dr. Schäfer*
- Praktikum und Seminar der Biochemie/Molekularbiologie – Unter der Leitung von *Dr. Rost*
- Praktikum und Seminar der Physiologie – Unter der Leitung von *Dr. Preisig-Müller*
- Kursus und Seminar der medizinischen Psychologie und Soziologie – Unter der Leitung von *Prof. Thieme*

Klinischer Studienabschnitt

- Allgemeinmedizin – Unter der Leitung von *Prof. Becker*, u.a. unterrichtet von *Prof. Bösner*
- Anästhesiologie – Unter der Leitung von *Dr. Kalmus*
- Arbeitsmedizin – Unter der Leitung von *Prof. Schneider*
- Augenheilkunde – Unter der Leitung von *Prof. Schulze*
- Bildgebende Verfahren, Strahlenbehandlung, Strahlenschutz – Unter der Leitung von *Dr. Figiel*, u.a. unterrichtet von *Prof. Vorwerk*
- Chirurgie – Unter der Leitung von *Dr. Josephs*, *Dr. Pöttgen*, u.a. unterrichtet von *Prof. Aigner*
- Dermatologie, Venerologie – Unter der Leitung von *Prof. Pfützner*
- Epidemiologie, Medizinische Biometrie, Medizinische Informatik – Unter der Leitung von *Prof. Chung* und *Prof. Kuhn*
- Frauenheilkunde und Geburtshilfe – Unter der Leitung von *Prof. Wagner* und *Dr. Jansen*
- Geschichte, Theorie, Ethik der Medizin – Unter der Leitung von *Prof. Roelcke* und *Dr. Seifart*
- Gesundheitsökonomie, Gesundheitssystem, Öffentliches Gesundheitswesen – Unter der Leitung von *Prof. Geraedts*

- Hals-Nasen-Ohrenheilkunde – Unter der Leitung von *Dr. Hoch*, u.a. unterrichtet von *Prof. Geisthoff*
- Hygiene, Mikrobiologie, Virologie – Unter der Leitung von *Prof. Lohoff* und *Prof. Maisner*
- Humangenetik – Unter der Leitung von *Prof. Schumacher*
- Infektiologie, Immunologie – Unter der Leitung von *Prof. Lohoff* und *Prof. Bauer*
- Innere Medizin – Unter der Leitung von *Dr. Klemmer* und *Dr. Homm*, u.a. unterrichtet von *Prof. Schäfer*
- Kinderheilkunde – Unter der Leitung von *Prof. Weber*
- Klinische Chemie, Laboratoriumsdiagnostik – Unter der Leitung von *Prof. Geßner*, u.a. unterrichtet von *Prof. Garn*
- Klinische Pharmakologie/Pharmakotherapie – Unter der Leitung von *Prof. Czubayko*
- Klinische Umweltmedizin – Unter der Leitung von *Prof. Günther*
- Medizin des Alterns und des alten Menschen – Unter der Leitung von *Prof. Vogelmeier*
- Neurologie, Neurochirurgie, Neuroradiologie, Neuropathologie – Unter der Leitung von *Dr. Simon*, *Dr. Bopp*, *Prof. Kemmling*, *Dr. Keber*
- Notfallmedizin – Unter der Leitung von *Dr. Vojnar*
- Orthopädie – Unter der Leitung von *Dr. Wack*
- Palliativmedizin – Unter der Leitung von *Dr. Riera-Knorrenschild*
- Pathologie – Unter der Leitung von *Prof. Denkert*
- Pharmakologie, Toxikologie – Unter der Leitung von *Prof. Plant*
- Prävention, Gesundheitsförderung – Unter der Leitung von *Prof. Becker*
- Psychiatrie, Psychotherapie – Unter der Leitung von *Dr. Kluge* und *Dr. Thum*
- Psychosomatische Medizin und Psychotherapie – Unter der Leitung von *Dr. Homm*
- Rechtsmedizin – Unter der Leitung von *Prof. Kernbach-Wighton*
- Rehabilitation, Physikalische Medizin, Naturheilverfahren – Unter der Leitung von *Dr. Wack* und *Dr. Weske*
- Schmerzmedizin – Unter der Leitung von *Dr. Kussin*
- Schwerpunktcurriculum Onkologie – Unter der Leitung von *Prof. Neubauer*, *Prof. Wüdisch*, *Dr. Hoffmann*
- Urologie – Unter der Leitung von *Dr. Sevinc*

8.1 Danksagung

Mein Dank gilt...

...Prof. Dr. Holger Garn für die Möglichkeit meine Promotionsarbeit in Ihrer Arbeitsgruppe absolvieren zu dürfen sowie für die fachliche Unterstützung während der gesamten Zeit.

...Lukas Hintz für die Vorarbeit zur Isolierung und Analyse der von mir verwendeten extrazellulären Vesikel.

...Dr. Sarah Miethe, Lukas Hintz, Fahd Alhamdan, Kim Pauck, Nicole Löwer, Laura Kühn für die Unterstützung bei der täglichen Laborarbeit, fachlichen Ratschläge und Anregungen.

...der gesamten AG Garn für das angenehme Arbeitsklima und eine insgesamt sehr lehrreiche und wertvolle Zeit.

...Dr. Christian Preusser und Birke Benedikter für das Teilen Ihrer Erfahrungen und Expertise bezüglich der Erforschung von extrazellulären Vesikeln.

...der AG Pogge von Strandmann, insbesondere Dr. Christian Preusser für die technischen Ratschläge, Bereitstellung und Bedienung der Nanoflow Zytometrie.

...Kathrin Balz für die Hilfestellung und Bereitstellung von Farbstoffen zur Fluoreszenzmarkierung von extrazellulären Vesikeln.

...der AG Worzfeld, insbesondere Dr. Yun Jiang für die technischen Ratschläge und Bereitstellung des Konfokalmikroskops.

...Falk Krauß und Dipl.-Psych. Julia Adler für das Korrekturlesen dieser Promotionsarbeit und das Beitragen wertvoller Anmerkungen und Verbesserungsvorschläge.

...meinen Eltern und meiner Schwester, meinen Freunden und ganz besonders Falk Krauß, die mir während dieser Zeit fachlich, seelisch oder finanziell zur Seite standen und auf deren Unterstützung ich mich voll und ganz verlassen konnte.